



pGEM-3ZEVL Seamless Cloning Kit

产品组成	CL121-01
pGEM-3ZEVL 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:

pGEM-3ZEVL 为克隆载体, 载体骨架小, 连接效率高, 具有氨苄青霉素抗性。本产品提供经 EcoRV 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. pGEM-3ZEVL 为克隆载体, 载体骨架小, 连接效率高。
2. pGEM-3ZEVL 载体具有氨苄青霉素抗性。。
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。

操作步骤:

1. pGEM-3ZEVL 线性化载体使用方法:

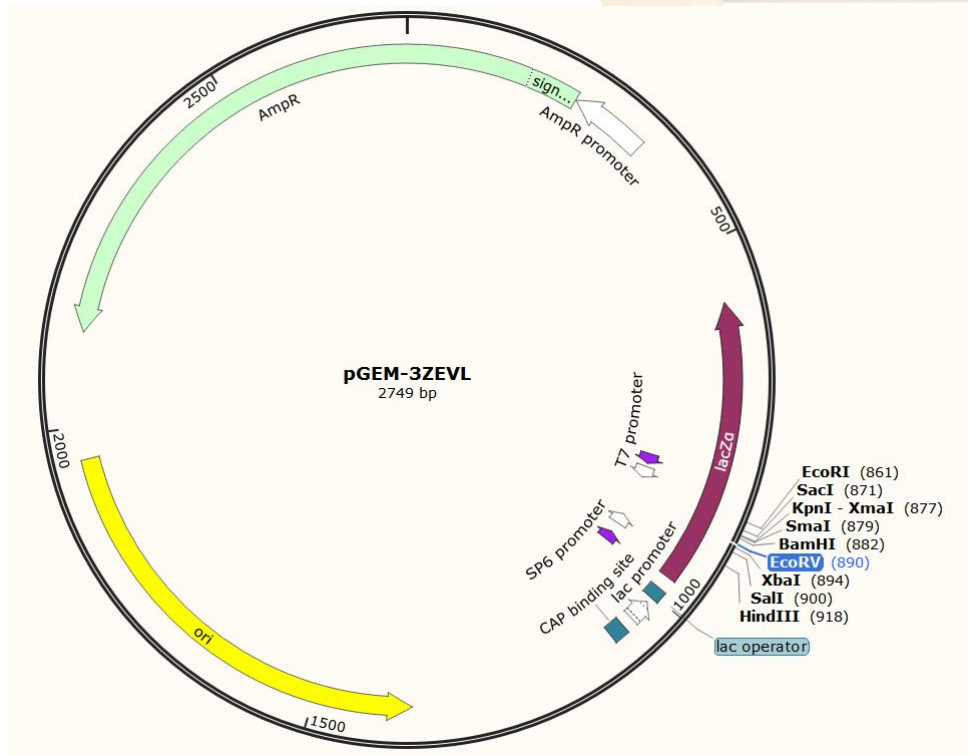
(1) pGEM3ZEVL 当做克隆载体使用, 可以在扩增 PCR 产物的上游引物 5'端添加序列: TCGGTACCCGGGGATCCGAT, 下游引物 5'端添加序列: TGCAGGTGCTAGAGAT, 就可以通过无缝克隆连接到 pGEM3ZEVL 中。

(2) 测序引物:

M13F: GTAAAACGACGGCCAGT

M13R: CAGGAAACAGCTATGAC

(3) pGEM-3ZEVL 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
pGEM-3ZEVL 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。

pGEM-3ZEVL 载体序列

>pGEM-3ZEVL

ATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTC
 GGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACT
 CGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAA
 AAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGA
 ATACTCATACTCTTCCTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGA
 GCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTT
 CCCCAGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAA
 AAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAAC
 CTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGCTGTAAAGCGGATGCCGGG
 AGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTTGGCGGGTGTCGGGGCTGGCTT
 AACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATAC
 CGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGGCGCCATTCGCCATTACGGCTGC
 GCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGA
 AAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTCCAGTCAC
 GACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTCGA

GCTCGGTACCCGGGGATCCGAT***ATCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTG
 AGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTG
 TGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTA
 AAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCC
 CGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCTGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCG
 GGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGC
 GCTCGGTCTGTTGCGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTT
 ATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAA
 AGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCC
 CTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGA
 CTATAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGA
 CCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGCGCTTTCT
 CATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTTCGGTGTAAGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCT
 GTGTGCACGAACCCCCGTTACGCCCAGCGCTGCGCTTATCCGGTAAGTATCGTCT
 TGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAG
 GATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAAC
 TACGGGTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCT
 TCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTG
 GTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATC
 CTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTACGTTAAGGGAT
 TTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAATAATGAA
 GTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAA
 TCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTC
 CCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAA
 TGATACCGCGAGACCCACGCTCACC GGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGC
 CGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATT
 AATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTG
 TTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGC
 TCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGG
 TTAGTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGCGAGTGTTATCACTC
 ATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCT
 GTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTT
 GCTCTTGCCCCGGCGTCAATACGGG

BM210513