



pcDNA3.1(+) Seamless Cloning Kit

产品组成	CL140-01
pcDNA3.1(+)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:

pcDNA3.1(+)载体为哺乳动物细胞表达载体, 具有人巨细胞病毒(CMV)启动子, 在哺乳动物细胞中高水平表达; 新霉素抗性基因, 用于选择稳定细胞系。本产品提供 pcDNA3.1(+)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. pcDNA3.1(+)具有人巨细胞病毒(CMV)启动子, 在哺乳动物细胞中高水平表达。
2. pcDNA3.1(+)具有新霉素抗性基因, 用于选择稳定细胞系。
3. pcDNA3.1(+)经 EcoRI酶切后的线性化载体, 省时省力。
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. pcDNA3.1(+)线性化载体使用方法:

(1) pcDNA3.1(+)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: TAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGC**gccacc** (**gccacc** 为 Kozak 序列)

下游引物 5'端添加序列: CACTGTGCTGGATATCTGCAGAATTC

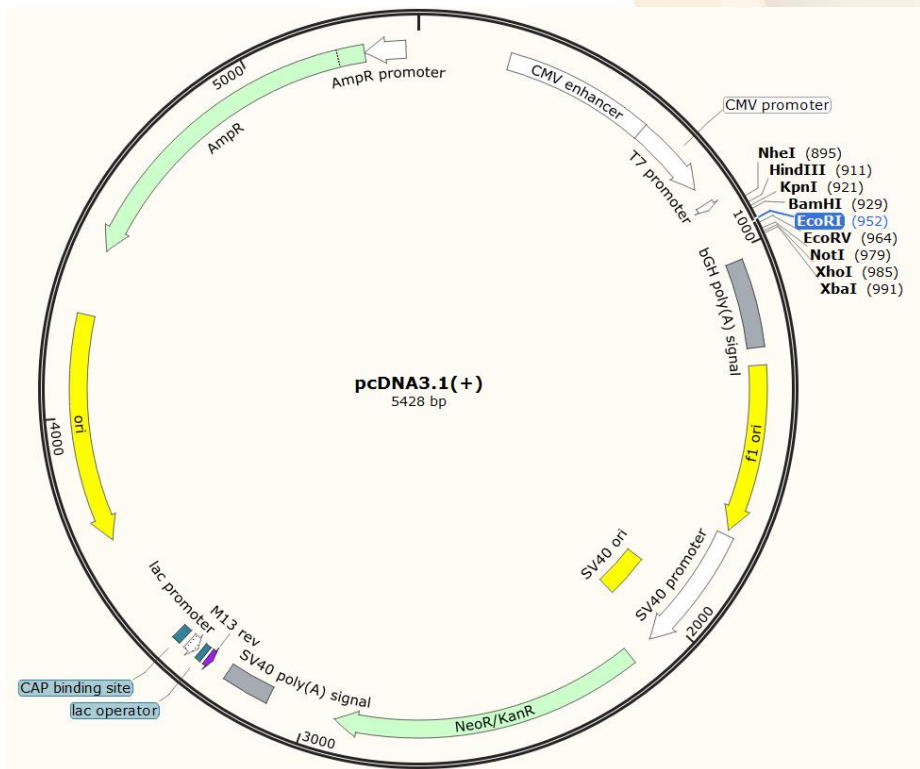
通过无缝克隆连接到 pcDNA3.1(+)中。

(2) 测序引物

pcDNA3.1-F:CTAGAGAACCCACTGCTTAC

pcDNA3.1-R(BGH-R):TAGAAGGCACAGTCGAGG

(3) pcDNA3.1(+)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
pcDNA3.1(+)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。

pcDNA3.1(+)载体序列：

>pcDNA3.1 (+)

GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCT
 GATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGA
 GTAGTGCGCGAGCAAAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTG
 CATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGCC
 AGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGG
 TCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGC
 CCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATG
 TTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTA

CGGTAAACTGCCCACCTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCC
 TATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCT
 TATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGG
 TGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGA CTCACGGGG
 ATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGT TTTTGGCACCAAAATC
 AACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAAC TCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGG
 TAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAA
 CCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGC
 TGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGT
 GGTG**GAATTC**TGCAGATATCCAGCACAGTGGCGGCCGCTCGAGTCTAGAGGGCCC
 GTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGT
 TTGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTTT
 CCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCAATCTATTCTG
 GGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAG
 GCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTG
 GGGCTCTAGGGGTATCCCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGT
 GTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTC
 CTTTCGCTTCTTCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCT
 CTAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCC
 CAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACG
 GTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCA
 AACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTATAAGGGATTTT
 GCCGATTTCCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGA
 ATTAATTCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCA
 GCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGA
 AAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGT
 CAGCAACCATAGTCCCGCCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCCTAACTCCGCCCAG
 TTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTATGCAAGAGGCCGA
 GGCCGCCTCTGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGC
 CTAGGCTTTTGC AAAAAGCTCCCGGGAGCTTGTATATCCATTTTCGGATCTGATCA
 AGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGT
 TCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAA
 TCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGTTCT

TTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGC
 GCGGTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTT
 GTCCTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGAT
 CTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAAT
 GCGGGCGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTGACCCACCAAGCGAAA
 CATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATG
 ATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAAGTGTTCGCCAGGCTCA
 AGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTT
 GCCGAATATCATGGTGGAATAATGGCCGCTTTTCTGGATTTCATGACTGTGGCCGGC
 TGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGA
 AGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCT
 CCCGATTGCGAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGG
 ACTCTGGGGTTCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCCAACCTGCCATCACGAGAT
 TTCGATTCCACCGCCGCCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGA
 CGCCGGCTGGATGATCCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCCAC
 CCCAATTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAA
 TTTACAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCAT
 CAATGTATCTTATCATGTCTGTATACCGTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATC
 ATGGTCATAGCTGTTTCCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACA
 TACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACT
 CACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCTGTGC
 CAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGC
 GCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCGGCTGCGGCG
 AGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGAT
 AACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAA
 AAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAC
 AAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAC
 CAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGC
 TTACCGGATACCTGTCCGCCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGCGGCTTTCTCATAGC
 TCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTG
 TGCACGAACCCCCGTTACGCCCAGCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTT
 GAGTCCAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAAC
 AGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGG

CCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGC
CAGTTACCTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCG
CTGGTAGCGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATC
TCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAAC
TCACGTAAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCT
TTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTC
TGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTT
GTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGC
TTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACC GGCTC
CAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTC
CTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTA
AGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGT
GGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAA
GGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCC
TCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCGAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAG
CACTGCATAATTCTCTTACTGTGCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTG
AGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTG
CCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAGTGCTC
ATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACC GCTGTTGA
GATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACT
TTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAA
GGGAATAAGGGCGACACGGAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTCAATATT
ATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTT
AGAAAAATAACAAATAGGGGTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTG
ACGTC

BM210513