



pET-28a(+) Seamless Cloning Kit

产品组成	CL131-01
pET-28a(+)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-28a(+)载体为高水平的原核表达载体,在 N 端含有 His-Tag, Thrombin(凝血酶)酶切位点, T7-Tag, 在 C 端具有 His-Tag。本产品提供 pET-28a(+)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-28a 载体为原核表达载体,具有 N-His, N-Thrombin, N-T7 和 C-His。
2. pET-28a 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-28a(+)线性化载体使用方法:

(1) pET-28a(+)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: GCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATG (需要 5'端 HIS 标签时)

或者 AACTTTAAGAAGGAGATATACCATG (不需要 5'端 HIS 标签时)

下游引物 5'端添加序列: CTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTCTCGAG (需要 3'端 HIS 标签时)

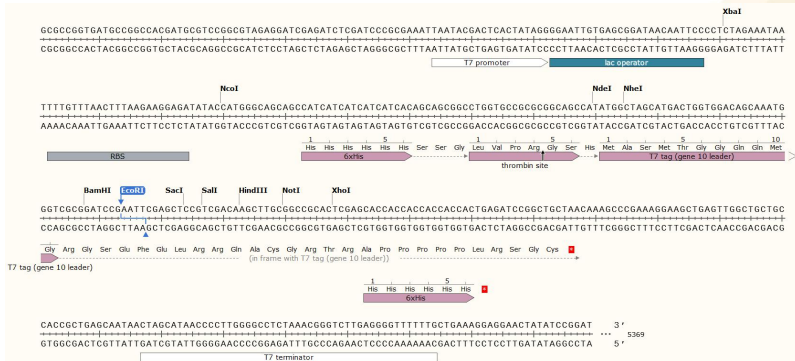
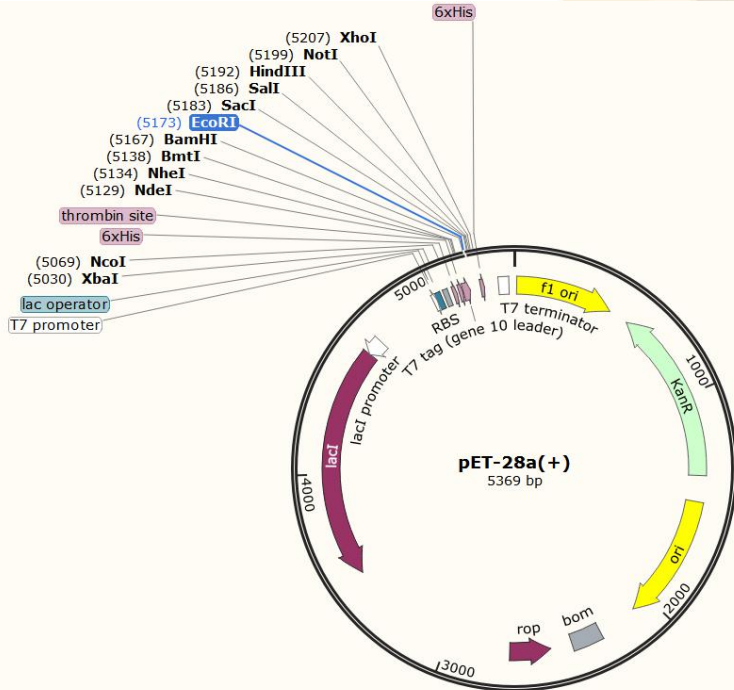
或者 CTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGCCTCGAGTCA (不需要 3'端 HIS 标签时)
通过无缝克隆连接到 pET-28a(+)中。

(2) 测序引物

T7: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

T7t: 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'

(3) pET-28a(+)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-28a(+)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°C 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°C。

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°C 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-28a(+)载体序列：

>pET-28a(+)

TGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGT
 TACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCT
 TTCTTCCCTTCCTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCTCCGTCGAAGCTCTAAATCG
 GGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAA
 CTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCG
 CCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACCTGGA
 ACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATT
 TCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAA
 CAAAATATTAACGTTTACAATTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGA

ACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAATTAAT
 TCTTAGAAAACTCATCGAGCATCAAATGAACTGCAATTTATTCATATCAGGATT
 ATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTCACCG
 AGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCGTC
 CAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCCTCGTCAAAAAATAAGGTTATCAAGTGAG
 AAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAAAGTTTATGCATT
 CTTTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAAATCACTCGCA
 TCAACCAAACCGTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACGCGAT
 CGCTGTAAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGAACA
 CTGCCAGCGCATCAACAATATTTTACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATACCTGG
 AATGCTGTTTTCCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTAC
 GGATAAAATGCTTGATGGTCGGAAGAGGCATAAATTCCGTCAGCCAGTTTAGTCT
 GACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAACA
 ACTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATAACAATCGATAGATTGTCGCACCTGATTGCCCG
 ACATTATCGCGAGCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTTAAT
 CGCGGCCCTAGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATAACACCCCTTGATT
 ACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTATTGTTTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAG
 TTTTCGTTCCTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAG
 ATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAACAAAAAAACCACCGCTACC
 AGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAC
 GGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCTTCTAGTGAGCCGTAGTTAG
 GCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTG
 TTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAA
 GACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCA
 CACAGCCCAGCTTGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTG
 AGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGG
 TAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAAC
 GCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATT
 TTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGGC
 CTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTCTCCTGCGTT
 ATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTC
 GCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAG
 CGCCTGATGCGGTATTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATATAT

GGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATACACTC
CGCTATCGCTACGTGACTGGGTTCATGGCTGCGCCCCGACACCCGCCAACACCCGC
TGACGCGCCCTGACGGGCTTGCTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTG
ACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCTCAGAGGTTTTCACCGTCATCACCGAAACGCG
CGAGGCAGCTGCGGTAAAGCTCATCAGCGTGGTCTGAAGCGATTACAGATGT
CTGCCTGTTTCATCCGCGTCCAGCTCGTTGAGTTTCTCCAGAAGCGTTAATGTCTGG
CTTCTGATAAAGCGGGCCATGTTAAGGGCGGTTTTTCTGTTTGGTCACTGATGC
CTCCGTGTAAGGGGGATTTCTGTTTCATGGGGGTAATGATACCGATGAAACGAGAG
AGGATGCTCACGATACGGGTACTGATGATGAACATGCCCGTTACTGGAACGTT
GTGAGGGTAAACAACCTGGCGGTATGGATGCGGCGGGACCAGAGAAAAATCACTC
AGGGTCAATGCCAGCGCTTCGTTAATACAGATGTAGGTGTTCCACAGGGTAGCCA
GCAGCATCCTGCGATGCAGATCCGGAACATAATGGTGCAGGGCGCTGACTTCCGC
GTTTCCAGACTTTACGAAACACGGAAACCGAAGACCATTATGTTGTTGCTCAGG
TCGCAGACGTTTTGCAGCAGCAGTCGCTTCACGTTTCGCTCGCGTATCGGTGATTC
ATTCTGCTAACCAGTAAGGCAACCCCGCCAGCCTAGCCGGGTCTCAACGACAG
GAGCACGATCATGCGCACCCGTGGGGCGGCCATGCCGGCGATAATGGCCTGCTTC
TCGCCGAAACGTTTGGTGGCGGGACCAGTGACGAAGGCTTGAGCGAGGGCGTG
CAAGATTCCGAATACCGCAAGCGACAGGCCGATCATCGTCGCGCTCCAGCGAAA
GCGGTCTCGCCGAAAAATGACCCAGAGCGCTGCCGGCACCTGTCTACGATTG
CATGATAAAGAAGACAGTCATAAGTGCGGCGACGATAGTCATGCCCCGCGCCAC
CGGAAGGAGCTGACTGGGTGAAGGCTCTCAAGGGCATCGGTGAGATCCCGGT
GCCTAATGAGTGAGCTAACTTACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCA
GTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAG
AGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCCAGGGTGTTTCTTTTACCAGTGAGACGGG
CAACAGCTGATTGCCCTTACCGCCTGGCCCTGAGAGAGTTGCAGCAAGCGGTC
CACGCTGGTTTGCCCCAGCAGGCGAAAATCCTGTTTGATGGTGGTTAACGGCGGG
ATATAACATGAGCTGTCTTCGGTATCGTCGTATCCCACTACCGAGATATCCGCACCA
ACGCGCAGCCCGGACTCGGTAATGGCGCGCATTGCGCCAGCGCCATCTGATCGT
TGGCAACCAGCATCGCAGTGGGAACGATGCCCTCATTACGATTTGCATGGTTTG
TTGAAAACCGGACATGGCACTCCAGTCGCTTCCCGTTCCGCTATCGGCTGAATT
TGATTGCGAGTGAGATATTTATGCCAGCCAGCCAGACGACGCGCCGAGACA
GAACTTAATGGGCCCCGCTAACAGCGCGATTTGCTGGTGACCCAATGCGACCAGAT
GCTCCACGCCCAGTCGCGTACCGTCTTCATGGGAGAAAAATAATACTGTTGATGGG

TGTCTGGTCAGAGACATCAAGAAATAACGCCGGAACATTAGTGCAGGCAGCTTCC
ACAGCAATGGCATCCTGGTCATCCAGCGGATAGTTAATGATCAGCCCACTGACGC
GTTGCGCGAGAAGATTGTGCACCGCCGCTTTACAGGCTTCGACGCCGCTTCGTTC
TACCATCGACACCACGCTGGCACCCAGTTGATCGGCGCGAGATTTAATCGCC
GCGACAATTTGCGACGGCGCGTGCAGGGCCAGACTGGAGGTGGCAACGCCAATC
AGCAACGACTGTTTGCCCGCCAGTTGTTGTGCCACGCGTTTGGGAATGTAATTCA
GCTCCGCCATCGCCGCTTCCACTTTTTCCCGCGTTTTCGCAGAAACGTGGCTGGC
CTGGTTACACGCGGGAAACGGTCTGATAAGAGACACCGGCATACTCTGCGAC
ATCGTATAACGTTACTGGTTTACATTACCAACCTGAATTGACTCTCTTCCGGGC
GCTATCATGCCATACCGCGAAAGGTTTTGCGCCATTGATGGTGTCCGGGATCTCG
ACGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGCATTAGGAAGCAGCCAGTAGTAGGTTGAGG
CCGTTGAGCACCGCCGCCGAAGGAATGGTGCATGCAAGGAGATGGCGCCCAAC
AGTCCCCCGGCCACGGGGCCTGCCACCATACCCACGCCGAAACAAGCGCTCATG
AGCCCGAAGTGCGAGCCCGATCTTCCCCATCGGTGATGTCGGCGATATAGGCGC
CAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGATGCCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGA
GGATCGAGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAG
CGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATAC
CATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGC
AGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGCGGATCCGGAATTCTG
AGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCTGA
GATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCT
GAGCAATAACTAGCATAACCCCTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTT
TGCTGAAAGGAGGAACTATATCCGGAT

BM210513