



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°C保存

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: CTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGCTCGAG (需要 3'端 HIS 标签时)

或者 CTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGCCTCGAGTCA (不需要 3'端 HIS 标签时)

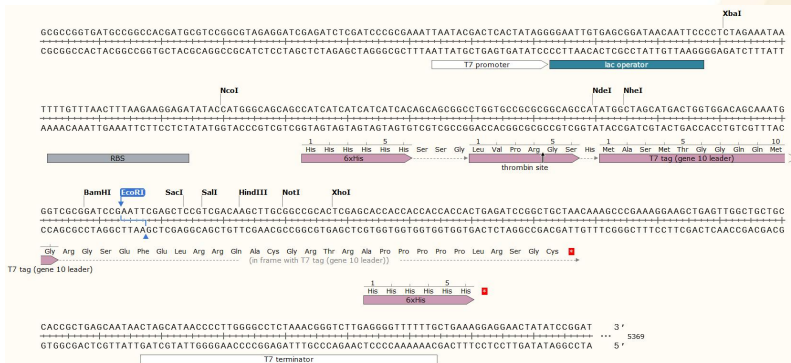
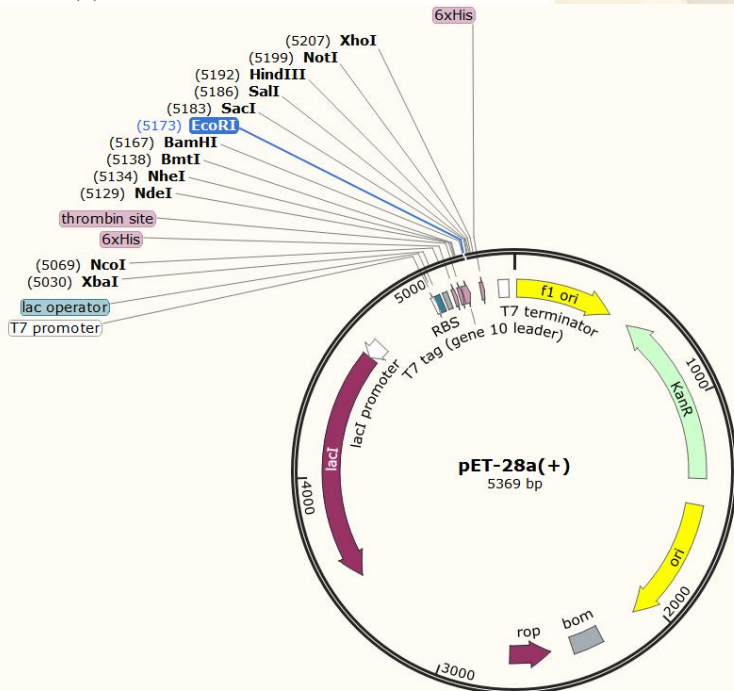
通过无缝克隆连接到 pET-28a(+)中。

(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
TACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCT
TTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCG
GGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAA
CTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCG
CCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACCTGGA
ACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATT
TCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAA
CAAAATATTAACGTTTACAATTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGA
```

ACCCCATTTGTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAATTAAT
 TCTTAGAAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAACTGCAATTTATTCATATCAGGATT
 ATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACACCG
 AGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCGTC
 CAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGTGAG
 AAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAAGTTTATGCATTT
 CTTTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAATCACTCGCA
 TCAACCAAACCGTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAAATACGCGAT
 CGCTGTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGAACA
 CTGCCAGCGCATCAACAATATTTTACCTGAATCAGGATATCTTTCTAATACCTGG
 AATGCTGTTTTCCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTAC
 GGATAAAATGCTTGATGGTCGGAAGAGGCATAAATTCCGTCAGCCAGTTTAGTCT
 GACCATCTCATCTGTAACATCATTGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAACA
 ACTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATAACAATCGATAGATTGTCGCACCTGATTGCCCG
 ACATTATCGCGAGCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTTAAT
 CGCGGCCTAGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATAACACCCCTTGATT
 ACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTATTGTTTCATGACCAAAAATCCCTTAACGTGAG
 TTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAG
 ATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACC
 AGCGGTGGTTTGTGGCCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAC
 GGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAG
 GCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCACATACCTCGCTCTGCTAATCCTG
 TTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAA
 GACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGTTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCA
 CACAGCCAGCTTGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTG
 AGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGG
 TAAGCGGCAGGGTTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAAC
 GCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATT
 TTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGGC
 CTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGTGTCCTTTTGTACATGTTCTTTCTGCGTT
 ATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTC
 GCCGACCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAG
 CGCCTGATGCGGTATTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATATAT

GGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATACACTC
 CGTATCGCTACGTGACTGGGTATGGCTGCGCCCCGACACCCGCCAACACCCGC
 TGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGCATCCGTTACAGACAAGCTGTG
 ACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCGTCATCACCGAAACGCG
 CGAGGCAGCTGCGGTAAAGCTCATCAGCGTGGTCTGAAGCGATTACAGATGT
 CTGCTGTTTCATCCGCGTCCAGCTCGTTGAGTTTCTCCAGAAGCGTTAATGTCTGG
 CTTCTGATAAAGCGGGCCATGTTAAGGGCGGTTTTTCTGTTTGGTCACTGATGC
 CTCCGTGTAAGGGGATTTCTGTTTCATGGGGTAATGATACCGATGAAACGAGAG
 AGGATGCTCACGATACGGGTTACTGATGATGAACATGCCCGTTACTGGAACGTT
 GTGAGGGTAAACAACACTGGCGGTATGGATGCGGCGGGACCAGAGAAAAATCACTC
 AGGGTCAATGCCAGCGCTTCGTTAATACAGATGTAGGTGTTCCACAGGGTAGCCA
 GCAGCATCTGCGATGCAGATCCGGAACATAATGGTGCAGGGCGCTGACTTCCGC
 GTTTCAGACTTTACGAAACACGGAAACCGAAGACCATTTCATGTTGTTGCTCAGG
 TCGCAGACGTTTTGCAGCAGCAGTCGCTTCACGTTTCGCTCGCTATCGGTGATTC
 ATTCTGCTAACCAGTAAGGCAACCCCGCCAGCCTAGCCGGGTCCTCAACGACAG
 GAGCACGATCATGCGCACCCGTGGGGCCGCCATGCCGGCGATAATGGCCTGCTTC
 TCGCCGAAACGTTTGGTGGCGGGACCAGTGACGAAGGCTTGAGCGAGGGCGTG
 CAAGATTCCGAATACCGCAAGCGACAGGCCGATCATCGTCGCGCTCCAGCGAAA
 GCGGTCTCGCCGAAAATGACCCAGAGCGCTGCCGGCACCTGTCTACGAGTTG
 CATGATAAAGAAGACAGTCATAAGTGCGGCGACGATAGTCATGCCCCGCGCCAC
 CGGAAGGAGCTGACTGGGTTGAAGGCTCTCAAGGGCATCGGTGAGATCCCGGT
 GCCTAATGAGTGAGCTAACTTACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCA
 GTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAG
 AGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCCAGGTGGTTTTTCTTTTACCAGTGAGACGGG
 CAACAGCTGATTGCCCTTACCAGCTGCCCTGAGAGAGTTGCAGCAAGCGGTC
 CACGCTGGTTTGCCCCAGCAGGCGAAAATCCTGTTTGATGGTGGTTAACGGCGGG
 ATATAACATGAGCTGTCTTCGGTATCGTCGTATCCACTACCGAGATATCCGCACCA
 ACGCGCAGCCCGACTCGGTAATGGCGCGCATTGCGCCAGCGCCATCTGATCGT
 TGGCAACCAGCATCGCAGTGGGAACGATGCCCTCATTACGATTTGCATGGTTTG
 TTGAAAACCGGACATGGCACTCCAGTCGCCTTCCCGTTCGCTATCGGCTGAATT
 TGATTGCGAGTGAGATATTTATGCCAGCCAGCCAGACGCAGACGCGCCGAGACA
 GAACTTAATGGGCCCCTAACAGCGCGATTTGCTGGTGACCCAATGCGACCAGAT
 GCTCCACGCCAGTCGCGTACCGTCTTCATGGGAGAAAATAATACTGTTGATGGG

TGTCTGGTCAGAGACATCAAGAAATAACGCCGGAACATTAGTGCAGGCAGCTTCC
 ACAGCAATGGCATCCTGGTCATCCAGCGGATAGTTAATGATCAGCCCCTGACGC
 GTTGCGCGAGAAGATTGTGCACCGCCGCTTACAGGCTTCGACGCCGCTTCGTTCC
 TACCATCGACACCACCACGCTGGCACCCAGTTGATCGGCGCGAGATTTAATCGCC
 GCGACAATTTGCGACGGCGGTGCAGGGCCAGACTGGAGGTGGCAACGCCAATC
 AGCAACGACTGTTTGCCCGCCAGTTGTTGTGCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCA
 GCTCCGCCATCGCCGCTTCCACTTTTTCCCGCTTTTCGCAGAAACGTGGCTGGC
 CTGGTTACCCACGCGGGAAACGGTCTGATAAGAGACACCGGCATACTCTGCGAC
 ATCGTATAACGTTACTGGTTTACATTCACCACCCTGAATTGACTCTCTTCCGGGC
 GCTATCATGCCATACCGCGAAAGTTTTGCGCCATTCGATGGTGTCCGGGATCTCG
 ACGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGCATTAGGAAGCAGCCCAGTAGTAGGTTGAGG
 CCGTTGAGCACCGCCCGCAAGGAATGGTGCATGCAAGGAGATGGCGCCAAC
 AGTCCCCCGGCCACGGGGCCTGCCACCATACCCACGCCGAAACAAGCGCTCATG
 AGCCCGAAGTGCGAGCCCGATCTTCCCATCGGTGATGTCGGCGATATAGGCGC
 CAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTATGCCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGA
 GGATCGAGATCTCGATCCCAGAAATTAATACGACTACTATAGGGGAATTGTGAG
 CGGATAACAATCCCCTCTAGAAATAATTTGTTAACTTTAAGAAGGAGATATAC
 CATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGC
 AGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCG
 AGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGACTCGAGCACCACCACCACCACCTGA
 GATCCGGCTGCTAACAAAGCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCT
 GAGCAATAACTAGCATAACCCCTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTT
 TGCTGAAAGGAGGAACTATATCCGGAT

BM20220716