

pPIC9K Seamless Cloning Kit



产品组成	CL150-01
pPIC9K 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:

pPIC9K 为毕赤酵母表达载体,载体能够使用的毕赤酵母宿主菌是 KM71 和 GS115。pPIC9 载体大小 9276 bp, 是融合表达载体, 利用 alpha 因子分泌信号肽, 分泌表达蛋白基因。在毕赤酵母中利用 HIS4 进行筛选。在载体构建过程中, 目的基因必须保证与信号肽的起始密码子的读码框一致。本产品提供 pPIC9K 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. pPIC9K 为毕赤酵母表达载体,载体能够使用的毕赤酵母宿主菌是 KM71 和 GS115。
2. pPIC9 载体利用 alpha 因子分泌信号肽, 分泌表达蛋白基因。
3. 在毕赤酵母中利用 HIS4 进行筛选。
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. pPIC9K 线性化载体使用方法:

(1) pPIC9K 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: GAGAGGCTGAAGCTTACGTAGAATTC

下游引物 5'端添加序列: GCGAATTAATTCGCGGCCGC

通过无缝克隆连接到 pPIC9K 中。

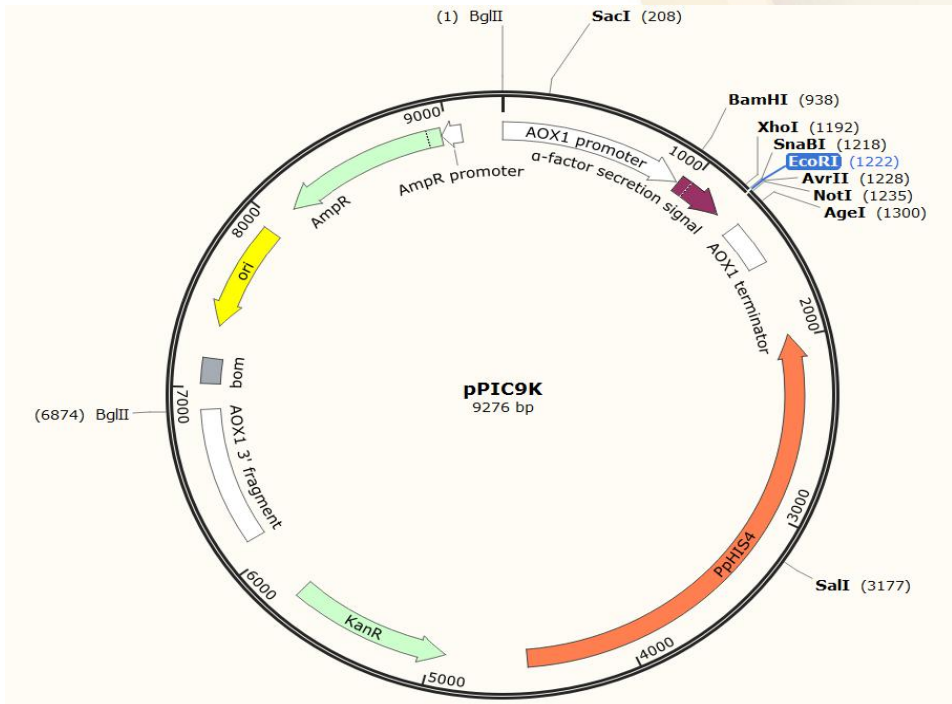
(2) 测序引物

AOX1-F:GACTGGTTCCAATTGACAAGC

或 alpha-Factor-F:TACTATTGCCAGCATTGCTGC

AOX1-R:GCAATGGCATTCTGACATCC

(3) pPIC9K 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
pPIC9K 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。

pPIC9K 载体较大，构建重组质粒建议使用 NEB10-Beta 感受态细胞（货号：BC113-01）。

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。

pPIC9K 载体序列

>pPIC9K(9276bp)

```

AGATCTAACATCCAAAGACGAAAGGTTGAATGAAACCTTTTTGCCATCCGACATC
CACAGGTCCATTCTCACACATAAGTGCCAAACGCAACAGGAGGGGATACACTAG
CAGCAGACCGTTGCAAACGCAGGACCTCCACTCCTCTTCTCCTAACACCCACTT
TTGCCATCGAAAACAGCCCAGTTATTGGGCTTGATTGGAGCTCGCTCATTCCAA
TTCCTTCTATTAGGCTACTAACACCATGACTTTATTAGCCTGTCTATCCTGGCCCC
CTGGCGAGGTTTCATGTTTGTATTCCGAATGCAACAAGCTCCGCATTACACCCG
AACATCACTCCAGATGAGGGCTTTCTGAGTGTGGGGTCAAATAGTTTCATGTTCC
CCAAATGGCCCAAAACTGACAGTTTAAACGCTGTCTTGGAACCTAATATGACAAA
    
```

AGCGTGATCTCATCCAAGATGAACTAAGTTTGGTTCGTTGAAATGCTAACGGCCA
 GTTGGTCAAAAAGAACTTCCAAAAGTCGCCATACCGTTTGTCTGTGTTTGGTATT
 GATTGACGAATGCTCAAAAATAATCTCATTAATGCTTAGCGCAGTCTCTCTATCGC
 TTCTGAACCCCGGTGCACCTGTGCCGAAACGCAAATGGGGAAACACCCGCTTTT
 TGGATGATTATGCATTGTCTCCACATTGTATGCTTCCAAGATTCTGGTGGGAATACT
 GCTGATAGCCTAACGTTTCATGATCAAAATTTAACTGTTCTAACCCCTACTTGACAG
 CAATATATAAACAGAAGGAAGCTGCCCTGTCTTAAACCTTTTTTTTTATCATCATT
 TTAGCTTACTTTCATAATTGCGACTGGTTCCAATTGACAAGCTTTTGATTTTAAACGA
 CTTTTAACGACAACCTTGAGAAGATCAAAAAACAATAATTATTCGAAGGATCCAA
 ACGATGAGATTTCTTCAATTTTTACTGCAGTTTTATTTCGCAGCATCTCCGCATTA
 GCTGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCCGGCTGAA
 GCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTCGATGTTGCTGTTTTGCCATT
 TTCCAACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGC
 TGCTTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTTACGTAGA
 ATTCCTAGGGCGGCCGGAATTAATTCGCCTTAGACATGACTGTTCCCTCAGTTCA
 AGTTGGGCACTTACGAGAAGACCGGTCTTGCTAGATTCTAATCAAGAGGATGTCA
 GAATGCCATTTGCCTGAGAGATGCAGGCTTCATTTTTGATACTTTTTTATTGTAAAC
 CTATATAGTATAGGATTTTTTTTTGTCATTTTGTTTCTTCTCGTACGAGCTTGCTCCTG
 ATCAGCCTATCTCGCAGCTGATGAATATCTTGTGGTAGGGGTTTGGGAAAATCATT
 CGAGTTTGATGTTTTTCTTGGTATTTCCCACTCCTCTTCAGAGTACAGAAGATTAA
 GTGAGAAGTTTCGTTTGTGCAAGCTTATCGATAAGCTTTAATGCGGTAGTTTATCAC
 AGTTAAATTGCTAACGCAGTCAGGCACCGTGTATGAAATCTAACAATGCCTCATC
 GTCATCTCGGCACCGTCACCCTGGATGCTGTAGGCATAGGCTTGGTTATGCCGGT
 ACTGCCGGGCTCTTGCGGGATATCGTCCATTCCGACAGCATCGCCAGTCACTATG
 GCGTGCTGCTAGCGCTATATGCGTTGATGCAATTTCTATGCGCACCCGTTCTCGGA
 GCACTGTCCGACCGCTTTGGCCGCCGCCAGTCTGCTCGCTTCGCTACTTGGAG
 CCACTATCGACTACGCGATCATGGCGACCACACCCGTCTGTGGATCTATCGAATC
 TAAATGTAAGTTAAAATCTCTAAATAATTAATAAGTCCCAGTTTCTCCATACGAAC
 CTTAACAGCATTGCGGTGAGCATCTAGACCTTCAACAGCAGCCAGATCCATCACT
 GCTTGCCAATATGTTTCAGTCCCTCAGGAGTTACGTCTTGTGAAGTGATGAACTT
 CTGGAAGGTTGCAGTGTTAACTCCGCTGTATTGACGGGCATATCCGTACGTTGGC
 AAAGTGTGGTTGGTACCGGAGGAGTAATCTCCACAACCTCTGGAGAGTAGGCA
 CCAACAAACACAGATCCAGCGTGTGTACTTGATCAACATAAGAAGAAGCATTCT

CGATTTGCAGGATCAAGTGTTCAGGAGCGTACTGATTGGACATTTCCAAAGCCTG
 CTCGTAGGTTGCAACCGATAGGGTTGTAGAGTGTGCAATACACTTGCGTACAATTT
 CAACCCTTGGAACACTGCACAGCTTGGTTGTGAACAGCATCTTCAATTCTGGCAAG
 CTCCTTGTCTGTCATATCGACAGCCAACAGAATCACCTGGGAATCAATACCATGTT
 CAGCTTGAGACAGAAGGTCTGAGGCAACGAAATCTGGATCAGCGTATTTATCAGC
 AATAACTAGAACTTCAGAAGGCCAGCAGGCATGTCAATACTACACAGGGCTGAT
 GTGTCATTTTGAACCATCATCTTGGCAGCAGTAACGAACTGGTTTCCTGGACCAA
 ATATTTTGTACACTTAGGAACAGTTTCTGTTCGGTAAGCCATAGCAGCTACTGCC
 TGGGCGCCTCTGTAGCAGATACTTAGCACCAACCTTGTGGGCAACGTAGA
 TGACTTCTGGGGTAAGGGTACCATCCTTCTTAGGTGGAGATGCAAAAACAATTC
 TTTGCAACCAGCAACTTTGGCAGGAACCCAGCATCAGGGAAAGTGGAAAGGCAG
 AATTGCGGTTCCACCAGGAATATAGAGGCCAACTTTCTCAATAGGTCTTGCAAAA
 CGAGAGCAGACTACACCAGGGCAAGTCTCAACTTGCAACGTCTCCGTTAGTTGA
 GCTTCATGGAATTTCTGACGTTATCTATAGAGAGATCAATGGCTCTCTTAACGTTA
 TCTGGCAATTGCATAAGTTCCTCTGGGAAAGGAGCTTCTAACACAGGTGTCTTCA
 AAGCGACTCCATCAAACCTTGGCAGTTAGTTCTAAAAGGGCTTTGTCACCATTTG
 ACGAACATTGTGACAATTGGTTTACTAATTCATAATCTGTTCCGTTTTCTGGAT
 AGGACGACGAAGGGCATCTTCAATTTCTGTGAGGAGGCCTTAGAAAACGTCAATT
 TTGCACAATTCAATACGACCTTCAGAAGGGACTTCTTTAGGTTTGGATTCTCTTT
 AGGTTGTTCTTGGTGTATCCTGGCTTGGCATCTCCTTTCTTCTAGTGACCTTTAG
 GGACTTCATATCCAGGTTTCTCTCCACCTCGTCCAACGTCACACCGTACTTGGCAC
 ATCTAACTAATGCAAAATAAAATAAGTCAGCACATTCCCAGGCTATATCTTCCTTG
 GATTTAGCTTCTGCAAGTTCATCAGCTTCCTCCCTAATTTTAGCGTTCAACAAAAC
 TTCGTCGTCAAATAACCGTTTTGGTATAAGAACCTTCTGGAGCATTGCTCTTACGAT
 CCCACAAGGTGGCTTCCATGGCTCTAAGACCCTTTGATTGGCCAAAACAGGAAGT
 GCGTTCCAAGTGACAGAAACCAACACCTGTTTGTTCACCACAAATTTCAAGCA
 GTCTCCATCACAATCCAATTCGATACCCAGCAACTTTTGAGTTGCTCCAGATGTAG
 CACCTTTATACCACAAACCGTGACGACGAGATTGGTAGACTCCAGTTTGTGTCCTT
 ATAGCCTCCGGAATAGACTTTTTGGACGAGTACACCAGGCCAACGAGTAATTAG
 AAGAGTCAGCCACCAAAGTAGTGAATAGACCATCGGGGCGGTGAGTAGTCAAAG
 ACGCCAACAAAATTTCACTGACAGGGAACTTTTGACATCTCAGAAAGTTCGTA
 TTCAGTAGTCAATTGCCGAGCATCAATAATGGGGATTATACCAGAAGCAACAGTG
 GAAGTCACATCTACCAACTTTGCGGTCTCAGAAAAAGCATAAACAGTTCTACTAC

CGCCATTAGTGAAACTTTTCAAATCGCCCAGTGGAGAAGAAAAAGGCACAGCGA
TACTAGCATTAGCGGGCAAGGATGCAACTTTATCAACCAGGGTCTATAGATAACC
CTAGCGCCTGGGATCATCTTTGGACAACCTTTTCTGCCAAATCTAGGTCCAAAAT
CACTTCATTGATACCATTATTGTACAACCTTGAGCAAGTTGTTCGATCAGCTCCTCAA
ATTGGTCTCTGTAAACGGATGACTCAACTTGACATTAACCTGAAGCTCAGTCGCAT
TGAGTGAACCTTGATCAGGTTGTGCAGCTGGTCAGCAGCATAGGGAAACACGGCT
TTTCTACCAAACCTCAAGGAATTATCAAACCTCTGCAACACTTGCGTATGCAGGTA
GCAAGGGAAATGTCATACTTGAAGTCGGACAGTGAGTGTAGTCTTGAGAAATTCT
GAAGCCGTATTTTTATTATCAGTGAGTCAGTCATCAGGAGATCCTCTACGCCGGAC
GCATCGTGGCCGACCTGCAGGGGGGGGGGGCGCTGAGGTCTGCCTCGTGAAG
AAGGTGTTGCTGACTCATACCAGGCCTGAATCGCCCCATCATCCAGCCAGAAAAGT
GAGGGAGCCACGGTTGATGAGAGCTTTGTTGTAGGTGGACCAGTTGGTGATTTTG
AACTTTTGCTTTGCCACGGAACGGTCTGCGTTGTTCGGGAAGATGCGTGATCTGAT
CCTTCAACTCAGCAAAAAGTTTCGATTTATTCAACAAAGCCGCCGTTCCCGTCAAGTC
AGCGTAATGCTCTGCCAGTGTTACAACCAATTAACCAATTCTGATTAGAAAAACTC
ATCGAGCATCAAATGAACTGCAATTTATTCATATCAGGATTATCAATACCATATTT
TTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACCTACCGAGGCAGTTCATAG
GATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCGTCCAACATCAATACAAC
CTATTAATTTCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTG
ACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAAAGCTTATGCATTTCTTTCCAGACTTGTT
CAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAATCACTCGCATCAACCAAACCGTT
ATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACGCGATCGCTGTTAAAAGGA
CAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCA
ACAATATTTTACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATACCTGGAATGCTGTTTTCCCG
GGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTGA
TGGTTCGGAAGAGGCATAAATCCGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTA
ACATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACCTCTGGCGCATCGG
GCTTCCCATACAATCGATAGATTGTTCGCACCTGATTGCCCGACATTATCGCGAGCC
CATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTTAATCGCGGCCCGAGCAA
GACGTTTTCCCGTTGAATATGGCTCATAACACCCCTTGTTACTGTTTATGTAAGCA
GACAGTTTTATTGTTTCATGATGATATATTTTATCTTGTGCAATGTAACATCAGAGAT
TTTGAGACACAACGTGGCTTTCCCCCCCCCCCCCTGCAGGTTCGGCATCACCGGCGC
CACAGGTGCGGTTGCTGGCGCCTATATCGCCGACATCACCGATGGGGAAGATCGG

GCTCGCCACTTCGGGCTCATGAGCGCTTGTTTCGGCGTGGGTATGGTGGCAGGCC
CCGTGGCCGGGGGACTGTTGGGGCGCCATCTCCTTGCAATGCACCATTCTTGCGGC
GGCGGTGCTCAACGGCCTCAACCTACTACTGGGCTGCTTCTAATGCAGGAGTCG
CATAAGGGAGAGCGTCGAGTATCTATGATTGGAAGTATGGGAATGGTGATACCCG
CATTCTTCAGTGTCTTGAGGTCTCCTATCAGATTATGCCCAACTAAAGCAACCGGA
GGAGGAGATTTATGGTAAATTTCTCTGACTTTTGGTCATCAGTAGACTCGAACTG
TGAGACTATCTCGTTATGACAGCAGAAATGTCCTTCTTGAGACAGTAAATGAA
GTCCCACCAATAAAGAAATCCTTGTTATCAGGAACAACTTCTTGTTTCGAACTTT
TTCGGTGCCTTGAACATAAAATGTAGAGTGGATATGTCGGGTAGGAATGGAGCG
GGCAAATGCTTACCTTCTGGACCTTCAAGAGGTATGTAGGGTTTGTAGATACTGAT
GCCAACTTCAGTGACAACGTTGCTATTTCTGTTCAAACCATTCCGAATCCAGAGAA
ATCAAAGTTGTTTGTCTACTATTGATCCAAGCCAGTGCGGTCTTGAACTGACAAT
AGTGTGCTCGTGTGTTTGGAGTCATCTTGTATGAATAAATCTAGTCTTTGATCTAAA
TAATCTTGACGAGCCAAGGCGATAAATACCCAAATCTAAACTCTTTTAAAACGTT
AAAAGGACAAGTATGTCTGCCTGTATTAACCCCAAATCAGCTCGTAGTCTGATC
CTCATCAACTTGAGGGGCACTATCTTGTTTTAGAGAAATTTGCGGAGATGCGATAT
CGAGAAAAAGGTACGCTGATTTTAAACGTGAAATTTATCTCAAGATCTCTGCCTC
GCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACG
GTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCG
TCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGCGGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGAT
AGCGGAGTGTACTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGT
GCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATC
AGGCGCTCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCCGGCTGC
GGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGG
GGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACC
GTAAAAAGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCA
TCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAG
ATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTG
CCGTTACCGGATACCTGTCCGCCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCA
ATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCCGCTCCAAGCTGGGCT
GTGTGCACGAACCCCCGTTTCAGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGTAACCTATCG
TCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGT
AACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGG

TGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGA
AGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCA
CCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAA
AGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAC
GAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCT
AGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAA
CTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGT
CTATTCGTTTCATCCATAGTTGCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGG
GAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCAC
CGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAA
GTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCT
AGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTGCAG
GCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAA
CGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCT
TCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATGGTT
ATGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTG
ACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTT
GCTCTTGCCCGGCGTCAACACGGGATAATACCGGCCACATAGCAGAACTTTAAA
AGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCG
CTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACCTGATCTTCAGCATC
TTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGC
AAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTT
CAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAA
TGTATTTAGAAAAATAAACAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGC
CACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGGCTA
TCACGAGGCCCTTTCGTCTTCAAGAATTAATTCTCATGTTGACAGCTTATCATCG
ATAAGCTGACTCATGTTGGTATTGTGAAATAGACGCAGATCGGGAACACTGAAAA
ATAACAGTTATTATTCG

BM20220716