

公司产品仅供科学研究使用、不得用于临床诊断！

商品属性：

产品名称	规格	货号
pPIC9K Seamless Cloning Kit (线性化质粒)	20 μ l	P-PR1230

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 α 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 α 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 α -Factor-F:TACTATTGCCAGCATTGCTGC

AOX1-R:GCAAATGGCATTCTGACATCC

(3) pPIC9K 线性化载体为 EcoRI 酶切后的线性化载体。

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/ μ l)	1 μ l
pPIC9K 线性化载体 (50ng/ μ l)	1 μ l
2 \times Seamless Cloning Mix	5 μ l
补水至总体积	10 μ l

(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，片段用量可增加至载体的 5 倍量。如果片段较多，可适当增大体系，如 20 μ l。

(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。