

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
pET-28a(+) Seamless Cloning Kit (线性化质粒)	20 μl	P-PR1227

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EcoR I 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EcoR I 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CTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTCTCGAGTCA（不需要3'端HIS标签时）

通过无缝克隆连接到pET-28a(+)中。

(1) 测序引物

T7: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

T7t: 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'

(2) pET-28a(+)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/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，片段用量可增加至载体的 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。

www.pyram.cn