

**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-32a(+) Seamless Cloning Kit (线性化质粒)	20 μl	P-PR1228

**保存条件：** -20℃保存

**产品介绍：** pET-32a(+)载体为高水平的原核表达载体，在 N 端含有 TrxA(Trx-tag, 硫氧还蛋白 标签)有利于蛋白的可溶性表达。pET-32a(+)在 N 端还含有 His-Tag, Thrombin (凝血酶) 酶切位点, S-Tag, Enterokinase(肠激酶)酶切位点, 在 C 端具有 His-Tag。本产品提供 pET-32a(+)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-32a(+) 载体为原核表达载体，具有 N-TrxA, N-His, N-Thrombin, N-S, N-Enterokinase 和 C-His。
2. pET-32a(+)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-32a(+)线性化载体使用方法：

(1) pET-32a(+)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：GTACCGACGACGACGACAAGGCCATG

下游引物 5' 端添加序列：CTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTCTCGAG

通过无缝克隆连接到 pET-32a(+)中。

(2) 测序引物

PET-32A-SEQR: 5'-CTGGTTCTGGCCATATGCAC-3' T7t: 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3' (3) pET-32a(+)线性化载体为 EcoR I 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-32a 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℃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℃。

**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℃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。

