



# pGEM-3ZEVL Seamless Cloning Kit

产品组成	CL121-01
pGEM-3ZEVL 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:

pGEM-3ZEVL 为克隆载体, 载体骨架小, 连接效率高, 具有氨苄青霉素抗性。本产品提供经 EcoRV 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. pGEM-3ZEVL 为克隆载体, 载体骨架小, 连接效率高。
2. pGEM-3ZEVL 载体具有氨苄青霉素抗性。
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。

## 操作步骤:

1. pGEM-3ZEVL 线性化载体使用方法:

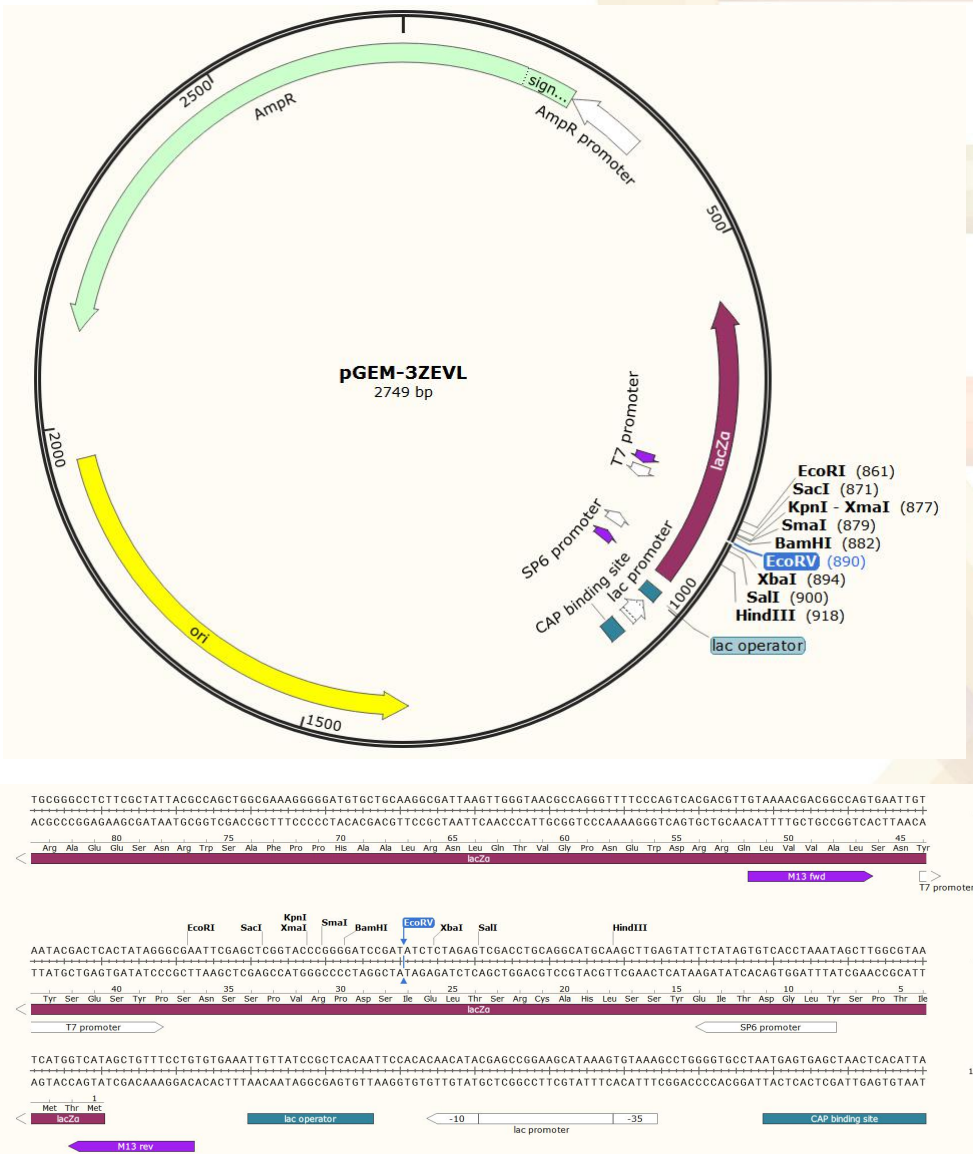
- (1) pGEM3ZEVL 当做克隆载体使用, 可以在扩增 PCR 产物的上游引物 5'端添加序列: TCGGTACCCGGGGATCCGAT, 下游引物 5'端添加序列: TGCAGGTGCTACTAGAGAT, 就可以通过无缝克隆连接到 pGEM3ZEVL 中。

(2) 测序引物:

M13F: GTAAAACGACGGCCAGT

M13R: CAGGAAACAGCTATGAC

(3) pGEM-3ZEVL 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/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
pGEM-3ZEVL 线性化载体 (50ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
2×Seamless Cloning Mix	5 $\mu$ l
补水至总体积	10 $\mu$ 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，片段用量可增加到载体的 5 倍量。如果片段较多，可适当增大体系，如 20 $\mu$ 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

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。

#### pGEM-3ZEVL 载体序列

>pGEM-3ZEVL

```
ATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTC
GGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACT
CGTGCACCCAACCTGATCTTCAGCATCTTTACTTTCCACAGCGTTTCTGGGTGAGCAA
AAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGCGCACACGGAAATGTTGA
ATACTCATACTCTTCCTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTATTGTCTCATGA
GCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAATAGGGGTTCCGCGCACATTT
CCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAA
AAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCTGTCTCGCGCGTTTCGGTGTATGACGGTGAAAAC
CTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGCTGTAAAGCGGATGCCGGG
AGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTCCGGGCTGGCTT
AACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTAAGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATAC
CGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCCATTCGCCATTGAGGCTGC
GCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGA
AAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTCCAGCTCAC
GACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTCGA
```

GCTCGGTACCCGGGGATCCGAT\*\*\*ATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTG  
AGTATTCTATAGTGTCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTTCTGTG  
TGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTA  
AAGCCTGGGGTGCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCC  
CGTTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCTGTCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCG  
GGGAGAGGCGGTTTTCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGC  
GCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGGCAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTT  
ATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAA  
AGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCC  
CTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGA  
CTATAAGATAACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGA  
CCCTGCCGTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGCGCTTTCT  
CATAGCTACGCTGTAGGTATCTCAGTTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCT  
GTGTGCACGAACCCCGTTAGCCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAACTATCGTCT  
TGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAAACAG  
GATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAAC  
TACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCT  
TCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTG  
GTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATC  
CTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGAT  
TTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTTAAATTAATAATGAA  
GTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAA  
TCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTC  
CCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAA  
TGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGC  
CGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATT  
AATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTG  
TTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTCAGC  
TCCGGTTCCTAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGG  
TTAGTCTCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAAGTTGGCCGCAGTGTATCACTC  
ATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTCTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCT  
GTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTT  
GCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGG

BM20220718