



pET-22b(+) Seamless Cloning Kit

产品信息：

产品组成	CL130-01
pET-22b(+)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：

pET-22b(+)载体为高水平的原核表达载体，在 N 端含有 PelB 信号肽序列，能够将表达的目的蛋白定位在细胞外周质腔，同时在 C 端具有 His 标签。本产品提供 pET-22b(+)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. pET-22b(+)载体为原核表达载体，具有 N-PelB signal sequence 和 C-His 标签。
2. pET-22b(+)经 EcoRI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-22b(+)线性化载体使用方法：

(1) pET-22b(+)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：CGCTGCCCAGCCGCGCATGGCCATG

下游引物 5'端添加序列：CTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTCTCGAG

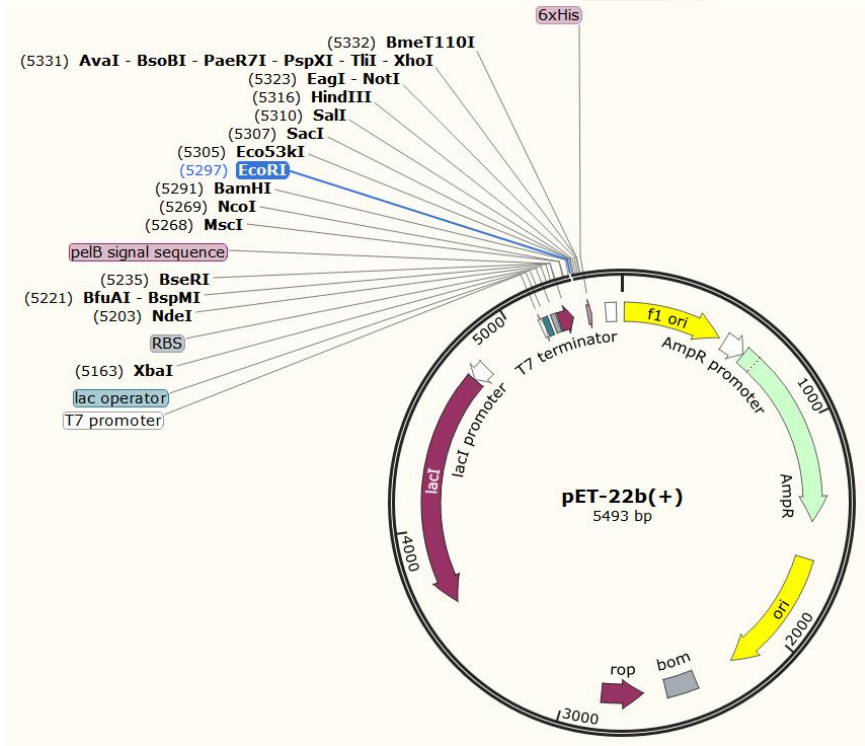
通过无缝克隆连接到 pET-22b(+)中。

(2) 测序引物

T7: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

T7t: 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'

(3) pET-22b(+)-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)	1 μl
pET-22b(+)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。

pET-22b(+)载体序列：

>pET-22b(+)

TGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTAC
 GCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCCTCCTTTCGCTTCTTC
 CCTTCCCTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAAGCTCTAAATCGGGGGCTCC
 CTTTAGGGTTCGATTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGG
 TGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTGACGTTG
 GAGTCCACGTTCTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTA
 TCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTGCCGATTCGGCCTATTGGTTAAAA
 ATGAGCTGATTAAACAAAAATTAACGCGAATTTAAACAAAATATTAACGTTTACAATT
 TCAGGTGGCACTTTTCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTATTTTTCTAAAT
 ACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTG
 AAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTTGCGG
 CATTTTGCTTCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGA
 AGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGAT

CCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTG
 CTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCA
 TACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTAC
 GGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACT
 GCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTG
 CACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAA
 GCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTG
 CGAAACTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTG
 GATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCCTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTG
 GTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCA
 CTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGG
 CAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCA
 TTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTT
 TTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTT
 AACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTT
 CTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACACCGCT
 ACCAGCGGTGGTTTGGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAC
 GGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCC
 ACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCA
 GTGGCTGCTGCCAGTGCGGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGT
 TACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCT
 TGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCG
 CCACGCTTCCCGAAGGGGAGAAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGA
 ACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCT
 GTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGC
 GGAGCCTATGGAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTACGGTTCTTGCCCTTTTGCTG
 GCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTAC
 CGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTC
 AGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGC
 GGTATTTACACCGCATATATGGTGCCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAG
 TTAAGCCAGTATACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGGTCATGGCTGCGCCCCGACA
 CCCGCCAACCCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGCTGCTCCCGGCATCCGCTTAC
 AGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGTTTTTACCCTCATCA

CCGAAACGCGGAGGCAGCTGCGGTAAAGCTCATCAGCGTGGTCGTGAAGCGATTCA
CAGATGTCTGCCTGTTCATCCGCGTCCAGCTCGTTGAGTTTCTCCAGAAGCGTTAATGT
CTGGCTTCTGATAAAGCGGGCCATGTTAAGGGCGTTTTTCTCTGTTTGGTCACTGATG
CCTCCGTGTAAGGGGGATTTCTGTTCATGGGGTAATGATACCGATGAAACGAGAGAG
GATGCTCACGATACGGGTACTGATGATGAACATGCCCGGTTACTGGAACGTTGTGAG
GGTAAACAACCTGGCGGTATGGATGCGGCGGGACCAGAGAAAAATCACTCAGGGTCAA
TGCCAGCGCTTCGTTAATACAGATGTAGGTGTTCCACAGGGTAGCCAGCAGCATCCTG
CGATGCAGATCCGGAACATAATGGTGCAGGGCGCTGACTTCCGCGTTTTCCAGACTTTA
CGAAACACGGAAACCGAAGACCATTTCATGTTGTTGCTCAGGTCGCAGACGTTTTGCA
GCAGCAGTCGCTTACGTTTCGCTCGCGTATCGGTGATTCATTCTGCTAACCCAGTAAGG
CAACCCCGCCAGCCTAGCCGGGTCTCAACGACAGGAGCACGATCATGCGCACCCCGT
GGGGCCGCCATGCCGGCGATAATGGCCTGCTTCTCGCCGAAACGTTTGGTGGCGGGA
CCAGTGACGAAGGCTTGAGCGAGGGCGTGCAAGATTCCGAATACCGCAAGCGACAG
GCCGATCATCGTCGCGCTCCAGCGAAAGCGGTCTCGCCGAAAATGACCCAGAGCGC
TGCCGGCACCTGTCCTACGAGTTGCATGATAAAGAAGACAGTCATAAGTGCGGCGAC
GATAGTCATGCCCCGCGCCACCGGAAGGAGCTGACTGGGTTGAAGGCTCTCAAGGG
CATCGGTGAGATCCCGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTTACATTAATTGCGTTGCGCT
CACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCA
ACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCCAGGGTGGTTTTTCTTTTCACCA
GTGAGACGGGCAACAGCTGATTGCCCTTACCCGCTGGCCCTGAGAGAGTTGCAGCA
AGCGGTCCACGCTGGTTTGGCCCAGCAGGCGAAAATCTGTTTGATGGTGGTTAACG
GCGGGATATAACATGAGCTGTCTTCGGTATCGTCGTATCCACTACCGAGATATCCGCA
CCAACGCGCAGCCCCGACTCGGTAATGGCGCGCATTGCGCCCAGCGCCATCTGATCGT
TGGCAACCAGCATCGCAGTGGGAACGATGCCCTCATTACGATTTGCATGGTTTTGTTG
AAAACCGGACATGGCACTCCAGTCGCCTTCCCGTTCGCTATCGGCTGAATTTGATTG
CGAGTGAGATATTATGCCAGCCAGCCAGACGCAGACGCGCCGAGACAGAACTTAAT
GGGCCCGCTAACAGCGGATTTGCTGGTGACCCAATGCGACCAGATGCTCCACGCC
AGTCGCGTACCGTCTTCATGGGAGAAAATAACTGTTGATGGGTGTCTGGTCAGAGA
CATCAAGAAATAACGCCGGAACATTAGTGCAGGCAGCTTCCACAGCAATGGCATCCTG
GTCATCCAGCGGATAGTTAATGATCAGCCACTGACGCGTTGCGCGAGAAGATTGTGC
ACCGCCGCTTACAGGCTTCGACGCCGCTTCGTTCTACCATCGACACCACCAGCTGG
CACCCAGTTGATCGGCGCGAGATTTAATCGCCGCGACAATTTGCGACGGCGCGTGCAG
GGCCAGACTGGAGGTGGCAACGCCAATCAGCAACGACTGTTTGCCCGCCAGTTGTTG

TGCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAGCTCCGCCATCGCCGCTTCCACTTTTTCCCGC
GTTTTCGCAGAAACGTGGCTGGCCTGGTTACACCACGCGGGAAACGGTCTGATAAGAG
ACACCGGCATACTCTGCGACATCGTATAACGTTACTGGTTTTACATTACCACCCTGAA
TTGACTCTCTTCCGGGCGCTATCATGCCATAACGCGAAAGGTTTTGCGCCATTGATGG
TGTCGGGATCTCGACGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGCATTAGGAAGCAGCCCAGTA
GTAGGTTGAGGCCGTTGAGCACCGCCGCCAAGGAATGGTGCATGCAAGGAGATGG
CGCCAACAGTCCCCGGCCACGGGGCTGCCACCATACCCACGCCGAAACAAGCGC
TCATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCCATCTTCCCCATCGGTGATGTCGGCGATATAGGC
GCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGATGCCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGAG
GATCGAGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGG
ATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTGTTAACTTTAAGAAGGAGATACATATGAA
ATACCTGCTGCCGACCGCTGCTGCTGGTCTGCTGCTCCTCGCTGCCAGCCGGCGATG
GCCATGGATATCGGAATTAATTCGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGG
CCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAA
AGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGG
CCTCTAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTGGCTGAAAGGAGGAACTATATCCGGAT

BM20220716