

pcDNA3.1(+)[®] Seamless Cloning Kit



| | |
|---|----------|
| 产品组成 | CL140-01 |
| pcDNA3.1(+) [®] 线性化载体 (50 ng/μl) | 20 μl |
| 2×Seamless Cloning Mix | 100 μl |

保存条件: -20℃保存

产品介绍:

pcDNA3.1(+)[®]载体为哺乳动物细胞表达载体, 具有人巨细胞病毒(CMV)启动子, 在哺乳动物细胞中高水平表达; 新霉素抗性基因, 用于选择稳定细胞系。本产品提供 pcDNA3.1(+)[®]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. pcDNA3.1(+)[®]具有人巨细胞病毒(CMV)启动子, 在哺乳动物细胞中高水平表达。
2. pcDNA3.1(+)[®]具有新霉素抗性基因, 用于选择稳定细胞系。
3. pcDNA3.1(+)[®]经 EcoRI酶切后的线性化载体, 省时省力。
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. pcDNA3.1(+)[®]线性化载体使用方法:

(1) pcDNA3.1(+)[®]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: TAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGC**gccacc** (**gccacc** 为 Kozak 序列)

下游引物 5'端添加序列: CACTGTGCTGGATATCTGCAGAATTC

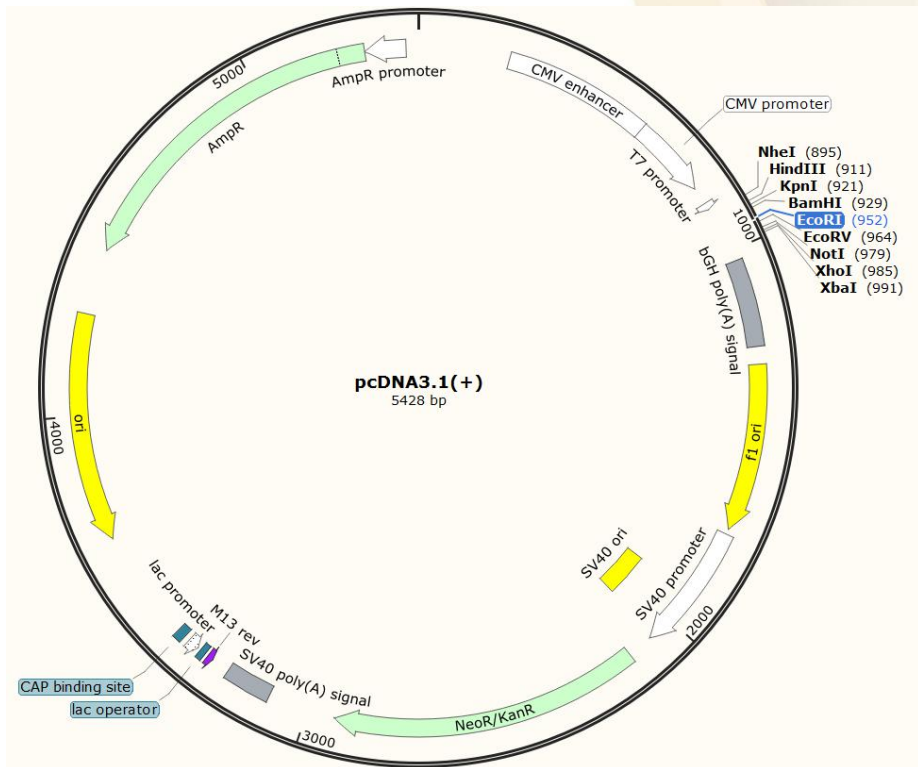
通过无缝克隆连接到 pcDNA3.1(+)[®]中。

(2) 测序引物

pcDNA3.1-F:CTAGAGAACCCACTGCTTAC

pcDNA3.1-R(BGH-R):TAGAAGGCACAGTCGAGG

(3) pcDNA3.1(+)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 |
| pcDNA3.1(+)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 20 μl。

(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。

pcDNA3.1(+)载体序列：

>pcDNA3.1 (+)

```
GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTGCCTCTCAGTACAATCTGCTCT
GATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGA
GTAGTGCGGAGCAAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTG
CATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGCC
AGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGG
TCATTAGTTCATAGCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTACGGTAAATGGC
CCGCTTGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATG
TTCCCATAGTAACGCAATAGGGACTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTA
```

CGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCC
TATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAAGTACATGACCT
TATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGG
TGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGG
ATTTCCAAGTCTCCACCCCAATTGACGTCAATGGGAGTTTTGTTTTGGCACCAAATC
AACGGGACTTTCAAAATGTCGTAACAACCTCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGG
TAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAA
CCCCTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGC
TGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGT
GGTGAATTCGTCAGATATCCAGCACAGTGGCGCCGCTCGAGTCTAGAGGGGCC
GTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGT
TTGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTT
CCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCAATCTATTCTG
GGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAG
GCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTG
GGGCTCTAGGGGTATCCCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATAAGCGCGGCGGGT
GTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTC
CTTTCGCTTCTCCCTTCCTTCTCAGCCAGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCT
CTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTACGGCACCTCGACCC
CAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACG
GTTTTTCGCCCTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTAAATAGTGGACTCTTGTCCA
AACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTATAAGGGATTTT
GCCGATTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTAACGCGA
ATTAATCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCAGGCTCCCCA
GCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGA
AAGTCCCAGGCTCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGT
CAGCAACCATAGTCCCAGCCCTAACTCCGCCCATCCCAGCCCTAACTCCGCCAG
TTCCGCCATTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTATGAGAGGCCGA
GGCCGCTCTGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGC
CTAGGCTTTTGAAAAAGCTCCCAGGAGCTTGTATATCCATTTTCGGATCTGATCA
AGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGT
TCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAA
TCGGCTGCTCTGATGCCCGCTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGTTCT

TTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGC
GCGGTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTT
GTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGAT
CTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAAT
GCGGGCGCTGCATACGCTTGATCCGGTACCTGCCATTGACCACCAAGCGAAA
CATCGCATCGAGCGAGCACGTACTIONCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATG
ATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCCGCCAGGCTCA
AGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTT
GCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTATCGACTGTGGCCGGC
TGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGA
AGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCT
CCCGATTGCGAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGG
ACTCTGGGGTTCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCAACCTGCCATCACGAGAT
TTCGATTCCACCGCCGCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGA
CGCCGGCTGGATGATCCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCCAC
CCCAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAA
TTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCAT
CAATGTATCTTATCATGTCTGTATACCGTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATC
ATGGTCATAGCTGTTTCCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACA
TACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACT
CACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTGCTGC
CAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCATTTGGGC
GCTCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGGCTGCGGGC
AGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGAT
AACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAA
AAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAC
AAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAC
CAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGC
TTACCGGATACCTGTCCGCCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGC
TCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTG
TGCACGAACCCCCGTTACGCCCAGCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTT
GAGTCCAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAAC
AGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGG

CCTAACTACGGCTACACTAGAAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGC
CAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCG
CTGGTAGCGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATC
TCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAAC
TCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTACAAAAGGATCTTCACCTAGATCCT
TTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTC
TGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTT
GTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGC
TTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTC
CAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTC
CTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTA
AGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGT
GGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAA
GGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCC
TCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAG
CACTGCATAATTCTCTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTG
AGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTG
CCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTC
ATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCCTGTTGA
GATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACT
TTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAA
GGGAATAAGGGCGACACGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATT
ATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTT
AGAAAAATAACAAATAGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTG
ACGTC

BM20220716