



pET-32a(+) Seamless Cloning Kit

产品组成	CL132-01
pET-32a(+)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：

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 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。

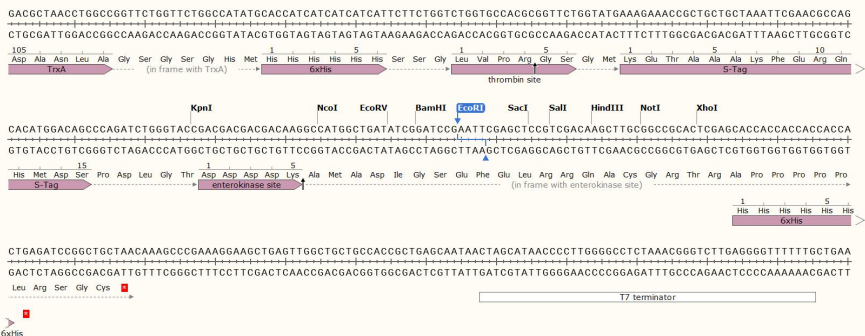
无缝克隆技术可在重组酶的作用下，只需一步反应，便可将片段克隆到任何载体中的任意位置，得到重组质粒。无缝克隆技术作为一种非常强大的克隆技术，具有快速、简便、高效、多片段组装和定向克隆等特点，用于单个 DNA 片段的克隆，多个 DNA 片段组装克隆以及多位点突变构建等实验目的。

产品特点：

1. pET-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 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-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



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 20 μ l。

(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。

pET-32a(+)载体序列:

>pET-32a(+)

TGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGGCGGGTGTGGTGGT

TACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCT
TTCTTCCCTTCCCTTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCG
GGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCCAAAAA
CTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCG
CCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGA
ACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATT
TCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAA
CAAAATATTAACGTTTACAATTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGA
ACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAAT
AACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACAT
TTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCCTTCCTGTTTTTGCTCAC
CCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTG
GGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCG
AAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTA
TCCCGTATTGACGCCGGGAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGA
ATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGAC
AGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAAC
TTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGACAACA
TGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCAT
ACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCG
CAAACATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAAGACT
GGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTG
GCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATT
GCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGG
GGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTC
ACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGA
TTTAAACTTCATTTTAAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCT
CATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTA
GAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTT
GCAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCT
ACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACT
GTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGC
CTACATACCTCGCTCTGCTAATCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAG

TCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGT
CGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGAGCGAACGACCTACA
CCGAAGTGAATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAG
GGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGC
ACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTC
GCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCT
ATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCT
TTTGCTCACATGTTCTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACC
GCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAG
TCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATC
TGTGCGGTATTTACACCCGCATATATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATG
CCGCATAGTTAAGCCAGTATACACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGGTCATGGCTG
CGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGCTGCTCC
CGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAG
GTTTTCACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGGCAGCTGCGGTAAAGCTCATCAGC
GTGGTCGTGAAGCGATTACAGATGTCTGCCTGTTTCATCCGCGTCCAGCTCGTTG
AGTTTCTCCAGAAGCGTTAATGTCTGGCTTCTGATAAAGCGGGCCATGTTAAGGG
CGGTTTTTCTGTTTGGTCACTGATGCCTCCGTGTAAGGGGATTCTGTTTCATG
GGGGTAATGATACCGATGAAACGAGAGAGGATGCTCACGATACGGGTTACTGATG
ATGAACATGCCCGTTACTGGAACGTTGTGAGGGTAAACAACCTGGCGGTATGGAT
GCGGCGGGACCAGAGAAAAATCACTCAGGGTCAATGCCAGCGCTTCGTTAATAC
AGATGTAGGTGTTCCACAGGGTAGCCAGCAGCATCCTGCGATGCAGATCCGGAAC
ATAATGGTGAGGGCGCTGACTTCCGCGTTTCCAGACTTTACGAAACACGGAAAC
CGAAGACCATTTCATGTTGTTGCTCAGGTCGCAGACGTTTTGCAGCAGCAGTCGCT
TCACGTTTCGCTCGCGTATCGGTGATTCTGCTAACCAGTAAGGCAACCCCGCC
AGCCTAGCCGGTCTCAACGACAGGAGCACGATCATGCGCACCCGTGGGGCCG
CCATGCCGGCGATAATGGCCTGCTTCTCGCCGAAACGTTTGGTGGCGGGACCACT
GACGAAGGCTTGAGCGAGGGCGTGCAAGATTCCGAATACCGCAAGCGACAGGCC
GATCATCGTCGCGCTCCAGCGAAAGCGGTCTCGCCGAAAATGACCCAGAGCGC
TGCCGGCACCTGTCTACGAGTTGCATGATAAAGAAGACAGTCATAAGTGCGGCG
ACGATAGTCATGCCCCGCGCCACCGGAAGGAGCTGACTGGGTGAAGGCTCTC
AAGGGCATCGGTGAGATCCCGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTTACATTAATTG

CGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTA
ATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGTATTGGGCGCCAGGGTGG
TTTTCTTTTCACCACTGAGACGGGCAACAGCTGATTGCCCTTCACCGCCTGGCC
CTGAGAGAGTTGCAGCAAGCGGTCCACGCTGGTTTGCCCCAGCAGGCGAAAATC
CTGTTTGATGGTGGTTAACGGCGGGATATAACATGAGCTGTCTTCGGTATCGTCGT
ATCCCACTACCGAGATGTCCGCACCAACGCGCAGCCCGGACTCGGTAATGGCGCG
CATTGCGCCCAGCGCCATCTGATCGTTGGCAACCAGCATCGCAGTGGGAACGATG
CCCTCATTCAGCATTTGCATGGTTTGTGAAAACCGGACATGGCACTCCAGTCGC
CTTCCCGTTCGCTATCGGCTGAATTTGATTGCGAGTGAGATATTTATGCCAGCCA
GCCAGACGCAGACGCGCCGAGACAGAACTTAATGGGCCCCGCTAACAGCGCGATT
TGCTGGTGACCCAATGCGACCAGATGCTCCACGCCAGTCGCGTACCGTCTTCAT
GGGAGAAAATAATACTGTTGATGGGTGTCTGGTCAGAGACATCAAGAAATAACGC
CGGAACATTAGTGAGGCAGCTTCCACAGCAATGGCATCCTGGTCATCCAGCGGA
TAGTTAATGATCAGCCCACTGACGCGTTGCGCGAGAAGATTGTGCACCGCCGCTT
TACAGGCTTCGACGCCGCTTCGTTCTACCATCGACACCACCACGCTGGCACCCAG
TTGATCGGCGCGAGATTTAATCGCCGCGACAATTTGCGACGGCGCGTGCAGGGCC
AGACTGGAGGTGGCAACGCCAATCAGCAACGACTGTTTGCCCCGCCAGTTGTTGT
GCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAGCTCCGCCATCGCCGCTTCCACTTTTTCCCG
CGTTTTTCGAGAAACGTGGCTGGCCTGGTTTACCACGCGGGAAACGGTCTGATA
AGAGACACCGGCATACTCTGCGACATCGTATAACGTTACTGGTTTTCACATTCACCA
CCCTGAATTGACTCTCTTCCGGGCGCTATCATGCCATACCGCGAAAGTTTTGCGC
CATTGATGGTGTCCGGGATCTCGACGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGCATTAGGA
AGCAGCCCAGTAGTAGGTTGAGGCCGTTGAGCACCGCCGCCGCAAGGAATGGTG
CATGCAAGGAGATGGCGCCCAACAGTCCCCCGGCCACGGGGCCTGCCACCATAC
CCACGCCGAAACAAGCGCTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCCAT
CGGTGATGTCGGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGATGCC
GGCCACGATGCGTCCGGCGTAGAGGATCGAGATCGATCTCGATCCCGCGAAATTA
ATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAAT
TTTGTTTAACTTAAAGAAGGAGATATACATATGAGCGATAAAATTATTCACCTGACT
GACGACAGTTTTGACACGGATGTACTCAAAGCGGACGGGGCGATCCTCGTCGATT
TCTGGGCAGAGTGGTGCGGTCCGTGCAAAATGATCGCCCCGATTCTGGATGAAAT
CGCTGACGAATATCAGGGCAAACTGACCGTTGCAAACTGAACATCGATCAAAA

CCCTGGCACTGCGCCGAAATATGGCATCCGTGGTATCCCGACTCTGCTGCTGTTCA
AAAACGGTGAAGTGGCGGCAACCAAAGTGGGTGCACTGTCTAAAGGTCAGTTGA
AAGAGTTCCTCGACGCTAACCTGGCCGGTTCTGGTTCTGGCCATATGCACCATCAT
CATCATCATTCTTCTGGTCTGGTGCCACGCGTTCTGGTATGAAAGAAACCGCTGC
TGCTAAATTCGAACGCCAGCACATGGACAGCCCAGATCTGGGTACCGACGACGA
CGACAAGGCCATGGCTGATATCGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGC
GGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGC
CCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACC
CCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGAACTATA
TCCGGAT

BM20220718