达领生物

pET-28a Cloning Kit
pET-28a克隆构建试剂盒

目录号

DLV301

产品简介

本产品是以pET-28a载体为基础框架开发的克隆构建试剂盒。包含经标准化工艺制备的高质量线性化载体，提供已优化验证的同源序列，使用该产品无需进行载体线性化、载体纯化、同源臂设计与片段酶切，仅需一步即可将目的片段定向无缝克隆至pET-28a载体上，大幅简化了实验操作，提高了实验成功率。

产品组成

组分	规格
pET-28a-N Linear-Vector [a] (10 ng/μL)	20 μL
pET-28a-C Linear-Vector [b] (10 ng/μL)	20 μL
2× Cloning Mix	100 μL
N-Control Template [c]	10 μL
C-Control Template [d]	10 μL

a.pET-28a-N为N端含6×His标签的线性化载体，Kana抗性，线性化方式为EcoRI与XhoI酶切，大小5335 bp；

本产品仅供研究使用，不用于临床诊断。

b.pET-28a-C为C端含6×His标签的线性化载体，Kana抗性，线性化方式为NcoI与XhoI酶切，大小5265 bp；

c.pET-28a-N的阳性对照片段，大小为1 kb，用于检测连接效率；

d.pET-28a-C的阳性对照片段，大小为1 kb，用于检测连接效率。

产品应用

本产品适用于pET-28a载体为基础的原核表达实验。

产品特点

- 高效：载体构建成功率高达90%以上；
- 便捷：无需载体线性化等复杂操作，一步完成克隆构建；
- 快速：重组反应仅需5~15 min。

使用方法

1.片段准备

1)按照以下表格合成含接头的扩增引物：

扩增引物准备（5'→3'）		
pET-28a-N 扩增引物	F:	ATGGGTCGCGGATCCGAATTC+目的片段特异性F引物
	R:	GTGGTGGTGGTGGTGCTCGAG+目的片段特异性R引物
pET-28a-C 扩增引物	F:	TAAGAAGGAGATATACCATGGGC+目的片段特异性F引物
	R:	GTGGTGGTGGTGGTGCTCGAG+目的片段特异性R引物

注：扩增引物由两部分组成：固定序列+特异性引物。红色标记部分为酶切识别位点。

本产品仅供研究使用，不用于临床诊断。

2)使用上述引物进行目的片段PCR扩增；扩增产物需进行凝胶纯化（推荐使用达领DNA凝胶回收试剂盒（安全便捷型），目录号：DLN801）并电泳检测其质量和浓度；

注：若目的片段以质粒为模板扩增获得，为防止产生空载体背景，建议用DpnI消化去除质粒模板，消化完成后，80°C失活后再用于重组实验。

2.重组反应

1)取出试剂盒各组分于冰上解冻，待解冻完全后低速瞬时离心；

2)按照下表配制反应体系；

组分	用量
pET-28a-N/C Linear-Vector [a]	1 μL
2× Cloning Mix	5 μL
目的片段[b]	见标注
ddH_2O	Up to 10 μL

a.本产品使用前需明确6×His标签在目的片段上的N端还是C端，并选择合适的线性化载体；

b.目的片段投入量参考下表（载体与片段摩尔比约为1:2~1:5），使用阳性对照片段投入量为1 μL。

片段大小	投入量
＜1000 bp	见标注
1000~2000 bp	8~9 ng
2000~3000 bp	12~18 ng
＞3000 bp	见标注

注：根据载体与片段的摩尔比例为1:2~1:5，按照公式：目的片段用量（ng）=1.86×摩尔比例倍数×目的片段长度（kb）计算目的片段投入量（例：载体与片段的摩尔比例为1:3，目的片段长度为0.5 kb，目的片段用量=1.86×3×0.5=2.79 ng）。

本产品仅供研究使用，不用于临床诊断。

3)体系配制完成后，用移液枪轻轻吹打混匀，短暂瞬时离心将反应液收集至管底，50°C反应5~15 min。

注：若进行较长片段或复杂片段连接，可增加反应时间至45 min，反应建议在水浴锅或PCR仪上进行。

3.转化与鉴定

转化：按照相关感受态产品说明书操作；

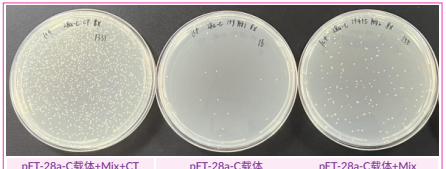
鉴定：推荐使用pET-28a-T7-F（TAATACGACTCACTATAGGG）及pET-28a-T7 ter-R（GCTAGTTATTGCTCAGCGG）进行菌落鉴定与测序。

注意事项

- 若想同时保留N端与C端His标签，请选择pET-28a-N载体并删除目的基因末端终止密码子；
- 当长菌数较少或克隆阳性率偏低时，主要可能原因是片段质量不佳导致的连接效率降低，推荐重新制备高质量片段，并电泳检测浓度与质量。

应用实例

使用pET-28a-C载体进行阳性与阴性对照实验，克隆效果如下图所示：阳性对照长斑数多，阴性对照长斑数非常少。由本实验可知，当片段质量较好时，本产品连接效率非常高（平板a）；当不加入片段（或片段质量不佳）时，本产品会增加空载转化率，导致克隆成功率降低（平板c）。

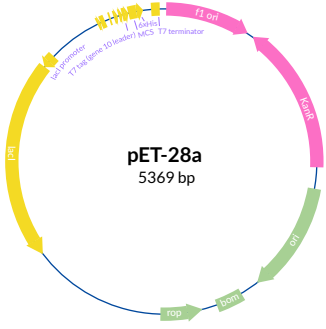


pET-28a-C载体+Mix+CT (a) | pET-28a-C载体 (b) | pET-28a-C载体+Mix (c)

图1.pET-28a-C载体阳性与阴性对照实验效果

本产品仅供研究使用，不用于临床诊断。

载体图谱



保存条件

-25~-15°C保存，保质期1年。≤0°C运输。

技术支持

本公司产品使用过程中如有任何疑问与建议，欢迎随时与我们联系：product@tsingke.com.cn。

本产品仅供研究使用，不用于临床诊断。

关联产品推荐

产品名称	货号	应用
FlashPure快速质粒小提试剂盒	DLN702	适用于1~5 mL菌液质粒DNA快速提取
T8高保真PCR预混液	DLP201	适用于基因组、cDNA、噬菌体、质粒等样品的扩增
DNA凝胶回收试剂盒（安全便捷型）	DLN801	适用于PCR产物直接回收、DNA片段的凝胶回收、酶切产物的凝胶回收等
T5菌P专家	DLP102	适用于克隆鉴定、以微生物为模板的直接扩增实验
BL21(DE3)感受态细胞	DLC201	适用于含有T7启动子的高效表达载体
Trelief ® 5α感受态细胞	DLC101	适用于常规克隆、蓝白斑筛选等实验

扫码关注

抖音 | 微信公众号 | 小红书

地址：鄂州市葛店开发区建设大道216号东湖高新智慧城7栋

1.1.2V301.2409