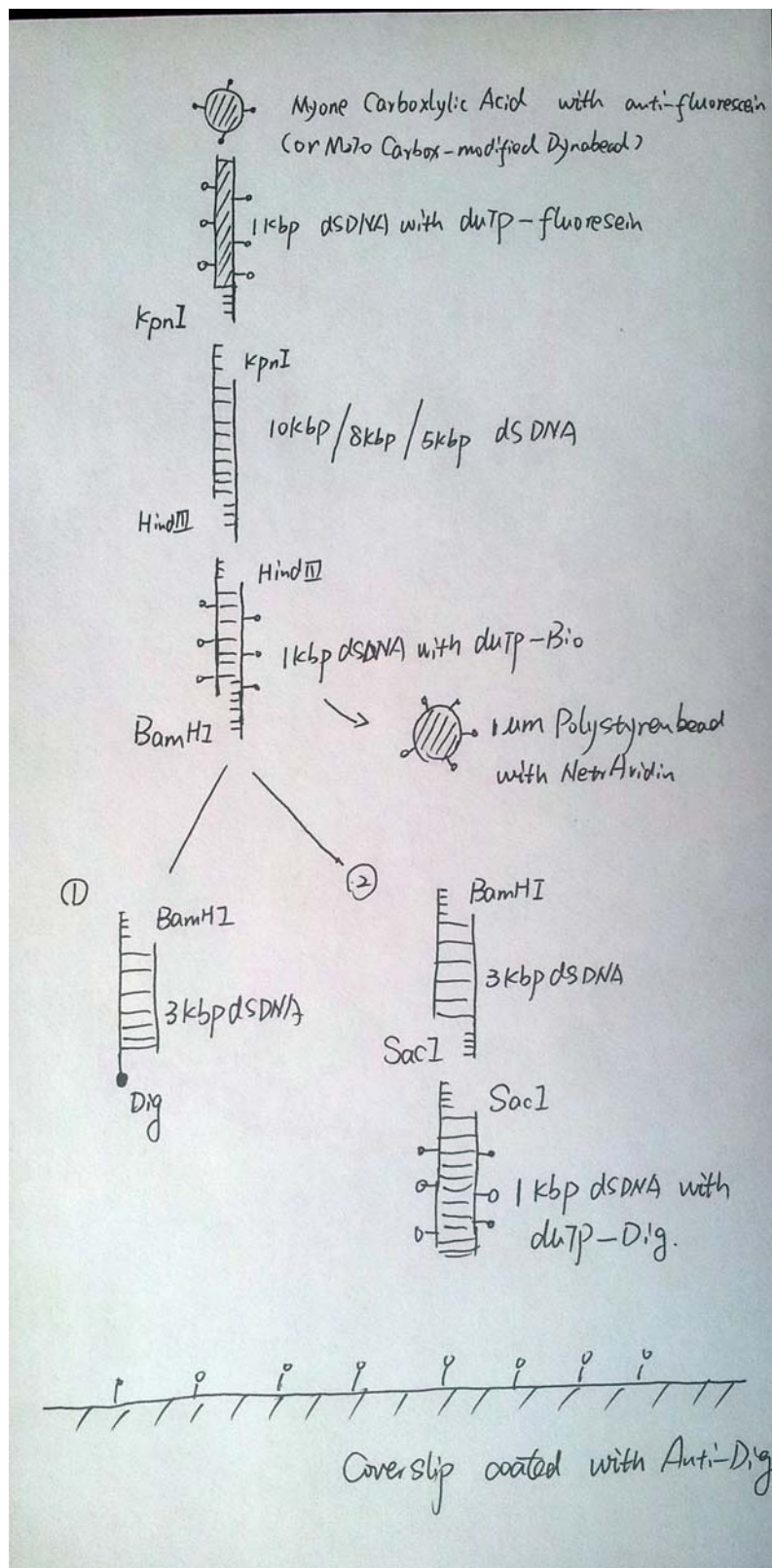


2013-11-4 重新设计连接双球DNA

2013年11月4日
9:53



一、设计思路

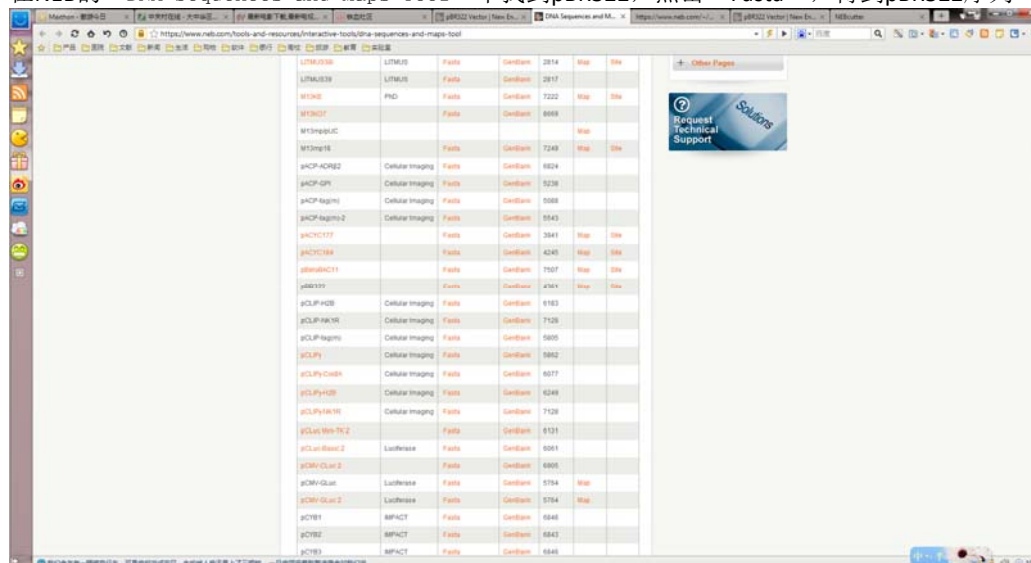
- 1、利用pBR322 DNA底物，PCR出1 kb带fluorescein的DNA片段；
- 2、利用lambda DNA底物，PCR出10 kb DNA片段；
- 3、利用lambda DNA底物，PCR出8 kb DNA片段；

- 4、利用lambdaDNA底物，PCR出5kbpDNA片段；
- 5、利用pBR322DNA底物，PCR出1kb带Biodin的DNA片段；
- 6、利用pBR322DNA底物，PCR出3kbDNA带一个Dig的DNA片段；
- 7、利用pBR322DNA底物，PCR出3kbDNA片段；
- 8、利用pBR322DNA底物，PCR出1kbDNA带Dig的DNA片段。

二、第一个DNA片段对应的引物设计

1、底物pBR322DNA序列

在NEB的“DNA Sequences and Maps Tool”中找到pBR322，点击“Fasta”，得到pBR322序列（4361 bp）。



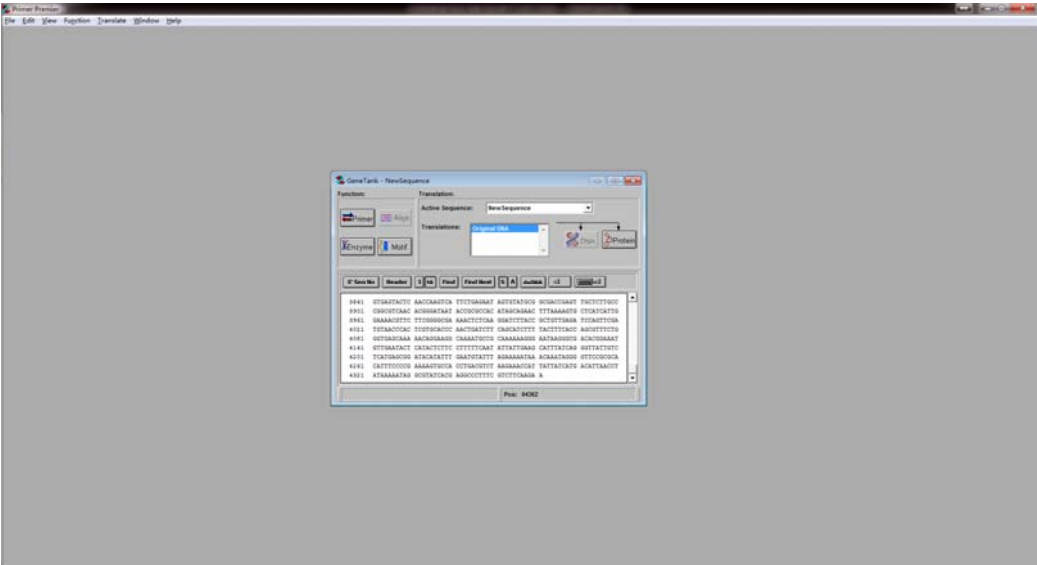
```

TTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATAAGCTTTAATGCGGTAGTTTATCACAGTTAAATTGCTAACGCAGTCAGGCAC
CGTGATGAAATCTAACAAATGCGCTCATCGTCATCCTCGGCACCGTCACCTGGATGCTGTAGGCATAGGCTTGGTTATG
CCGGTACTGCCGGGCTCTTGCGGGATATCGTCCATTCCGACAGCATCGCCAGTCACTATGGCGTGCTGCTAGCGCTATA
TGCGTTGATGCAATTTCTATGCGCACCCGTTCTCGGAGCACTGTCCGACCGCTTTGGCCGCCGCCAGTCTGCTCGCTT
CGTACTTGGAGCCACTATCGACTACGCGATCATGGCGACCACACCGTCTGTGGATCCTCTACGCCGGACGCATCGTG
GCCGGCATCACCGGCCACAGGTGCGGTTGCTGGCGCCTATATCGCCGACATCACCGATGGGGAAGATCGGGCTCGCCA
CTTCGGGCTCATGACGCTGTGTTTTCGGCGTGGGTATGGTGAGCGCCCGTGGCCGGGGGACTGTTGGCGCCATCTCCT
TGCTGACACCTTCTTTCGGCGCGGTGCTCAACGGCTCAACCTACTACTGGGCTGCTTCTAATGCAGGAGTCGCAT
AAGGGAGAGCGTCGACCGATGCCCTTGAGAGCCTTCAACCCAGTCAGCTCCTTCCGGTGGGCGCGGGGCATGACTATCGT
CGCCGCACTTATGACTGTCTTTTATCATGCAACTCGTAGGACAGGTGCCGGCAGCGCTCTGGGTCATTTTTCGGCGAGG
ACCGCTTTTCGCTGGAGCGCGACGATGATCGGCTGTGCTTTCGGGATTCGGAATCTTGACGCGCCTCGCTCAAGCCTTC
GTCACTGGTCCCGCCACCAACGTTTCGGCGAGAAGCAGGCCATTATCGCCGCGATGGCGGCCGACGCGTGGGCTACGT
CTTGCTGGCGTTCGCGACGCGAGGCTGGATGGCCTTCCCATTATGATTCTTCTCGCTTCCGGCGGCATCGGGATGCCCG
CGTTGCAGGCCATGCTGTCCAGGCAGGTAGATGACGACCATCAGGGACAGCTTCAAGGATCGCTCGCGGCTCTTACCAGC
CTAATTCGATCATTGGACCGCTGATCGTCACGGCGATTTATGCCGCTCGGCGAGCACATGGAACGGGTTGGCATGGAT
TGTAGGCGCCGCCCTATACCTTGTCTGCTCCCCGCTTGGCTGCGGTGCATGGAGCCGGGCCACCTCGACCTGAATGG
AAGCCGGCGGCACCTCGCTAACGGATTACCACTCCAAGAATTGGAGCCAATCAATTCTTGGGAGAAGTGTGAATGCGC
AAACCAACCCTTGGCAGAACATATCCATCGCTCCGCCATCTCCAGCAGCCGACGCGGCGCATCTCGGGCAGCGTTGGG
TCCTGGCCACGGGTGCGCATGATCGTGCTCTGTGCTTGGAGACCGGCTAGGCTGGCGGGGTTGCCTTACTGGTTAGCA
GAATGAATCACCGATACGCGAGCGAAGCTGAAGCGACTGCTGCTGCAAAACGCTGCGACCTGAGCAACAACATGAATGG
TCTTCGGTTTCCGTGTTTCGTAAGTCTGGAACCGCGAAGTCAGCGCCCTGACCAATTATGTTCCGGATCTGCATCGCA
GGATGCTGCTGGCTACCCTGTGGAACACCTACATCTGTATTAACGAAGCGCTGGCATTGACCTGAGTGATTTTTCTCTG
GTCCCGCCGCATCCATACCGCCAGTTGTTTACCTCACAACGTTCCAGTAACCGGGCATGTTTCATCATAGTAACCGTA
TCGTGAGCATCCTCTCTCGTTTCATCGGTATCATTACCCCATGAACAGAAATCCCCCTTACACGGAGGCATCAGTGACC
AAACAGGAAAAAACGCCCTTAACATGGCCCGCTTTATCAGAAGCCAGACATTAACGCTTCTGGAGAAACTCAACGAGCT
GGACGCGGATGAACAGGCAGACATCTGTGAATCGTTACGACCACGCTGATGAGCTTTACCGCAGCTGCCTCGCGCGTT
TCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGTCCCGGAGACGGTCAACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGC
AGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGG
AGTGATACTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTAAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAG
ATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGGCGCTTTCGGCTTCTCGTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCCGGTGC
GGCGAGCGGTATCAGTCACTCAAAGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAGAACATGTGA

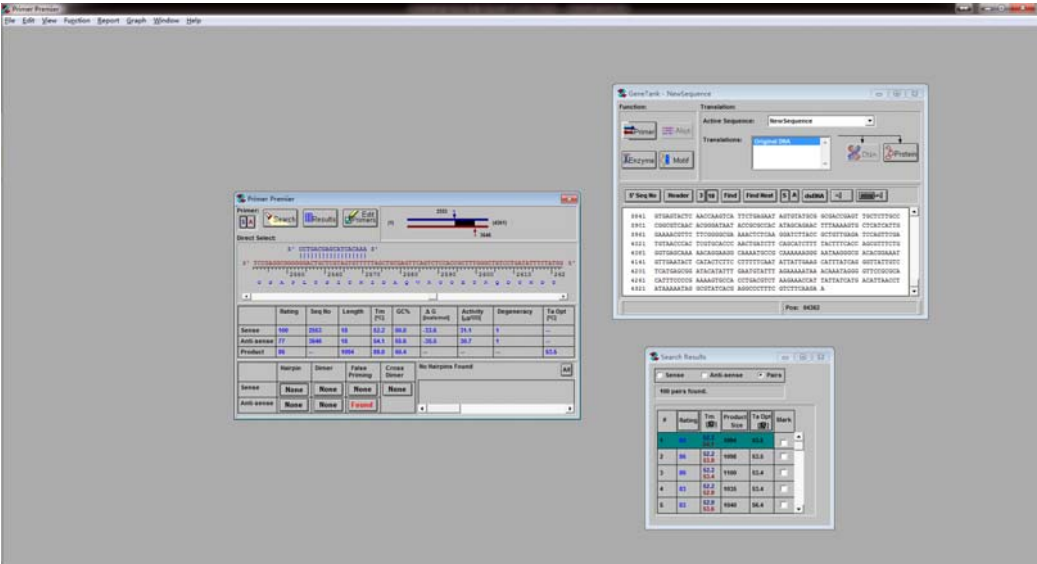
```

GCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGA
GCATCACA AAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAA
GCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGCGC
CTTTCTCATAGCTACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCAGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCC
CGTTCAGCCCCGACCCTGCGCTTATCCGGTAATATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGG
CAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTAC
GGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTG
ATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTC
AAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGA
TTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTAAATTA AAAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAAC
TTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCT
GACTCCCCGTCTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCA
CGCTCACC GGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATC
CGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCAAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTG
CCATTGCTGCAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTTCAGCTCCGGTTCCTCAACGATCAAGGCCA
GTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGTTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGC
AGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTG
GTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAACACGGGATAAT
ACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATATTGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACC
GCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCCACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCAGCGTTTCTG
GGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTC
CTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAA
ACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCT
ATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCTGCTTCAAGAA

2、打开primer5，输入pBR322序列



3、第一个PCR片段，点击“Primer”，计算1000bp产物的primer。



4、位置范围：2553-3646（1094bp）

S: 5' CCTGACGAGCATCACAAA 3'

A: 5' GCCATACCAAACGACGAG 3'

Anti-sense primer	3' GAGCAGCAAACCATACCG 5'
DNA template	5'-----3' 3'-----5'
Sense primer	5' CCTGACGAGCATCACAAA 3'

5、加入KpnI酶切位点（确定好粘性末端的位置）和保护碱基（根据NEB网站推荐：GG）：

5'...GGTACC...3'
3'...CCATGG...5'

Anti-sense primer	3' GAGCAGCAAACCATACCG CCATGG GG 5'
DNA template	5'-----3' 3'-----5'
Sense primer	5' CCTGACGAGCATCACAAA 3'

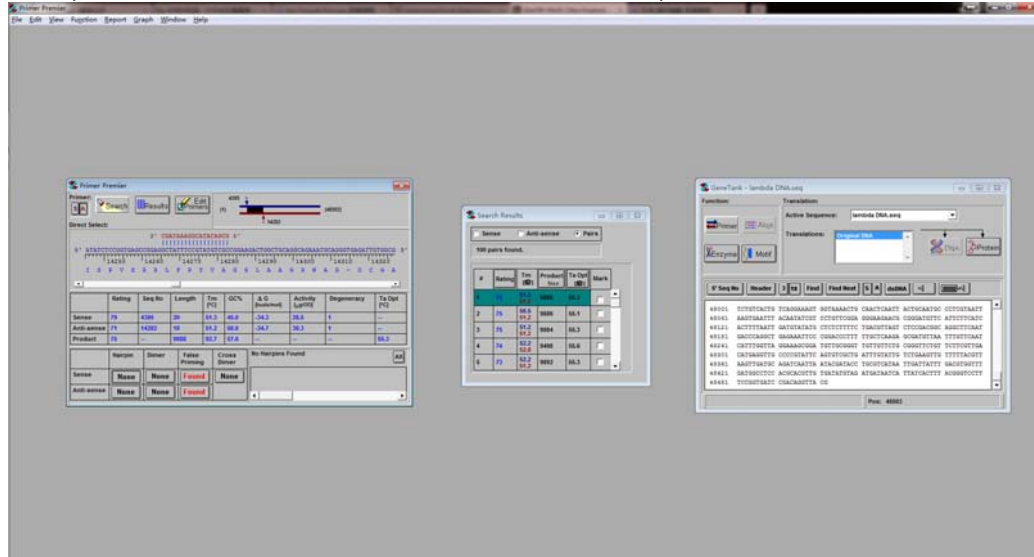
6、最终引物：

S: 5' CCTGACGAGCATCACAAA 3'

A: 5' GAGCAGCAAACCATACCG CCATGG GG 3'

三、第二个DNA片段，以lambda DNA为底物，设计10kbDNA片段（两端都酶切KpnI和HindIII）

1、在primer5中输入lambda DNA序列，计算得到分值最高的primer引物



2、位置范围：4395-14282（9888bp）

S: 5' ACAATCAACAGAGGAGGAGA 3'

A: 5' GCGACATACGGAATAGC 3'

Anti-sense primer	3' CGATAAAGGCATACAGCG 5'
DNA template	5'-----3' 3'-----5'
Sense primer	5' ACAATCAACAGAGGAGGAGA 3'

3、在Sense primer 5'端加入KpnI酶切位点，为了和第一个PCR片段配对连接。

5'...GGTACC...3'
3'...CCATGG...5'

Anti-sense primer	3' CGATAAAGGCATACAGCG 5'
DNA template	5'-----3' 3'-----5'
Sense primer	5' GG GGTACC ACAATCAACAGAGGAGGAGA 3'

4、在anti-sense primer 5' 端加入HindIII酶切位点

5'...AAGCTT...3'
3'...TTCGAA...5'

Anti-sense primer	3' CGATAAAGGCATACAGCG TTCGAA CCC 5'
DNA template	5'-----3'

3'-----5'
Sense primer 5' GG GGTACC ACAATCAACAGAGGAGGAGA 3'

5、最终引物

S: 5' GG GGTACC ACAATCAACAGAGGAGGAGA 3'

A: 5' CCC AAGCTT GCGACATACGGAAATAGC 3'

四、第三个DNA片段，以lambda DNA为底物，设计8kbDNA片段（两端都酶切KpnI和HindIII）

1、在primer5中输入lambda DNA序列，计算得到分值最高的primer引物

2、位置范围：3882-11914（8033bp）

S: 5' CGGCTACTCCGTGTTGA 3'

A: 5' CTGGACTGTTTCGGCTTT 3'

Anti-sense primer	3' TTTCGGCTTTGTCAGGTC 5'
-------------------	--------------------------

DNA template 5'-----3'
3'-----5'

Sense primer 5' CGGCTACTCCGTGTTGA 3'

3、在Sense primer 5'端加入KpnI酶切位点，为了和第一个PCR片段配对连接。

5'...GGTACC...3'
3'...CCATGG...5'

Anti-sense primer	3' TTTCGGCTTTGTCAGGTC 5'
-------------------	--------------------------

DNA template 5'-----3'
3'-----5'

Sense primer 5' GG GGTACC CGGCTACTCCGTGTTGA 3'

4、在anti-sense primer 5' 端加入HindIII酶切位点

5'...AAGCTT...3'
3'...TTCGAA...5'

Anti-sense primer	3' TTTCGGCTTTGTCAGGTC TTCGAA CCC 5'
-------------------	-------------------------------------

DNA template 5'-----3'
3'-----5'

Sense primer 5' GG GGTACC CGGCTACTCCGTGTTGA 3'

5、最终引物

S: 5' GG GGTACC CGGCTACTCCGTGTTGA 3'

A: 5' CCC AAGCTT CTGGACTGTTTCGGCTTT 3'

五、第四个DNA片段，以lambda DNA为底物，设计5kbDNA片段（两端都酶切KpnI和HindIII）

1、在primer5中输入lambda DNA序列，计算得到分值最高的primer引物

2、位置范围：4401-9339（4939bp）

S: 5' AACAGAGGAGGAGAAGAGTG 3'

A: 5' TACCGATACTGCTGACCC 3'

Anti-sense primer	3' CCCAGTCGTCATAGCCAT 5'
-------------------	--------------------------

DNA template 5'-----3'
3'-----5'

Sense primer 5' AACAGAGGAGGAGAAGAGTG 3'

3、在Sense primer 5'端加入KpnI酶切位点，为了和第一个PCR片段配对连接。

5'...GGTACC...3'
3'...CCATGG...5'

Anti-sense primer	3' CCCAGTCGTCATAGCCAT 5'
-------------------	--------------------------

DNA template 5'-----3'
3'-----5'

Sense primer 5' GG GGTACC AACAGAGGAGGAGAAGAGTG 3'

4、在anti-sense primer 5' 端加入HindIII酶切位点

5'...AAGCTT...3'
3'...TTCGAA...5'

Anti-sense primer	3' CCCAGTCGTCATAGCCAT TTCGAA CCC 5'
-------------------	-------------------------------------

DNA template 5'-----3'
3'-----5'

Sense primer 5' GG GGTACC AACAGAGGAGGAGAAGAGTG 3'

5、最终引物

S: 5' GG GGTACC AACAGAGGAGGAGAAGAGTG 3'

A: 5' CCC AAGCTT TACCGATACTGCTGACCC 3'

六、第五个DNA片段，以pBR332 DNA为底物，设计1kbDNA片段（两端都酶切HindIII和BamHI）

1、还是利用第一个PCR的DNA片段，需要改变新的酶切位点

位置范围：2553-3646（1094bp）

S: 5' CCTGACGAGCATCACAAA 3'

A: 5' GCCATACCAAACGACGAG 3'

Anti-sense primer	3' GAGCAGCAAACCATACCG 5'
DNA template	5'-----3'
	3'-----5'
Sense primer	5' CCTGACGAGCATCACAAA 3'

2、在sense primer 5' 端加入HindIII酶切位点

5'...**A**AGCTT...3'
3'...TT**C**GAA...5'

Anti-sense primer	3' GAGCAGCAAACCATACCG 5'
DNA template	5'-----3'
	3'-----5'
Sense primer	5' CCC AAGCTT CCTGACGAGCATCACAAA 3'

3、在anti-sense primer 5' 端加入BamHI酶切位点

5'...**G**GATCC...3'
3'...CCT**A**GG...5'

Anti-sense primer	3' GAGCAGCAAACCATACCG CCTAGG GC 5'
DNA template	5'-----3'
	3'-----5'
Sense primer	5' CCC AAGCTT CCTGACGAGCATCACAAA 3'

4、最终引物

S: 5' CCC AAGCTT CCTGACGAGCATCACAAA 3'

A: 5' CG GGATCC GCCATACCAAACGACGAG 3'

七、第六个DNA片段，根据pBR332 DNA为底物，设计3 kb DNA片段（一端都酶切BamHI）

1、利用primer，设计3kbpDNA片段引物

位置范围：1056-4080（3025 bp）

S: 5' TGTCCAGGCAGGTAGATGA 3'

A: 5' CAGAAACGCTGGTGAAAGT 3'

Anti-sense primer	3' TGAAAGTGGTCGCAAAGAC 5'
DNA template	5'-----3'
	3'-----5'
Sense primer	5' TGTCCAGGCAGGTAGATGA 3'

2、在sense primer 5' 端加入BamHI酶切位点

5'...**G**GATCC...3'
3'...CCT**A**GG...5'

Anti-sense primer	3' TGAAAGTGGTCGCAAAGAC 5'
DNA template	5'-----3'
	3'-----5'
Sense primer	5' CG GGATCC TGTCCAGGCAGGTAGATGA 3'

3、最终引物:

S: 5' CG GGATCC TGTCCAGGCAGGTAGATGA 3'

A: 5' Dig-CAGAAACGCTGGTGAAAGT 3'

八、第七个DNA片段，根据pBR332 DNA为底物，设计3 kb DNA片段（两端都酶切BamHI和SacI）

1、利用primer，设计3kbpDNA片段引物

位置范围：1056-4080（3025 bp）

S: 5' TGTCCAGGCAGGTAGATGA 3'
A: 5' CAGAAACGCTGGTGAAAGT 3'

Anti-sense primer	3' TGAAAGTGGTCGCAAAGAC 5'
-------------------	---------------------------

DNA template 5'-----3'
3'-----5'

Sense primer 5' TGTCCAGGCAGGTAGATGA 3'

2、在sense primer 5' 端加入BamHI酶切位点

5'...GGATCC...3'
3'...CCTAGG...5'

Anti-sense primer	3' TGAAAGTGGTCGCAAAGAC 5'
-------------------	---------------------------

DNA template 5'-----3'
3'-----5'

Sense primer 5' CG GGATCC TGTCCAGGCAGGTAGATGA 3'

3、在anti-sense primer 5' 端加入SacI酶切位点

5'...GAGCTC...3'
3'...CTCGAG...5'

Anti-sense primer	3' TGAAAGTGGTCGCAAAGAC CTCGAG C 5'
-------------------	------------------------------------

DNA template 5'-----3'
3'-----5'

Sense primer 5' CG GGATCC TGACGACCATCAGGGACA 3'

4、最终引物:

S: 5' CG GGATCC TGACGACCATCAGGGACA 3'
A: 5' C GAGCTC CAGAAACGCTGGTGAAAGT 3'

九、第八个DNA片段，根据pBR332 DNA为底物，设计1 kb DNA片段（一端都酶切SacI）

1、还是利用第一个PCR的DNA片段，需要改变新的酶切位点

位置范围：2553-3646（1094bp）

S: 5' CTGACGAGCATCACAAA 3'
A: 5' GCCATACCAAACGACGAG 3'

Anti-sense primer	3' GAGCAGCAAACCATACCG 5'
-------------------	--------------------------

DNA template 5'-----3'
3'-----5'

Sense primer 5' CTGACGAGCATCACAAA 3'

2、在sense primer 5' 端加入SacI酶切位点

5'...GAGCTC...3'
3'...CTCGAG...5'

Anti-sense primer	3' GAGCAGCAAACCATACCG 5'
-------------------	--------------------------

DNA template 5'-----3'
3'-----5'

Sense primer 5' C GAGCTC CTGACGAGCATCACAAA 3'

3、最终引物

S: 5' C GAGCTC CTGACGAGCATCACAAA 3'
A: 5' GCCATACCAAACGACGAG 3'

十、引物列表:

序号	上游引物	下游引物	酶
1	S: 5' CTGACGAGCATCACAAA 3'	A: 5' GAGCAGCAAACCATACCG CCATGG GG 3'	KpnI
2	S: 5' GG GGTACC ACAATCAACAGAGGAGGAGA 3'	A: 5' CCC AAGCTT GCGACATACGGAAATAGC 3'	KpnI、HindIII
3	S: 5' GG GGTACC CGGCTACTCCGTGTTTGA 3'	A: 5' CCC AAGCTT CTGGACTGTTTCGGCTTT 3'	KpnI、HindIII
4	S: 5' GG GGTACC AACAGAGGAGGAGAAGAGTG 3'	A: 5' CCC AAGCTT TACCGATACTGCTGACCC 3'	KpnI、HindIII
5	S: 5' CCC AAGCTT CTGACGAGCATCACAAA 3'	A: 5' CG GGATCC GCCATACCAAACGACGAG 3'	HindIII、BamHI
6	S: 5' CG GGATCC TGTCCAGGCAGGTAGATGA 3'	A: 5' Dig-CAGAAACGCTGGTGAAAGT 3'	BamHI

7	S: 5' CG GGATCC TGACGACCATCAGGGACA 3'	A: 5' C GAGCTC CAGAAACGCTGGTGAAAGT 3'	BamHI、 SacI
8	S: 5' C GAGCTC CCTGACGAGCATCACAAA 3'	A: 5' GCCATACCAAACGACGAG 3'	SacI