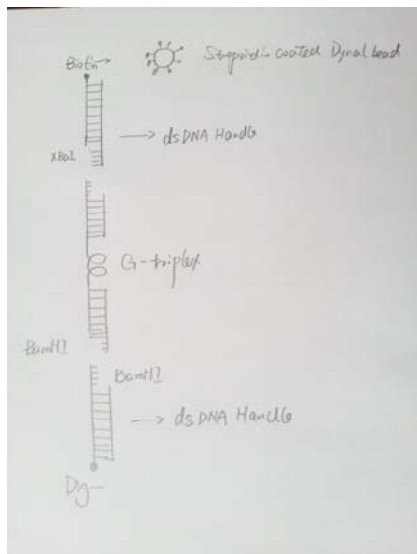


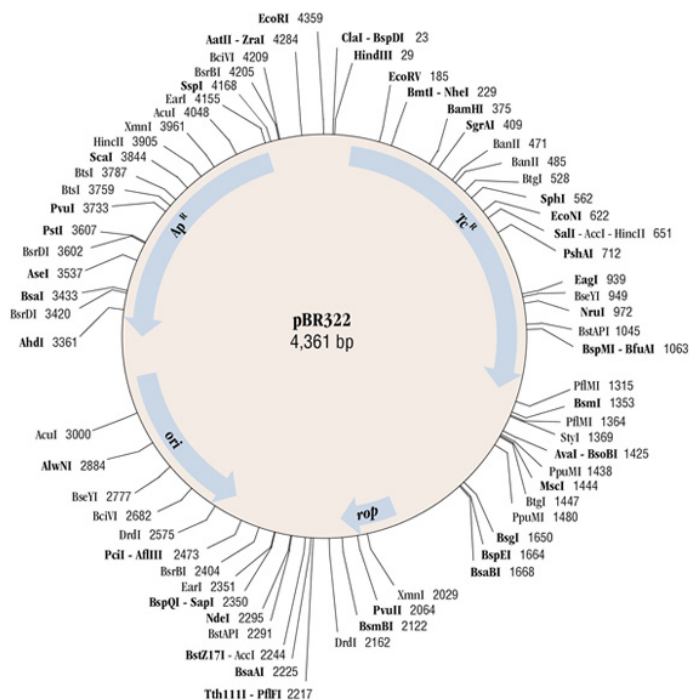
# 2014-6-4 G3样品设计-dsDNA handle

2014年6月4日 8:55

## 一、目标产物：



## 二、底物 pBR322



## 三、引物设计（参考Double Bead System）

序号	上游引物		下游引物	限制性内切酶
1 Prime1_A_bio	5' Bio-CCTGACGAGCATCACAAA 3'	Prime1_B_xbai	5' GCTCTAGA GCCATACCAAACGACGAG 3'	XbaI
2 Prime2_A_saci	5' CGAGCTC CCTGACGAGCATCACAAA 3'	Prime2_B_dig	5' dig-GCCATACCAAACGACGAG 3'	SacI

## 四、具体的引物设计

- （一）第一个DNA片段，根据pBR322 DNA为底物，设计1 kb DNA片段（一端酶切XbaI）
- 1、位置范围：2553-3646（1093bp）

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、加入XbaI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：CG）：

5'...T<sup>▼</sup>CTAGA...3'  
3'...AGATC<sup>▲</sup>T...5'

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

3、最终引物：

S: 5' Bio-CCTGACGAGCATCACAAA 3'  
A: 5' GCTCTAGAGCCATACCAAACGACGAG 3'

(二)、第二个DNA片段，根据pBR332 DNA为底物，设计1 kb DNA片段（一端酶切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（1093bp）

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SacI酶切位点和保护碱基（根据NEB网站推荐：C）

5'...GAGCT<sup>▼</sup>C...3'  
3'...C<sup>▲</sup>TCTGAG...5'

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

3、最终引物

S: 5' C GAGCTC CCTGACGAGCATCACAAA 3'  
A: 5' Dig-GCCATACCAAACGACGAG 3'

## 五、G3序列设计

1、G3 sequence

G3: 5' **CTAG**CGGTGTGAAATACCGACACAGGGTTAGGGTTAGGGACAGCCAGCAAGACGTAGCC**AGCT** 3'

这个底物5' 端需要磷酸化。在订底物时写清楚。HPLC纯化。

## 2、互补底物

left: 5' TGTGTCGGTATTTACACCG 3'

right: 5' GGCTACGTCTTGCTGGCTGT 3'

## 3、退火

三段一起退火，左边和右边分别为20bp,中间为G3。

**CTAG**，**AGCT**为粘性末端，与1000bp，1000bp dsDNA handle连接。