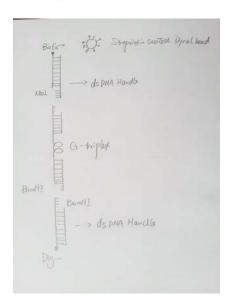
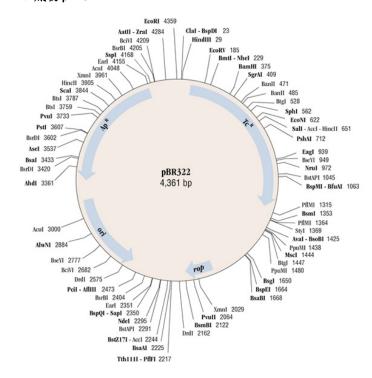
2014-6-4 G3样品设计-dsDNA handle

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'	Xbal
2 Prime2_A_saci	5' CGAGCTC CCTGACGAGCATCACAAA 3'	Prime2_B_dig	5' dig-GCCATACCAAACGACGAG 3'	Sacl

四、具体的引物设计

(一)第一个DNA片段,根据pBR332 DNA为底物,设计1 kb DNA片段(一端酶切Xbal)

1、位置范围: 2553-3646 (1093bp)

DNA template 5'	CATACCG 5'
Sense primer 5' CCTGACGAGCATCACAAA 3' 2、加入Xbal酶切位点(确定好新性末端的位置)和保护碱基(根据NEB网站推荐, 5'	3'
2、加入Xbal酶切位点(确定好結性末端的位置)和保护碱基(根据NEB网站推荐. 5TCTAGA3° 3AGATC_T5° Anti-sense primer 3° GAGCAGCAAACC DNA template 5'	5'
5TCTAGA3' 3AGATCT5' Anti-sense primer DNA template 5'	>
3' GAGCAGCAAACC DNA template 5' 3' Sense primer 5' CCTGACGAGCATCACAAA 3' 3、最终引物: S: 5' BIO-CCTGACGAGCATCACAAA 3' A: 5' GCTCTAGAGCCATCACAAA 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s: 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' GAGCAGCATCACAAA 3' A: 5' GCCATACCAAACGACGAG 3' Anti-sense primer 5' CCTGACGAGCATCACAAA 3' C. 在sense primer 5' 端加入Sacl酶切位点和保护碱基(根据NEB网站推荐: C) 5' GAGCTC3' 3' C_TCGAG5' Anti-sense primer 5' C GAGCTC CCTGACGAGCATCACAAA 3' A. 5' Dig-GCCATACCAAACGACGAG 3' T. G3序列设计 1、G3 sequence	CG):
DNA template 5'————————————————————————————————————	
DNA template 5'————————————————————————————————————	ATACCG AGATCT CG 5'
Sense primer 5' CCTGACGAGCATCACAAA 3' 3、最终引物: S: 5' Bio-CCTGACGAGCATCACAAA 3' A: 5' GCTCTAGAGCCATCACAAA 3' C(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s: 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 DNA template 5'	3
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S: 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' GAGCAGCATCACAAA 3' C. 在sense primer 5' 端加入Sacl酶切位点和保护碱基(根据NEB网站推荐: C) 5′GAGCTC3′ 3′C_TCGAG5′ Anti-sense primer 3' GAGCAGCATCACAAA 3' Anti-sense primer 3' GAGCAGCAACAAA 3' Anti-sense primer 3' GAGCAGCAACAAA 3' Anti-sense primer 3' GAGCAGCAACAAA 3' Anti-sense primer 5' C GAGCTC CCTGACGAGCATCACAAA 3'	·5
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S: 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 DNA template 5'————————————————————————————————————	
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Si 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' GAGCAGCATCACAAA 3' Esense primer 5' CCTGACGAGCATCACAAA 3' 2、在sense primer 5' CCTGACGAGCATCACAAA 3' Anti-sense primer 3' 编加入Saci酶切位点和保护碱基(根据NEB网站推荐: C) 5GAGCTC3' 3CTCGAG5' Anti-sense primer 3' GAGCAGCATCACAAA 3' Anti-sense primer 3' GAGCAGCATCACAAA 3' Anti-sense primer 3' GAGCAGCATCACAAA 3' Anti-sense primer 5' C GAGCTC CCTGACGAGCATCACAAA 3' Anti-sense primer 5' C GAGCTC CCTGACGAGCATCACAAA 3' A. 最终引物 S: 5' C GAGCTC CCTGACGAGCATCACAAA 3' A. 5' Dig-GCCATACCAAACGACGAG 3' 五、G3序列设计 1、G3 sequence	
(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Si 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 DNA template 5'	
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 DNA template 5'	
位置范围: 2553-3646(1093bp) S: 5' CCTGACGAGCATCACAAA 3' A: 5' GCCATACCAAACGACGAG 3' Anti-sense primer DNA template 5'	acl)
S: 5' CCTGACGAGCATCACAAA 3' A: 5' GCCATACCAAACGACGAG 3' Anti-sense primer DNA template 5'	
A: 5' GCCATACCAAACGACGAG 3' Anti-sense primer DNA template 5'	
A: 5' GCCATACCAAACGACGAG 3' Anti-sense primer DNA template 5'	
DNA template 5'	
DNA template 5'	CATACCG 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) 5GAGCTC3' 3CTCGAG5' Anti-sense primer 3' GAGCAGCAAAA DNA template 5'	
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) 5GAGCTC3。 3CTCGAG5。 Anti-sense primer 3' GAGCAGCAAAA DNA template 5'	5'
5GAGCTC3° 3C_TCGAG5° Anti-sense primer 3' GAGCAGCAAAA DNA template 5'	
3C_TCGAG5' Anti-sense primer DNA template 5'	
Anti-sense primer DNA template 5'	
DNA template 5'	
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	
S: 5' C GAGCTC CCTGACGAGCATCACAAA 3'A: 5' Dig-GCCATACCAAACGACGAG 3' 五、G3序列设计 1、G3 sequence	
S: 5' C GAGCTC CCTGACGAGCATCACAAA 3'A: 5' Dig-GCCATACCAAACGACGAG 3' 五、G3序列设计 1、G3 sequence	
A: 5'Dig-GCCATACCAAACGACGAG 3' 五、G3序列设计 1、G3 sequence	
1、G3 sequence	
C3. FL CTACCCCTCTCAAATACCCACACACCCTTACCCTTACCCCTCCCCCC	
G3: 5' CTAGCGGTGTGAAATACCGACACAGGGTTAGGGTTAGGGACAGCCAGC	GCCAGCT 3'

2、互补底物

left: 5' TGTGTCGGTATTTCACACCG 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。