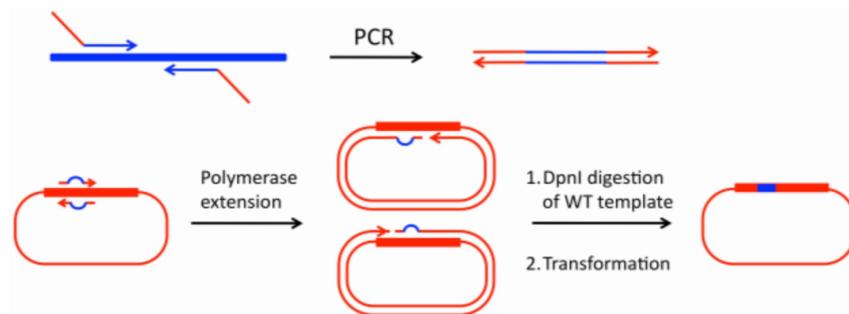


Megaprimer PCR of Whole Plasmid

Megaprimer PCR of Whole Plasmid (MEGAWHOP)是一种灵活运用PCR方法构建质粒的方法,其使用PCR产物做第二轮PCR的引物,可以在不切断原载体的情况下,实现插入、缺失、突变等。本Protocol的信息源自何锦涛师兄、王灿灿师姐和文献查阅

MEGAWHOP原理图



1. 明确突变的氨基酸和碱基的位点,设计引物序列,其中包含突变位点和前后序列
注意:在引物5'端应包含载体的至少18 bp的同源序列,以确保能够发生与载体的overlap
2. 使用引物和需要插入序列的模板进行第一轮PCR,体系和扩增条件与普通PCR一致,可以使用高保真的Taq酶以确保效率,完成后配制DNA琼脂糖胶,电泳分离,切胶,胶回收
3. 第二轮PCR体系(可以做20 μ L体系)

试剂	用量
载体模板	< 100 ng
PCR产物	~ 600 ng
PCR体系组分	正常配比体系即可

具体退火温度据同源臂长度估算,变性过程可适当增加时间

4. 对PCR引物进行DpnI酶切,以破坏模板序列:通常可直接在20 μ L的PCR体系中,加入0.4 μ L DpnI酶,37 $^{\circ}$ C、2 hr水浴(也可参照说明书,加入CutSmart Buffer或LabFD Buffer)

DpnI是一种识别甲基化序列的酶,其识别位点在大肠杆菌的质粒中普遍存在,而在PCR的引物中不存在,因而可以用于破坏模板不被转化

5. 85 $^{\circ}$ C金属浴20 min,使DpnI失活,自然降至室温
6. 转化、涂板、摇菌、提质粒检测

修订日期 2023-10-08