

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

دعای مطالعه

اَللّٰهُمَّ اَخْرِجْنِيْ مِنْ ظُلُمَاتِ الْوَهْمِ وَاكْرِمْ نِيْ بِنُوْرِ الْفَهْمِ
اَللّٰهُمَّ افْتَحْ عَلَيْنَا اَبْوَابَ رَحْمَتِكَ وَاَنْشُرْ عَلَيْنَا خَزَائِنَ عُلُوْمِكَ
بِرَحْمَتِكَ يَا اَرْحَمَ الرَّاحِمِيْنَ

پروردگارا، خارج کن مرا از تاریکی های فکر و گرامی بدار به نور فهم
پروردگارا، بکشای بر مادرهای رحمت را و بکستران کنج های دانشت را به امید رحمت
تو ای مهربان ترین مهربانان

بیایید به حقوق دیگران احترام بگذاریم

دوست عزیز، این کتاب حاصل دسترنج چندین ساله‌ی مؤلف، مترجم و ناشر آن است. تکثیر و فروش آن به هر شکلی بدون اجازه از پدیدآورنده کاری غیراخلاقی، غیرقانونی، غیرشرعی و کسب درآمد از دسترنج دیگران است، نتیجه‌ی این عمل نادرست، موجب رواج بی‌اعتمادی در جامعه و بروز پی‌آمدهای ناگوار در زندگی و محیط ناسالم برای خود و فرزندانمان می‌گردد.

آموزش گام به گام طراحی پرایمر

مؤلف:

دکتر کبری مرادیان

«دکتری بیوتکنولوژی پزشکی دانشگاه تربیت مدرس»



سرشناسه	: مرادیان، کبری، ۱۳۴۷ -
عنوان و نام پدیدآور	: آموزش گام به گام طراحی پرایمر / مولف کبری مرادیان.
مشخصات نشر	: تهران: گروه تألیفی دکتر خلیلی، ۱۴۰۱.
مشخصات ظاهری	: ۵۰ ص. : مصور، جدول.
شابک	: 978-600-422-669-1
وضعیت فهرست نویسی	: فیپا
موضوع	: واکنش زنجیره ای پلیمرز
موضوع	: Polymerase chain reaction
موضوع	: واکنش زنجیره ای پلیمرز -- روش ها
موضوع	: Polymerase chain reaction -- methods
موضوع	: مهندسی ژنتیک -- نرم افزارها
موضوع	: Genetic engineering -- Software
رده بندی کنگره	: QP۶۰۶
رده بندی دیویی	: ۵۷۲/۴۳
شماره کتابشناسی	: ۸۵۵۳۶۸۴

نام کتاب: آموزش گام به گام طراحی پرایمر

مولف: کبری مرادیان

ناشر: گروه تألیفی دکتر خلیلی

نوبت و سال چاپ: اول . ۱۴۰۱

شمارگان: ۱۰۰۰

چاپ و صحافی: شباب

مدیر تولید: اقبال شرقی

مدیر فنی و هنری: مریم آرده

تایپ و صفحه آرایی: بیتا اندوژفر

بهاء: ۴۵۰۰۰ تومان

آموزشگاه دکتر خلیلی: ۰۲۱۶۶۵۶۸۶۲۱

مرکز پخش: ضلع جنوب غربی میدان انقلاب . جنب سینما پارس . مجتمع تجاری پارس . طبقه اول

مرکز فروش: ۰۲۱۶۶۵۶۹۲۱۶

مدیر فروش: ۰۹۱۲۵۵۰۸۵۸۹



@drkhaliligroupbook



www.DKG.ir



drkhaliligroupbook

تقدیم به:

استاد ارجمندم، سرکار خانم دکتر فاطمه رهبری زاده

پس از دوس ارزشمنی که در محضر ایشان آموختم.

طلیحه سخن مؤلف:

نرم افزارهای بسیاری برای طراحی پرایمر وجود دارد که برخی از آن ها به صورت آنلاین و برخی به صورت آنلاین در دسترس می باشند. هر کدام از این نرم افزارها از الگوریتم های متفاوتی استفاده می کنند و نقاط ضعف و قوتی دارند. بنابراین لازم است که پس از طراحی پرایمر با یک نرم افزار، ویژگی های مهم آن با چند نرم افزار دیگر نیز بررسی شود. دقت در طراحی پرایمر در ابتدای کار از اتلاف وقت، انرژی و هزینه در مراحل بعدی پیشگیری می نماید. در این کتاب روش های طراحی پرایمر و بررسی ویژگی های مهم آن ها، بدون استفاده از ابزار یا نرم افزار، با استفاده از ابزار Primer BLAST در پایگاه داده NCBI و همچنین با نرم افزارهای Gene Runner و SnapGene به صورت کاربردی و با ارائه مثال آموزش داده شده است. در ادامه روش انجام PCR مجازی، شبیه سازی الکتروفورز توالی های نوکلئوتیدی روی ژل آگارز و مشاهده باند یا باندهای احتمالی به صورت مجازی و همچنین کلونینگ مجازی با استفاده از نرم افزار SnapGene آورده شده است. در نگارش این کتاب سعی شده که مطالب با جزئیات کامل اما به صورت ساده و کاربردی توضیح داده شود. با این وجود، به طور قطع، خالی از اشکال نمی باشد. بدون شک ارائه نظرات و پیشنهادهای شما خوانندگان عزیز از طریق پست الکترونیکی این جانب به آدرس s.moradian7@gmail.com و یا به نشانی ناشر، ما را در اصلاح و بهبود این اثر یاری خواهد نمود. در نهایت، آرزو مندم که مطالعه این کتاب برای خوانندگان عزیز مفید و در موفقیت آن ها مؤثر باشد.

فهرست مطالب

صفحه

عنوان

فصل اول: اصول طراحی پرایمر.....	۷
معرفی ابزارها و نرم افزارهای طراحی پرایمر.....	۷
ویژگی هایی که پرایمرها باید داشته باشند.....	۷
فصل دوم: روش های مختلف طراحی پرایمر و بررسی ویژگی های پرایمرها.....	۱۰
طراحی پرایمر بدون استفاده از نرم افزار.....	۱۰
طراحی پرایمر با استفاده از ابزار Primer-BLAST در پایگاه داده NCBI.....	۱۱
بررسی ویژگی های پرایمرهایی که با استفاده از Primer-BLAST طراحی شده اند با نرم افزار Gene Runner.....	۱۶
تجزیه و تحلیل نتایج Blast.....	۱۶
روش تغییر دادن پرایمر به منظور جلوگیری از اتصال پرایمر به توالی های غیراختصاصی با هدف حذف نمودن محصولات غیراختصاصی.....	۱۷
طراحی پرایمر با استفاده از نرم افزار Gene Runner.....	۱۷
روش جستجو و به دست آوردن فرمت FASTA توالی ژن مورد نظر از پایگاه داده NCBI.....	۱۹
روش Blast نمودن پرایمرهایی که توسط نرم افزاری مانند Gene Runner یا SnapGene طراحی شده اند، با ابزار Primer-BLAST در سایت NCBI.....	۲۶
طراحی پرایمر با نرم افزار SnapGene.....	۲۸
بررسی ویژگی های پرایمرهایی که با استفاده از SnapGene طراحی شده اند با نرم افزار Gene Runner.....	۳۶
فصل سوم: عملکردهای دیگر نرم افزار SnapGene.....	۳۷
کلونینگ مجازی با استفاده از نرم افزار SnapGene.....	۳۷
PCR مجازی با استفاده از نرم افزار SnapGene.....	۴۰
نام گذاری و تغییر رنگ یک قطعه از توالی با استفاده از گزینه Features نرم افزار SnapGene.....	۴۵
پیوست.....	۴۸

اصول طراحی پرایمر

معرفی ابزارها و نرم افزارهای طراحی پرایمر

تعدادی از نرم افزارهای طراحی پرایمر در زیر نام برده شده اند.

Offline: SnapGene , Primer Premier, Vector NTI, OLIGO, CLC Workbench.

Primer BLAST: Online به آدرس <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>

همچنین در سایت هایی مانند Primer3 به آدرس <https://primer3.org> و Integrated DNA Technologies Inc.(IDT) و به آدرس <https://www.idtdna.com> می توانید به توالی هزاران پرایمر و پروب که قبلاً برای ژن های مختلف طراحی و با موفقیت در PCR و real-time PCR استفاده شده اند دست پیدا کنید. البته در صورتی که موفق شدید پرایمر مورد نظرتان را در این سایت ها بیابید، لازم است که خودتان ویژگی های مهم آن ها را بررسی نمایید. تضمینی وجود ندارد که چون پرایمری در آزمایشات دیگر به خوبی کار کرده است برای آزمایش شما هم به درستی کار کند.

ویژگی هایی که پرایمرها باید داشته باشند

- (۱) طول پرایمر بین ۱۸-۲۴ نوکلئوتید باشد (پرایمر با طول کوتاه اتصال غیراختصاصی را افزایش داده و پرایمر بلند سرعت هیبریداسیون را کم می کند).
- (۲) در حد امکان تعداد پورین ها با پیریمیدین ها برابر باشد.
- (۳) مقدار GC پرایمر بین ۴۰-۶۰ درصد باشد (درصد بیش تر GC، شرایط PCR را دشوار می کند و درصد کم تر اتصال پرایمر به توالی هدف را سست و میزان محصول را کاهش می دهد).

- (۴) دمای ذوب^۱ پرایمر C ° ۶۰-۵۵ باشد.
- (۵) توالی‌های تکراری^۲ مانند "TATATA" نداشته باشد.
- (۶) توالی‌های تکراری پشت سر هم (Run) مانند "AAAAA" به‌ویژه در انتهای^۳ نداشته باشد (حداکثر ۳-۴ تکرار مجاز است).
- (۷) انتهای^۳ پرایمر باز A یا T نباشد، زیرا سبب کاهش اختصاصیت پرایمر می‌گردد (به‌ویژه T که به‌راحتی با بازهای غیر مکمل خود جفت می‌شود)^۴.
- (۸) قرار دادن یک یا دو باز G یا C در انتهای^۳ پرایمر سبب افزایش کارایی پرایمر می‌گردد.
- (۹) انتهای^۳ پرایمر غنی از C و G نباشد، زیرا سبب کاهش اختصاصیت پرایمر می‌شود.
- (۱۰) توالی‌های پالیندرومی^۵ مانند "GTTAAC" در پرایمر وجود نداشته باشد، زیرا باعث تشکیل پرایمر دایمر می‌شوند.
- (۱۱) مقدار GC پرایمرهای Forward و Reverse نزدیک به هم باشد.
- (۱۲) دمای ذوب دو پرایمر نزدیک به هم باشد (حداکثر ۵ درجه سانتی‌گراد اختلاف).
- (۱۳) پرایمرها نباید در دمای نزدیک به دمای اتصال^۶، ساختار سنجاق سری تشکیل بدهند.
- (۱۴) پرایمرها نباید در دمای نزدیک به دمای اتصال، با خودشان تشکیل دایمر بدهند.
- (۱۵) پرایمرهای Forward و Reverse نباید در دمای نزدیک به دمای اتصال، با یکدیگر تشکیل دایمر بدهند.
- (۱۶) برای بررسی ساختار سنجاق سری^۶، اتصال پرایمر با خودش^۷ و یا با پرایمر دیگر^۸ به دما و ΔG تشکیل آن‌ها توجه نمایید. دمای پایین‌تر از ۴۰ درجه معمولاً اشکالی به وجود نمی‌آورد. هم‌چنین ΔG تا ۹/۵- اشکالی به وجود نمی‌آورد، اما ΔG های منفی‌تر مشکل‌ساز خواهند بود.
- (۱۷) در صورت نیاز به افزودن جایگاه برش آنزیم‌های محدودکننده به پرایمرها، جایگاه برش باید به سمت^۹ پرایمر اضافه شود. هم‌چنین لازم است بین ۳-۶ نوکلئوتید به عنوان جایگاه نشست آنزیم در سمت^۹ جایگاه برش افزوده گردد. ترتیب توالی به شرح زیر می‌باشد:
- ۳' توالی پرایمر - جایگاه برش آنزیم محدودکننده - جایگاه نشست مناسب آنزیم محدودکننده ۵'

1. Melting Temperature
2. Repeat
3. Mismatch
4. Palindrome Sequence
5. Annealing
6. Hair-pin
7. Self-Dimer
8. Hetero-Dimer

نکته: افزودن چند نوکلئوتید به عنوان جایگاه نشست آنزیم محدود کننده باعث افزایش کارایی آن می گردد و به اصطلاح از سر خوردن آنزیم از روی جایگاه برش ممانعت می نماید. نوع و تعداد نوکلئوتیدهایی که به این منظور اضافه می شوند در مورد هر آنزیم متفاوت است و در میزان کارایی آن آنزیم تأثیرگذار می باشد. لیست نوکلئوتیدهای مناسب که می توان به عنوان جایگاه نشست هر آنزیم محدود کننده استفاده نمود در انتهای این کتاب در قسمت پیوست آورده شده است.

- ۱۸) پرایمرهای طراحی شده باید تنها یک قطعه توالی مورد نظر را تکثیر کنند و به هیچ بخش دیگری از آن توالی یا کل DNA ژنومی متصل نشوند.
- ۱۹) طول قطعه ای که می خواهید تکثیر شود بین ۱-۱۰ kb باشد.

روش‌های مختلف طراحی پرایمر و بررسی ویژگی‌های پرایمرها

L

طراحی پرایمر بدون استفاده از نرم‌افزار

برای طراحی پرایمر Forward، کافی است بخشی از رشته بالایی DNA الگو را به عنوان پرایمر Forward انتخاب نمایید. برای طراحی پرایمر Reverse، کافی است بخشی از رشته پایینی DNA الگو را به عنوان پرایمر Reverse انتخاب نمایید (شکل ۱).

Forward

5' CTGCATTGACCTAAGC 3'

5' CTGCATTGACCTAAGCACGTTTGAGACGCTAAGCTAATGTACTGACCA 3' Template
3' GACGTAAGTGGATTCGTGCAAACTCTGCGATTCGATTACATGACTGGT 5' DNA

3' CGATTACATGACTGGT 5'

Reverse

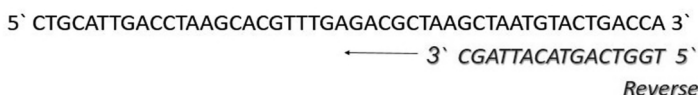
شکل ۱. طراحی پرایمر بدون استفاده از نرم‌افزار

مرحله بعد ارسال توالی پرایمرها به شرکت های سنتز پرایمر است. به این منظور لازم است که توالی پرایمرها از سمت 5' نوشته شود. به عنوان نمونه، طرز نوشتن پرایمرهای مثال بالا به این ترتیب می باشد.

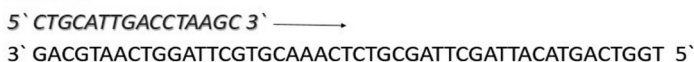
Forward: CTGCATTGACCTAAGC

Reverse: TGGTCAGTACATTAGC

در هنگام تکثیر شدن توسط PCR، پس از باز شدن دو رشته DNA الگو، پرایمر Forward که مکمل رشته پایینی است به آن متصل می‌شود. با اضافه شدن نوکلئوتیدهای مکمل رشته پایینی به انتهای ۳' پرایمر Forward و در نتیجه طویل شدن این پرایمر (که از جهت ۵' به ۳' انجام می‌شود)، DNA دو رشته‌ای ساخته می‌شود. هم‌چنین پرایمر Reverse که مکمل رشته بالایی است به آن متصل شده و با اضافه شدن نوکلئوتیدهای مکمل رشته بالایی به انتهای ۳' پرایمر Reverse و طویل شدن این پرایمر (که از جهت ۵' به ۳' انجام می‌شود)، DNA دو رشته‌ای ساخته می‌شود (شکل ۲).



Forward



شکل ۲. نحوه اتصال پرایمرها به توالی DNA الگو

طراحی پرایمر با استفاده از ابزار Primer BLAST در پایگاه داده NCBI

وارد پایگاه داده NCBI به آدرس www.ncbi.nlm.nih.gov شوید. Nucleotide را انتخاب نمایید. Accession number و یا نام ژن موردنظر خود را در بخش جستجو وارد کنید. به عنوان مثال نتیجه جستجوی ژن اینترفرون بتا را در شکل ۳ مشاهده می‌نمایید. در این صفحه فهرستی از ژن‌ها با کلیدواژه‌ای که جستجو شده است نمایش داده می‌شود. بسته به جنس^۱ موجود موردنظر یا نوع توالی باید از این لیست ژن خود را انتخاب نمایید (شکل ۳).
نکته: انتخاب نمودن ژن موردنظر از لیست ژن‌هایی که نمایش داده می‌شوند، بستگی به هدف و نوع آزمایش شما دارد، با این وجود چند اصل کلی برای انتخاب ژن موردنظر در ادامه ذکر می‌گردد:
 (۱) اگر رونوشت‌های^۲ مختلفی برای یک ژن وجود داشت، طولانی‌ترین آن‌ها را انتخاب نمایید، زیرا کامل‌تر است و شامل همه اگزون‌ها و اینترون‌ها می‌باشد، درحالی‌که بقیه، محصولات مختلف پیرایش جایگزین^۳ می‌باشند.

(۲) اگر هدف بررسی بیان ژن باشد، باید پرایمرها برای mRNA جهت استفاده در real-time PCR طراحی شوند.

(۳) اگر هدف کلونینگ قطعه تکثیر شده و تولید پروتئین باشد، باید پرایمرها برای توالی کدکننده (CDS)^۴ جهت استفاده در PCR طراحی شوند (شکل ۴).

1. Species
2. Transcript
3. Alternative Splicing
4. Coding DNA Sequence

NCBI Resources How To Sign in to NCBI

Nucleotide Nucleotide interferon beta Search

Create alert Advanced Help

The Nucleotide database will include EST and GSS sequences in early 2019. [Read more.](#)

Species Animals (1,023) Plants (1) Archaea (2) Viruses (28) Customize ...

Molecule types genomic DNA/RNA (1,866) mRNA (462) Customize ...

Source databases INSDC (GenBank) (1,980) RefSeq (405) Customize ...

Sequence Type Nucleotide (2,304)

Summary 20 per page Sort by Default order Send to: Filters: Manage Filters

See IFNG (INTERFERON) interferon gamma in the Gene database
interferon reference sequences Transcript (1) Protein (1)

Items: 1 to 20 of 2419

<< First < Prev Page 1 of 121 Next > Last >>

☐ Human interferon-beta mRNA, complete cds

1. 838 bp linear mRNA
Accession: M25460.1 GI: 184622
[Protein](#) [PubMed](#) [Taxonomy](#)
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)

☐ Sus scrofa interferon beta 1 (IFNB1) mRNA

2. 561 bp linear mRNA
Accession: NM_001003923.1 GI: 51491897
[Protein](#) [PubMed](#) [Taxonomy](#)

Results by taxon

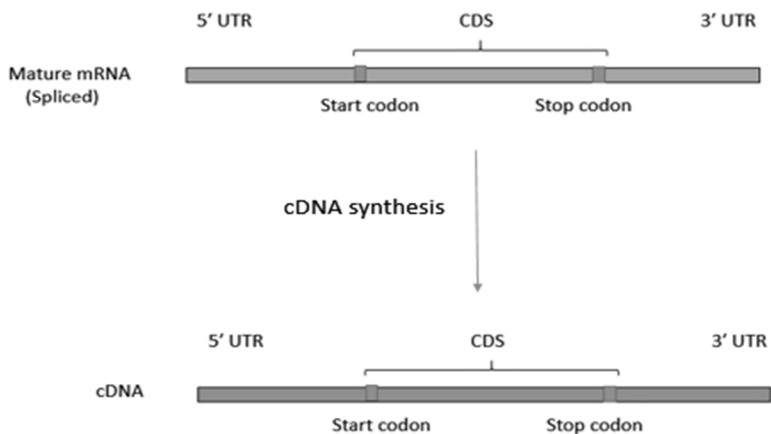
Top Organisms [\[Tree\]](#)
synthetic construct (641)
Homo sapiens (453)
unidentified (164)
Mus musculus (160)
Bos taurus (18)
All other taxa (983)
More...

Find related data

Database: Select

Find items

شکل ۳. نتیجه جستجوی ژن اینترفرون بتا در پایگاه NCBI



شکل ۴. تصویر شماتیک ناحیه (CDS) Coding DNA Sequence

روی نام توالی موردنظر کلیک کنید. صفحه‌ای باز می‌شود که تمام اطلاعات آن توالی را دارد. از سمت راست صفحه گزینه Pick Primers را انتخاب نمایید (شکل ۵).

NCBI Resources How To Sign in to NCBI

Nucleotide Nucleotide Search Help

Advanced

The Nucleotide database will include EST and GSS sequences in early 2019. [Read more](#)

GenBank Send to: Change region shown

Human interferon-beta mRNA, complete cds

GenBank: M25460.1

FASTA Graphics

LOCUS HUMIFNB 838 bp mRNA linear PRI 01-JAN-1995

DEFINITION Human interferon-beta mRNA, complete cds.

ACCESSION M25460

VERSION M25460.1

KEYWORDS interferon-beta.

SOURCE Homo sapiens (human)

ORGANISM [Homo sapiens](#)

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCE 1 (bases 1 to 838)

AUTHORS Fiers,W., Remaut,E., Devos,R., Cheroutre,H., Contreras,R.R., Gheysen,D., Degraeve,W.M., Stanssens,P., Tavernier,J., Taya,Y. and Content,J.

TITLE The human fibroblast and human immune interferon genes and their

Analyze this sequence

Run BLAST

Pick Primers

Highlight Sequence Features

Find in this Sequence

Articles about the IFNB1 gene

SAMHD1 deficient human monocytes autonomously trigger [Mol Immunol. 2018]

شکل ۵. نمایش اطلاعات ژن اینترفرون بتا در پایگاه NCBI

صفحه Primer BLAST باز می‌شود که Accession number ژن موردنظر در آن نوشته شده است. البته در صورتی که توالی ژن موردنظر را داشته باشید می‌توانید به‌طور مستقیم وارد صفحه Primer BLAST به آدرس <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast> شوید و توالی ژن را در قسمت مربوط به خودش کپی نمایید.

سپس بازه‌ای از توالی ژن مورد نظر را که می‌خواهید پرایمرها برای آن محدوده طراحی شوند تعیین کنید. هم‌چنین می‌توانید طول محصول PCR را مشخص نمایید. تعداد پرایمرهایی که طراحی می‌شوند به‌صورت پیش‌فرض ۱۰ جفت می‌باشد که می‌توانید تعداد دیگری را انتخاب نمایید. در صورتی که مایلید هم‌زمان با طراحی پرایمر Blast هم انجام شود، بسته به نوع کاری که انجام می‌دهید پایگاه داده موردنظر را که می‌خواهید پرایمرهایتان علیه آن Blast شوند را انتخاب نمایید. بقیه گزینه‌ها را که در حالت پیش‌فرض قرار گرفته‌اند تغییر ندهید. روی گزینه get primers کلیک کنید (شکل ۶).

Primer-BLAST
A tool for finding specific primers
Finding primers specific to your PCR template (using Primer3 and BLAST)

PCR Template

Enter accession, gi, or FASTA sequence (A refseq record is preferred) **Accession number**
و یا نام FASTA
Or upload FASTA file No file chosen

Range
Forward primer From To
Reverse primer 100 718

Primer Parameters

Use my own forward primer
Use my own reverse primer
PCR product size
Min Max
of primers to return
Min Max
Primer melting temperatures (T_m)
Min Opt Max Max T_m difference

Exon/Intron selection

A refseq mRNA sequence as PCR template input is required for options in this section

Exon junction span
Exon junction match
Exon at 5' end Exon at 3' end
Minimal number of bases that must anneal to exons at the 5' or 3' side of the junction
Intron inclusion
Intron length range
Min Max

Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow

Primer Pair Specificity Checking Parameters

Specificity check
Search mode
Database
Exclusion
Organism
Enter an organism name (or organism group name, such as eukaryote, prokaryote, rodentia), taxonomy id or select from the suggestion list as you type
Add more organisms
Entrez query (optional)
Primer specificity stringency
Primer must have at least total mismatches to unintended targets, including
at least mismatches within the last bps at the 3' end
Ignore targets that have or more mismatches to the primer
Max target size
Allow splice variants

☐ Show results in a new window ☐ Use new graphics view

شکل ۶. نحوه طراحی و Blast نمودن پرایمر به طور هم زمان با استفاده از ابزار primer blast از پایگاه داده NCBI

نکته: در صورتی که پرایمرها برای استفاده در real-time PCR طراحی شده‌اند، لازم است علاوه بر Refseq mRNA، یک بار هم علیه Refseq representative genome Blast شوند. زیرا زمان استخراج RNA از سلول، همواره مقداری آلودگی با DNA وجود خواهد داشت. در صورتی که توالی‌هایی مشابه توالی هدف شما در پایگاه داده یافت شوند، صفحه‌ای مانند شکل زیر باز می‌شود که آن توالی‌ها را به شما نشان می‌دهد. همان طور که در شکل زیر مشخص است ژن هدف در مثال ما CDS اینترفرون بتا است. mRNA اینترفرون بتا با بیش از ۹۸٪ شباهت هم وجود دارد (شکل ۷). در صورتی که می‌خواهید برای توالی‌های مشابه نشان داده شده نیز پرایمر طراحی شود، لازم است آن‌ها را انتخاب نمایید. در غیر این صورت کافی است روی گزینه Submit کلیک کنید.

NIH U.S. National Library of Medicine NCBI National Center for Biotechnology Information Sign in to NCBI

Primer-BLAST

A tool for finding specific primers

Finding primers specific to your PCR template (using Primer3 and BLAST)

Input PCR template: M25460.1 Human interferon-beta mRNA, complete cds
Range: 1 - 715

Your PCR template is highly similar to the following sequence(s) from the search database. To increase the chance of finding specific primers, please review the list below and select all sequences (within the given sequence ranges) that are intended or allowed targets.

Select: All None Selected: 0

Accession	Title	Identity	Alignment length	Seq. start	Seq. stop
NM_002176.4	Homo sapiens interferon beta 1 (IFNB1) mRNA	98.17%	712	3	714

Submit Show results in a new window

شکل ۷. نتیجه جستجوی Accession number زن اینترفرون بتا

پس از چند دقیقه طراحی شده و علیه پایگاه داده‌ای که مشخص نموده‌اید Blast می‌شوند. سپس نتیجه کار در پنجره جدید نمایش داده خواهد شد. جفت پرایمرهایی که طراحی شده‌اند به همراه ویژگی‌های مهم و نتیجه Blast آن‌ها در پایین صفحه لیست می‌شوند که شما می‌توانید از میان آن‌ها پرایمر مناسب خود را انتخاب نمایید (شکل ۸).

Primer-BLAST» JOB ID:W1GEuKI+5slqKqtp82On83Wn63wY5w6Q

Primer-BLAST Results

Input PCR template: M25460.1 Human interferon-beta mRNA, complete cds
Range: 1 - 715
Specificity of primers: primers may not be specific to the input PCR template as targets were found in selected database Refseq mRNA (Organism limited to Homo sapiens)...
Other reports: Search Summary

Graphical view of primer pairs

Genes, Loading...
M25460.1: 1-715
Primer pair for job W1GEuKI+5slqKqtp82On83Wn63wY5w6Q: Loading...
Primer 1: 5'-CTGTGCTGTGTTGACATGA-3'
Primer 2: 5'-AGAGCAGCAGCTAGAGAT-3'
Product length: 603

نمایش گرافیکی پرایمرهایی که طراحی شده‌اند و محل اتصال آن‌ها به توان هدف

Detailed primer reports

پرایمرهایی که طراحی شده‌اند به همراه نتیجه ی Blast آن‌ها در پایین صفحه لیست می‌شوند

ویژگی‌های مهم پرایمرها

Primer pair 1	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CTGTGCTGTGTTGACATGA	Plus	21	58	78	58.79	47.62	4.00	3.00
Reverse primer	AGAGCAGCAGCTAGAGAT	Minus	20	660	641	59.74	55.00	4.00	2.00
Product length	603								

Products on potentially unintended templates

>NM_002176.4 Homo sapiens interferon beta 1 (IFNB1) mRNA

product length = 683
Forward primer: 1 CTGTGCTGTGTTGACATGA 21
Template: 57 ...T.....CA..... 77
Reverse primer: 1 AGAGCAGCAGCTAGAGAT 20
Template: 659CC.....G 648

>NM_017516.6 Homo sapiens solute carrier family 35 member F2 (SLC35F2) mRNA

product length = 883
Forward primer: 1 CTGTGCTGTGTTGACATGA 21
Template: 1372 ...T.....AG.....G 1392
Reverse primer: 1 AGAGCAGCAGCTAGAGAT 20
Template: 2254 ..T.....CC.....G 2235

شکل ۸. نتیجه طراحی و Blast نمودن پرایمرها به‌طور هم‌زمان با استفاده از

ابزار primer blast از پایگاه داده NCBI



پرایمرهای پیشنهادی این سایت همیشه قابل اطمینان نیستند و حتی گاهی مشکلات فاحشی نیز دارند بنابراین لازم است که این پرایمرها با نرم افزارهای دیگر نیز بررسی شوند. هم چنین هر کدام از ابزارهای طراحی پرایمر نقاط قوت و ضعفی دارند. به طور مثال؛ همان طور که در شکل مشاهده می شود تعداد Self complementary نشان داده شده است اما دما و ΔG آن ها مشخص نیست. علاوه بر این احتمال وجود لوپ و هترو دایمر مشخص نیست. با نرم افزار GeneRunner می توان تمام ویژگی های پرایمرها از جمله دما و ΔG ساختارهای ثانویه، از قبیل ساختار سنجاق سری، اتصال پرایمر با خودش یا با پرایمر دیگر را بررسی کرد. هم چنین می توان تعداد و نحوه اتصال نوکلئوتیدها در این ساختارهای ثانویه را مشاهده نمود. لازم به ذکر است که با نرم افزار GeneRunner هم می توان پرایمر طراحی کرد و هم می توان ویژگی های پرایمرهایی را که با استفاده از ابزار دیگری طراحی شده است، بررسی نمود. در بخش بعدی کتاب، طراحی پرایمر با نرم افزار GeneRunner آموزش داده خواهد شد. لازم به ذکر است که نرم افزار GeneRunner را می توانید به صورت رایگان از سایت اصلی آن به آدرس <http://www.generunner.net/> دانلود نمایید.

بررسی ویژگی های پرایمرهایی که با استفاده از Primer BLAST طراحی شده اند با نرم افزار GeneRunner

برای بررسی ویژگی های پرایمرهایی که با استفاده از ابزار دیگری مانند Primer BLAST طراحی شده اند، پس از اجرای نرم افزار GeneRunner کافی است از نوار بالای صفحه روی Analysis کلیک نموده و از پنجره ای که باز می شود Oligo را انتخاب نمایید و در صفحه ای که باز می شود توالی پرایمری را که می خواهید بررسی نمایید، وارد کنید. تمام ویژگی های آن پرایمر برای شما نمایش داده خواهد شد. سپس با کلیک روی گزینه Switch و وارد نمودن توالی پرایمر دیگر قادر خواهید بود ویژگی های هر پرایمر را به تنهایی بررسی نموده و یا با هم مقایسه نمایید. هم چنین می توانید احتمال ایجاد ساختارهای ثانویه بین دو پرایمر را بررسی کنید. روش انجام این مراحل در بخش "طراحی پرایمر با استفاده از نرم افزار GeneRunner" به طور کامل، با تصویر و ذکر جزئیات توضیح داده شده است.

تجزیه و تحلیل نتایج Blast

(۱) در صورتی که پرایمرها علاوه بر قطعه مورد نظر، قطعه یا قطعه های دیگری را هم تکثیر می نماید، بهتر است پرایمرها را عوض کنید. البته برای real-time PCR این مسئله جدی تر است و هیچ قطعه دیگری را نباید تکثیر نمایند.

(۲) در صورتی که طول قطعه ای که به طور غیر اختصاصی تکثیر می شود، کوچک تر از قطعه اختصاصی باشد، به هیچ وجه نمی توان از تکثیر این محصول غیر اختصاصی جلوگیری نمود. بنابراین حتماً باید پرایمرها را عوض کنید.

(۳) قطعات غیر اختصاصی بزرگ تر از ۵۰۰ bp مشکلی ایجاد نمی کنند زیرا در PCR معمولی تکثیر نمی شوند.

۴) در صورتی که از آنزیم Taq پلیمرز استفاده می‌کنید، قطعات غیراختصاصی بزرگ‌تر از ۵۰۰۰ bp مشکلی ایجاد نمی‌کنند، زیرا این آنزیم قادر به تکثیر قطعات بزرگ‌تر از ۵۰۰۰ bp نیست.

۵) اگر طول قطعه غیراختصاصی بیش‌تر از ۲۰۰۰ bp باشد نیز مشکلی ایجاد نمی‌کند، چون با تغییر شرایط PCR حذف می‌شود.

۶) اگر قطعه غیراختصاصی اختلاف طول فاحشی با قطعه موردنظر داشته باشد، مشکلی ایجاد نمی‌کند، زیرا با کاهش زمان طویل‌سازی^۱ و افزایش دمای اتصال^۲ حذف می‌شود.

۷) در صورتی که حداقل یکی از پرایمرها در سمت ۳' خود، با قطعه غیراختصاصی در دو ناحیه یا بیش‌تر نوکلئوتیدهای ناهمخوان^۳ داشته باشد تکثیر انجام نمی‌شود.

۸) در صورتی که حداقل یکی از پرایمرها، با قطعه غیراختصاصی، در شش ناحیه یا بیش‌تر نوکلئوتیدهای ناهمخوان داشته باشد تکثیر انجام نمی‌شود.

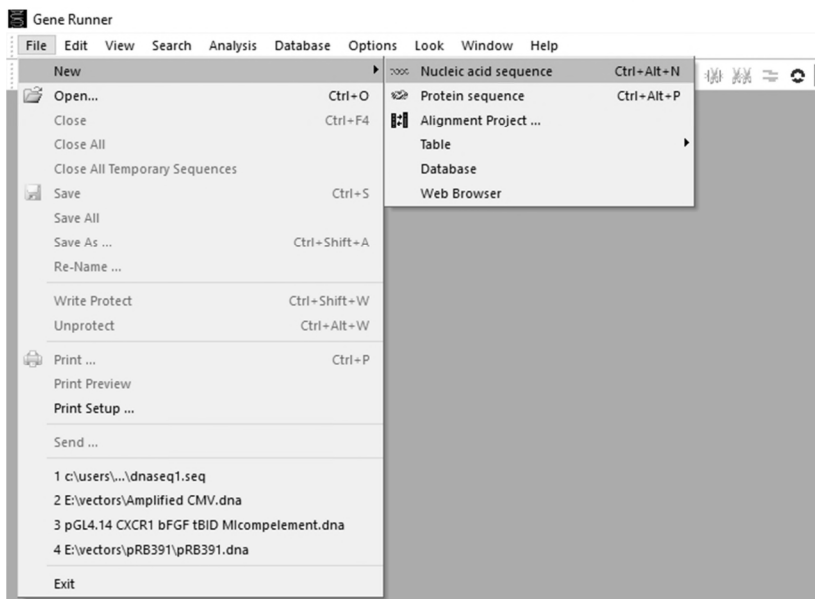
۹) از آنجایی که اتصال هر دو پرایمر برای تکثیر ضروری است، در صورتی که یکی از پرایمرها کاملاً به قطعه غیراختصاصی متصل شود اما دیگری در نواحی زیادی عدم تطابق داشته باشد، تکثیر اتفاق نمی‌افتد.

روش تغییر دادن پرایمر به منظور جلوگیری از اتصال پرایمر به توالی‌های غیراختصاصی با هدف حذف نمودن محصولات غیراختصاصی

به منظور حذف محصولات غیراختصاصی که توسط پرایمرها تکثیر می‌شوند، باید یکی از پرایمرها را طوری تغییر دهید که در سمت ۳' پرایمر، با قطعه غیراختصاصی در دو ناحیه یا بیش‌تر نوکلئوتیدهای ناهمخوان داشته باشد تا پرایمر نتواند به توالی غیراختصاصی متصل شود. به‌طور مثال؛ توالی یکی از پرایمرها را از سمت ۳' افزایش دهید. پس از تغییر پرایمر لازم است که دوباره تمام ویژگی‌های پرایمرها بررسی شود. در صورتی که اختلاف T_m دو پرایمر بیش‌تر از ۲ شده بود، طول پرایمر دیگر را از سمت ۵' افزایش دهید و دوباره تمام ویژگی‌های پرایمرها را بررسی نمایید.

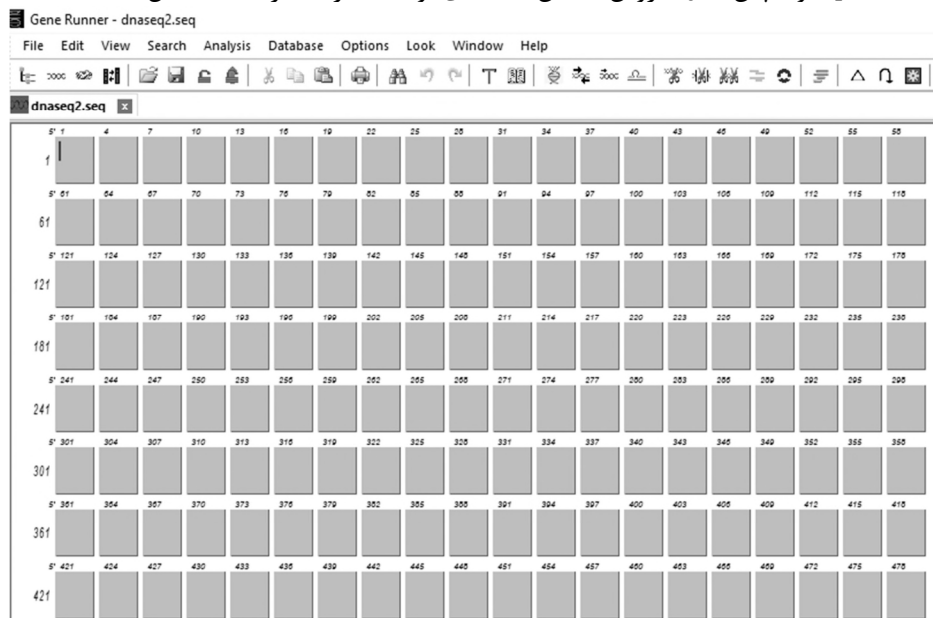
طراحی پرایمر با استفاده از نرم‌افزار GeneRunner

نرم‌افزار GeneRunner را می‌توانید به‌صورت رایگان از سایت اصلی آن <http://www.generunner.net/> دانلود نمایید. پس از نصب آن را اجرا کنید. در صفحه اصلی نرم‌افزار، گزینه New, File و سپس Nucleic acid sequence را انتخاب کنید (شکل ۹).



شکل ۹. روش وارد نمودن یک توالی در نرم‌افزار GeneRunner

صفحه‌ای مانند شکل ۱۰ باز خواهد شد که می‌توانید توالی ژن الگو را در این قسمت کپی کنید. در این صفحه، نوکلئوتیدها به صورت ۳ تایی و با فاصله از هم نمایش داده خواهند شد. البته شما می‌توانید از قسمت Options و سپس Style روش نمایش اسیدهای نوکلئیک را تغییر دهید (شکل ۱۰).



شکل ۱۰. نمایشی از صفحه مربوط به وارد نمودن توالی در نرم‌افزار GeneRunner

در صورتی که توالی ژن الگو را دارید، آن را در این قسمت کپی کنید. هم‌چنین در صورتی که توالی ژن موردنظر را ندارید می‌توانید برای گرفتن آن به پایگاه داده NCBI مراجعه نمایید. روش این کار در ادامه توضیح داده شده است.

روش جستجو و به دست آوردن فرمت FASTA توالی ژن موردنظر از پایگاه داده NCBI

در صورتی که توالی ژن موردنظر را ندارید می‌توانید آن را از پایگاه داده NCBI به آدرس www.ncbi.nlm.nih.gov به دست بیاورید. برای این کار Nucleotide را انتخاب نمایید. Accession number و یا نام ژن موردنظر خود را در بخش جستجو وارد کنید (شکل ۱۱). به عنوان مثال نتیجه جستجوی ژن اینترفرون بتا را در شکل ۱۱ مشاهده می‌نمایید. در این صفحه فهرستی از ژن‌ها با کلیدواژه‌ای که جستجو شده است نمایش داده می‌شود. بسته به جنس و گونه موردنظر یا نوع توالی باید از این لیست، ژن خود را انتخاب نمایید. پس از انتخاب توالی موردنظر روی گزینه FASTA در قسمت پایین نام ژن کلیک نمایید.

The screenshot shows the NCBI Nucleotide search interface. The search bar contains 'interferon beta'. Below the search bar, there is a message: 'The Nucleotide database will include EST and GSS sequences in early 2019. Read more.' The results are displayed in a table with columns for Species, Summary, and Items. The first item is 'Human interferon-beta mRNA, complete cds' with accession number M25460.1. The FASTA link is highlighted with an arrow. The right sidebar shows 'Results by taxon' with a list of organisms including Homo sapiens (453) and Mus musculus (160).

شکل ۱۱. نتیجه جستجو و به دست آوردن فرمت FASTA ژن اینترفرون بتا از

پایگاه داده NCBI

صفحه‌ای مشابه شکل ۱۲ باز می‌شود که توالی آن ژن با فرمت FASTA در آن صفحه موجود است (شکل ۱۲). با انتخاب گزینه FASTA در بالا و سمت چپ این صفحه، می‌توان توالی موردنظر را انتخاب و کپی نمود.



بعد از آن در صفحه اول نرم افزار GeneRunner، گزینه New، File و سپس Nucleic acid sequence را انتخاب کنید. در صفحه‌ای که باز می‌شود توالی مورد نظر را paste کنید (شکل ۱۳). برای مثال در ادامه توالی ژن اینترفرون بتا را در نرم افزار وارد نموده و برای آن پرایمر طراحی خواهیم کرد.

