

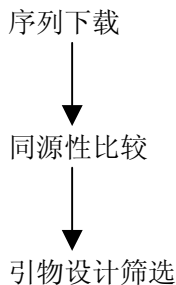


# 引物设计的原理和程序

## 一、设计原理

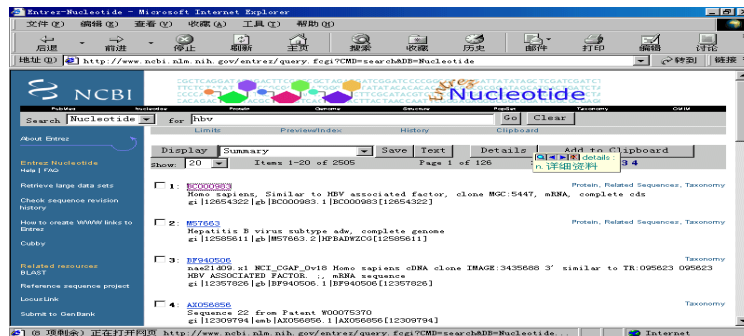
- 1、择合适的靶序列：设计引物之前，必须分析待测靶序列的性质，选择高度保守、碱基分布均匀的区域进行引物设计。
- 2、长度：一般来说，寡核苷酸引物长度为 15~30bp。
- 3、T<sub>m</sub> 值：引物的 T<sub>m</sub> 值一般控制在 55~60℃，尽可能保证上下游引物的 T<sub>m</sub> 值一致，一般不超过 2℃。若引物中的 G+C 含量相对偏低，则可以使引物长度稍长，而保证一定的退火温度。
- 4、(G+C) 含量：有效引物中 (G+C) 的比例一般为 40~60%。
- 5、碱基的随机分布：引物中四种碱基的分布最好是随机的，不存在聚嘌呤和聚嘧啶，尤其在引物的 3' 端不应超过 3 个连续的 G 或 C。
- 6、引物自身：引物自身不存在连续 4 个碱基以上的互补序列，如回文结构，发夹结构等，否则会影响到引物与模板之间的复性结合，尤其避免 3' 末端的互补。

## 二、引物设计操作流程



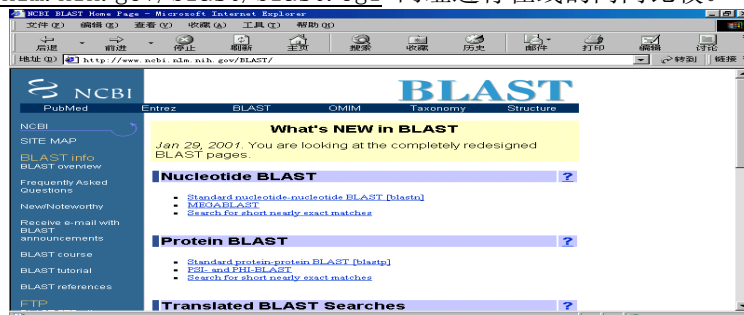
### 1、序列查找

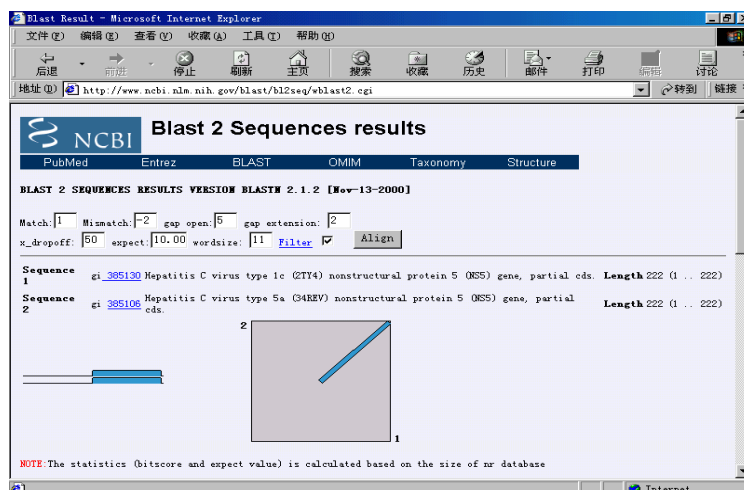
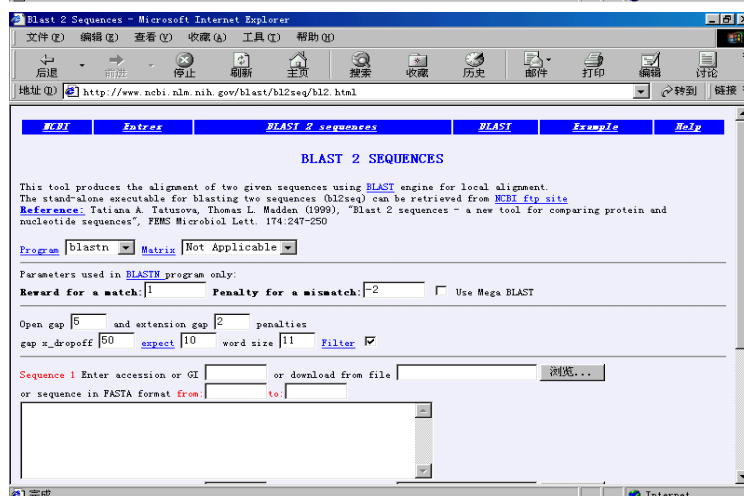
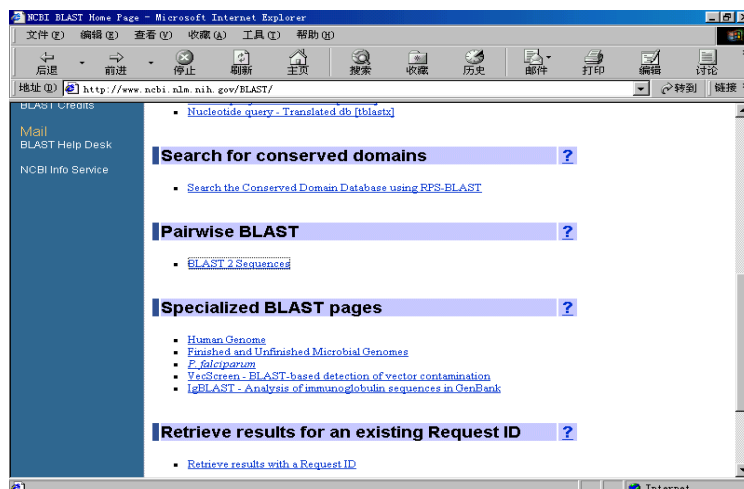
根据所需检测的病原体或者待检特定基因，在 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> 网址查询有关序列。



### 2、同源性比较 主要有两种方法

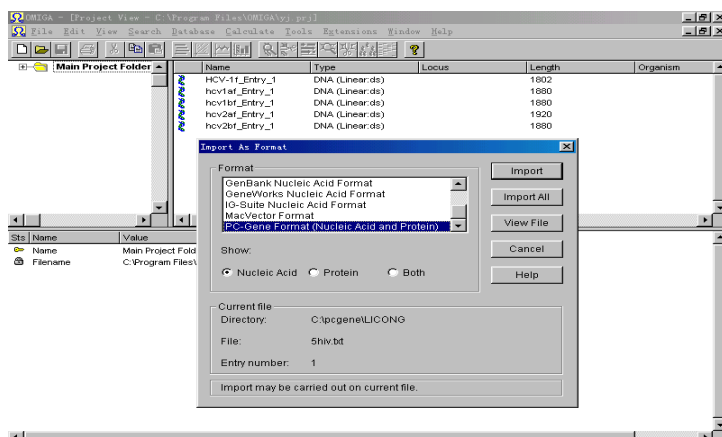
A、在 [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi) 网址进行在线的两两比较。



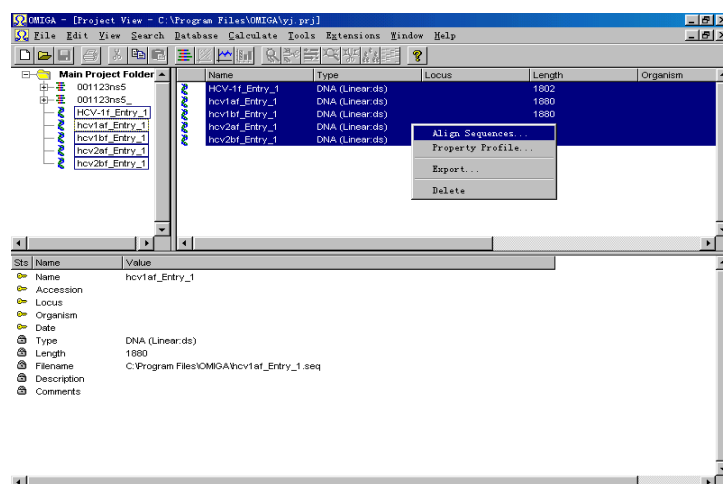


B、采用 OMIGA, PCGENE 等软件进行两两或多序列比较。

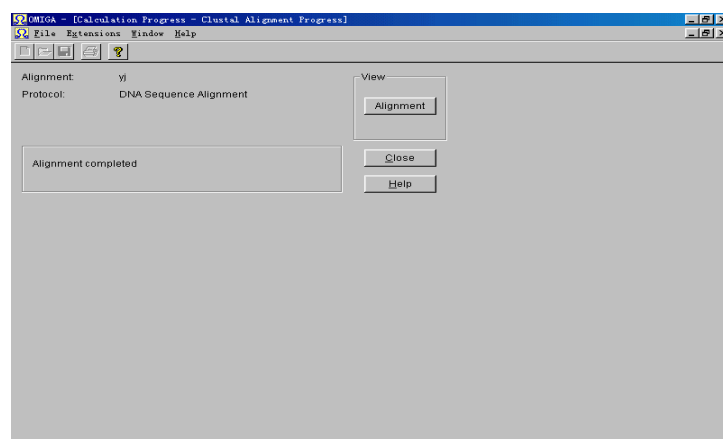
1、打开 OMIGA 软件，导入 (import) 下载存盘的纯文本序列文件：



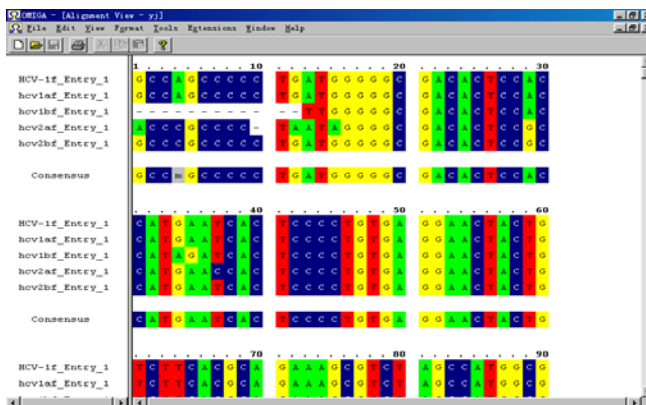
2、选择待比较的多条序列，右键点击“align sequences”命令；



3、等待计算机处理，直至状态显示排列结束，点击“alignment”显示结果；

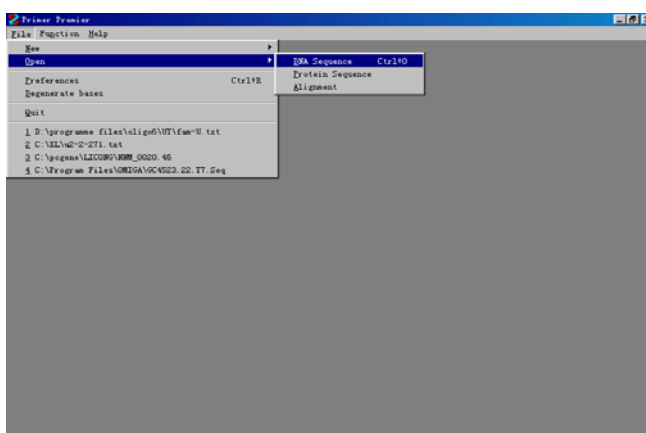


4、“alignment”结果，相同碱基以同色标记

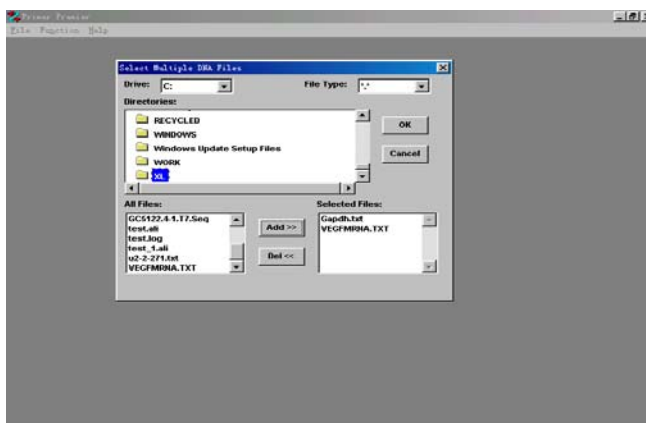


### 三、引物设计与筛选 Primer Premier 5.0 软件为例，进行引物设计和筛选的操作示范

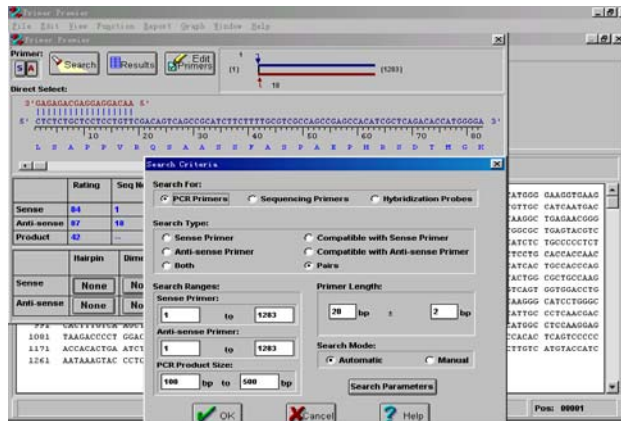
#### 1、打开软件，调入序列



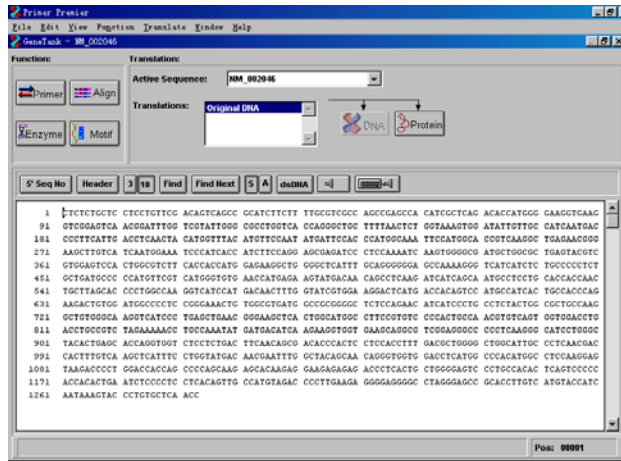
#### 2、选择路径，选择序列文件名，加入右框



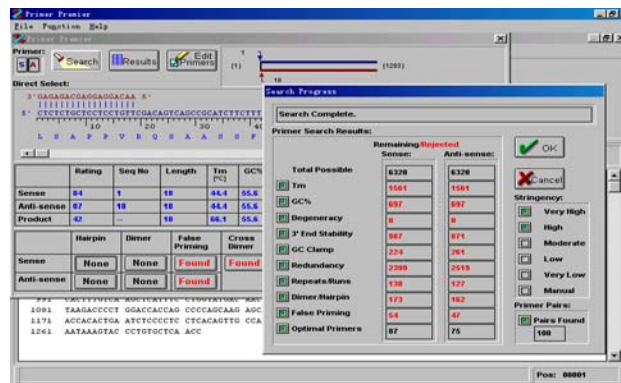
3、序列文件显示如图，点击“primer”；



4、按照引物设计的原理，设定引物的各种参数，点击“确定”进行引物搜寻



5、等待引物搜寻，显示结束后，点击“确定”，进入下一页；



6、按照搜寻结果显示，逐条分析，在主窗口中检查该引物对的二级结构情况，依次筛选

