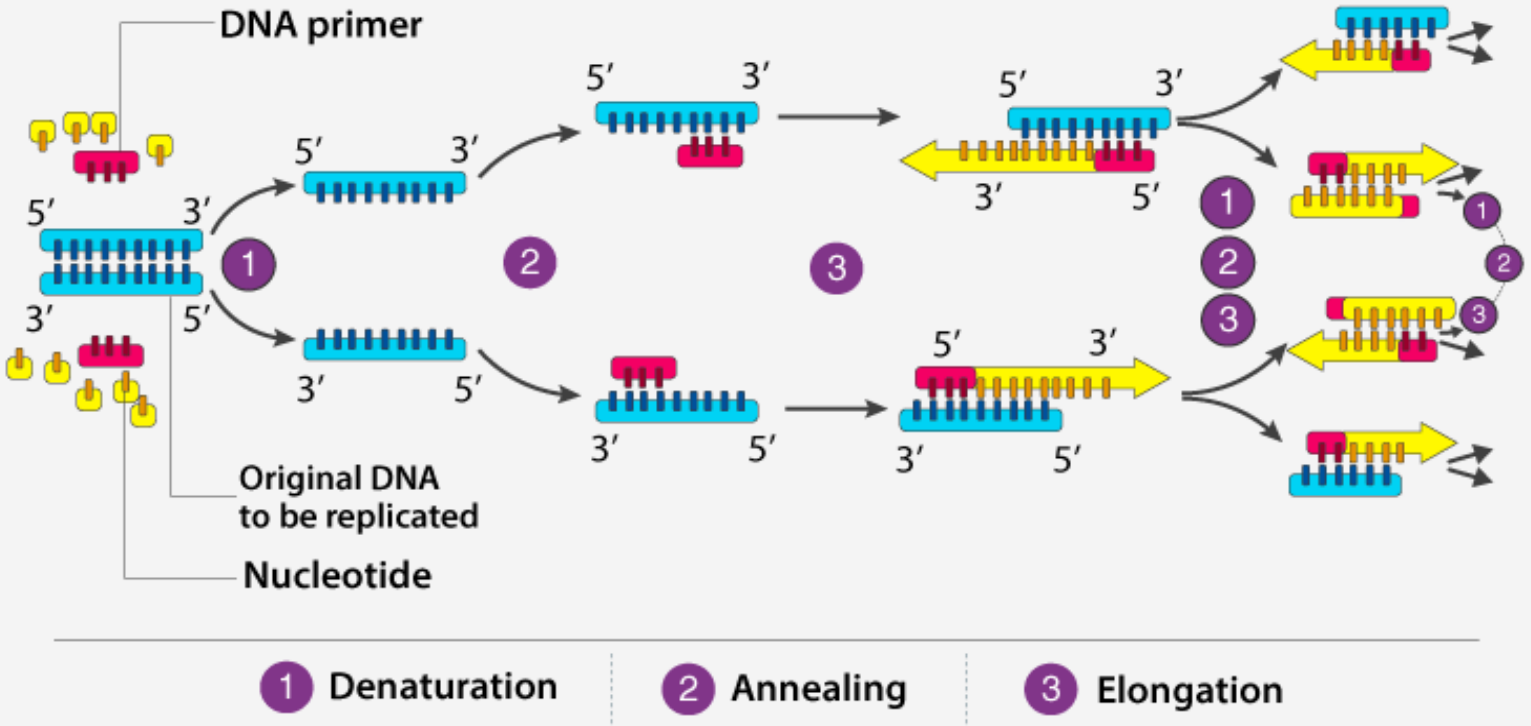
01

اصول طراحی پرایمر

01

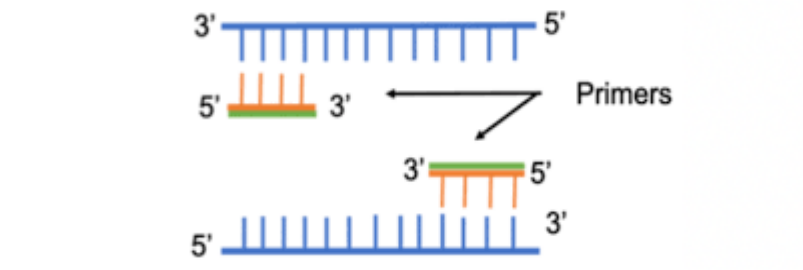
کاربردهای pcr

POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

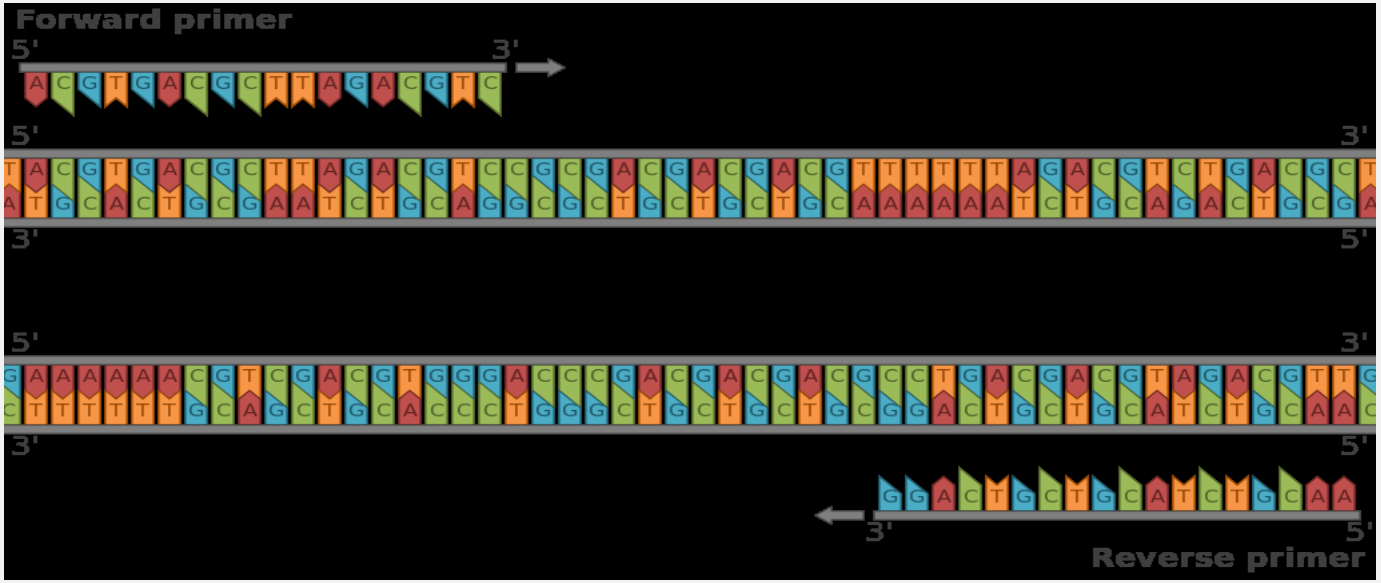


01

اصول طراحی پرایمر



- پرایمر رشته نوکلئیک اسیدی میباشد که بعنوان نقطه شروع سنتز DNA بکار می رود.

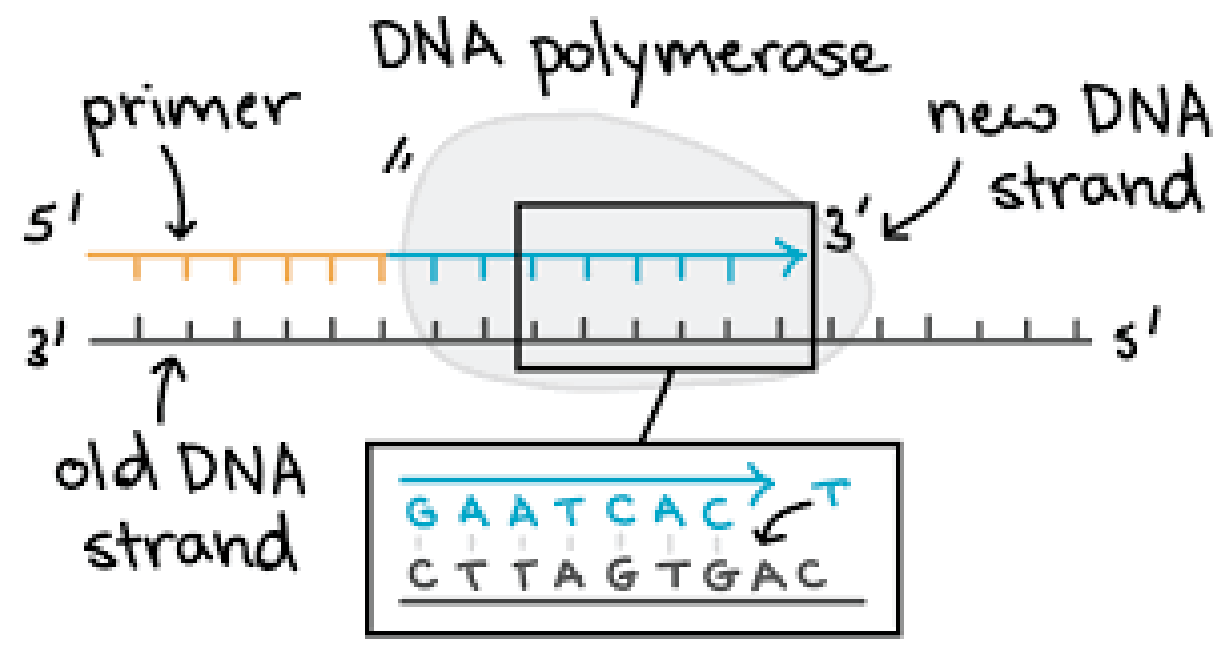


02

چرا پرایمر مورد نیاز میباشد؟؟؟؟؟

02

- DNAپلی مرازها تنها میتوانند به رشته از قبل موجود نوکلئوتیدها رو اضافه کنند.



توالی هدف و طراحی پرایمر به طور قبل ملاحضه ای بر کارایی PCR اثر می گذارد.

مراحل لازم در حین طراحی پرایمر:

- جستجوی پایگاه های اطلاعاتی و مقالات برای پرایمرهای موجود
- انتخاب توالی هدف
- طراحی پرایمر
- بررسی اختصاصیت پرایمرهای طراحی شده
- ارزیابی پرایمرهای طراحی شده

توالی هدف برای PCR

PCR معمولی: (~500) **200-800 bp** product

Real Time PCR: (~100) **75-200 bp**

محصولات کوتاه تر نسبت به محصولات بلندتر با کارایی بیشتری تکثیر می شوند اما طول محصول تکثیری باید حداقل 75 باز باشد تا براحتی از دایمر پرایمرها قابل تمایز باشند.

ویژگی یک پرایمر خوب

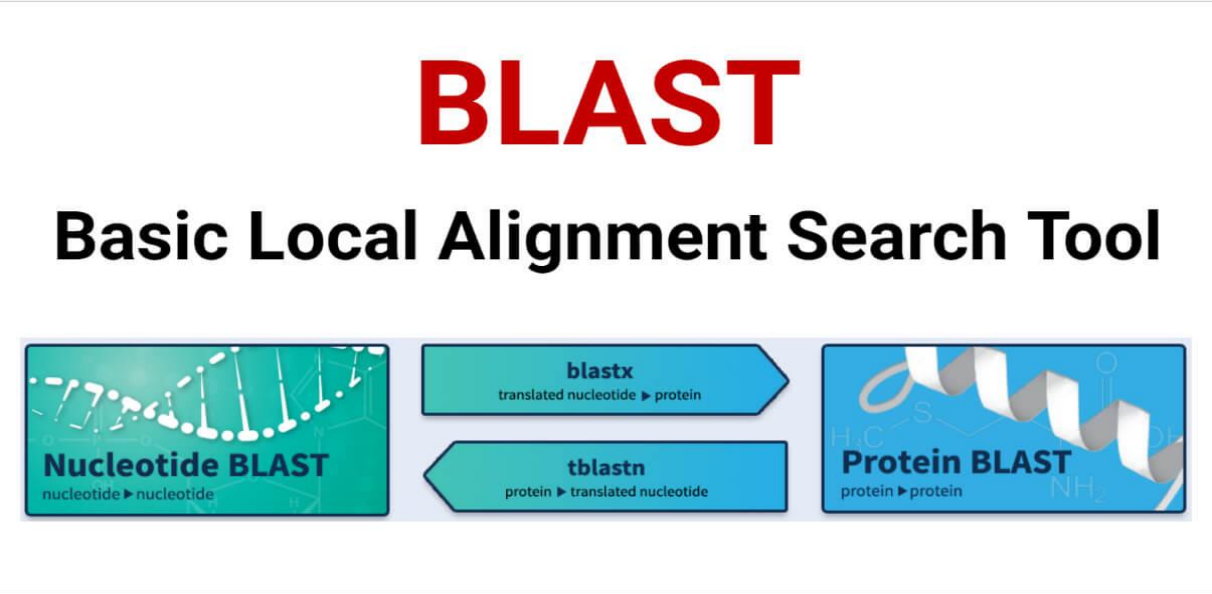
- محتوای GC پرایمر بین **40–60%** باشد.
- دمای ذوب (**Tm**) بین **50 C to 65 C** (52-58 C)
- فاقد توانایی تشکیل ساختارهای سنجاق سری و ثانویه باشد.
- وجود باز G یا C در 5 باز انتهای 3 پرایمر (**GC clamp**)

5‘-CCGATATGCCAGCTA**TCTGT**-3’

اختصاصیت

باید تنها یک جایگاه هدف در DNA الگو وجود داشته باشد که پرایمر به آن متصل گردد به عبارت دیگر توالی پرایمر در DNA الگو منحصر به فرد باشد.

اختصاصیت بالا را با استفاده از نرم افزارهایی مانند the Basic Local Alignment SearchTool (BLAST) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) تایید کنید.



- **طول**

طول پرایمر بر اختصاصیت پرایمر و دمای ذوب /اتصال پرایمر اثر میگذارد.

هرچه پرایمر بلند تر باشد، شانس منحصرد به فرد بودنش بیشتر خواهد بود. (Uniqueness)

هرچه پرایمر بلندتر باشد، دمای ذوب/اتصال آن نیز افزایش پیدا میکند. (Specificity)

طول پرایمر حداقل باید 15 باز باشد تا از منحصرد به فرد بودنش اطمینان حاصل گردد.
معمولا پرایمرها بین 17-28 باز طول دارند.

اگر طول پرایمر بیشتر از 30 باز باشد، احتمال عدم اتصال و یا تشکیل ساختارهای سنجاق سری یا دایمر وجود دارد.

ترکیب بازها

بر اختصاصیت در هیبریداسیون و دمای ذوب/ اتصال پرایمر اثر میگذارد.

ترکیب تصادفی بازها ترجیح داده میشود.

- تا حد امکان از تکرارهای طولانی (A+T) یا (G+C) اجتناب گردد.

Template DNA

5’..TCG**ATATATAT**GCATG…GAT**GCCGGCGCGC**TGTACACAA..3’

از طراحی پرایمرهایی با تکرارهای طولانی از یک باز عموما باید اجتناب گردد چون ممکنه عدم اتصال اتفاق بیفتد....

AGC**GGGGG**AT**GGGG**

از تکرارهای بیشتر از 3 باز اجتناب گردد.

معمولا در pcrهای معمولی، محتوای GC حدودا بین 40-60% دمای ذوب و اتصال مناسبی را به ما میدهد و پایداری هیبریداسیون مناسبی را فراهم میکند.

.

- **دمای ذوب Tm**

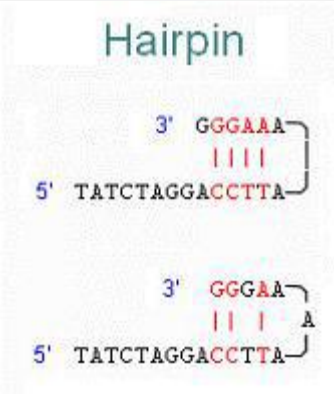
دمایی که در آن 50 درصد پرایمرها به توالی هدف در رشته الگو متصل میشوند.

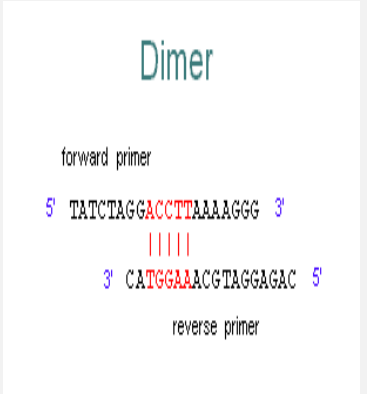
DNA با محتوای G+C بالاتر، دمای ذوب بالاتری را به علت پیوندهای هیدروژنی خواهند داشت.

3 vs. only 2 in A::T

ساختارهای ثانویه

اگر پرایمرها به خودشان یا یکدیگر به جای اتصال به الگو، متصل شوند (دایمر پرایمرها) کارایی PCR کاهش پیدا خواهد کرد.





هرچند با توجه به اینکه دمای اتصال به این ساختارهای ثانویه اجازه تشکیل نمیدهد، این ها بی ضرر میباشند

پرایمرها بصورت جفت کار میکنند: فوروارد و ریورس.

از آنجائیکه هردو بصورت همزمان در واکنش pcr مورد استفاده قرار میگیرند، باید این اطمینان حاصل گردد که شرایط واکنش برای هر دو پرایمر مناسب می باشد.

یکی از ویژگی های اساسی، دمای اتصال میباشد که باید قابل مقایسه با یکدیگر باشد.

حداکثر اختلاف دمای اتصال باید 3°C باشد.

Resources for Primers and Target Sequences

- For Choosing a Target Sequence:
  - ✓ NCBI
  - ✓ Ensmble

- for designing primers
  - ✓ Primer3
  - ✓ Oligo7