

The background of the page features a vertical orange gradient. On the left side, there are several glowing, wavy lines in shades of yellow and orange, resembling a DNA helix or a signal waveform. At the bottom, there is a stylized graphic of a building or structure with a bright yellow light source at its base, creating a lens flare effect.

引物和探针设计 – *PCR*和定量*PCR*

目录

基本原理

1

引物设计的重要因素

2

针对特殊应用的其他提示

4

引物的质量和纯度

7

基本原理

基本原理

引物是短的寡核苷酸，充当DNA复制的起始点。因为几乎所有DNA聚合酶都不能从头合成，所以它们需要一个3'-羟基作为DNA合成的起始点。这个3'-羟基由相配的引物提供。引物在体内由RNA聚合酶（称为引物酶）生成。这些引物（在此为小RNA）由DNA聚合酶用作延长的起始点。在延长过程中，RNA引物降解并由DNA取代。

体外扩增反应，如聚合酶链反应（PCR）或逆转录（RT），需要引物。通过选择特异的引物序列，DNA片段的所需区域可得到扩增。

对于大多数PCR反应，决定整个反应成功与否的最重要因素是引物的序列和质量。

在开始引物设计之前，必须弄清以下几点：

- PCR的目的（例如定量检测、克隆、基因分型）
- PCR类型（定量PCR、RT-PCR、长片段PCR）
- 样品材料（基因组DNA、RNA、微小RNA）
- 可能的问题（例如假基因、SNP）



引物设计的重要因素

引物设计的重要因素

有一些不同的软件工具可用于引物设计和序列分析。它们能简化相配引物对的搜索，一般考虑以下标准。最流行的软件为Primer³(<http://primer3.sourceforge.net>)，它是大多数基于网络引物设计应用的基础。

引物长度和专一性

典型的引物长度为18-30个碱基。短的引物（15个核苷酸以下）能非常高效地结合—但是它们的专一性不够。非常长的引物能提高专一性，但是退火效率低，从而导致PCR产物量低下。应避免编码单一序列和重复序列的引物。

平衡GC含量，避免GC-和AT-富集区域

引物的GC含量应介于40%和60%之间。应避免聚-(dC)-或聚(dG)-区域，因为它们会降低退火反应的专一性。聚-(dA)-和聚(dT)-也应避免，因为这会生成不稳定的引物-模板复合物，从而降低扩增效率。

退火温度

退火温度是基于引物的解链温度(T_m)计算。最常用的解链温度计算公式显示如下。“2+4”法则，亦称华莱士法则，对于极短的寡核苷酸（最多14个碱基）有效，该法则提出每个AT对能将双链DNA的解链温度提高2°C，每个GC对则能提高4°C。

$$T_m = 2^\circ\text{C} \cdot (A + T) + 4^\circ\text{C} \cdot (G + C)$$

GC法则（适用于长于13个碱基的序列）也是一种简单但同时相当不准确的方法。

$$T_m = 64.9^\circ\text{C} + 41^\circ\text{C} \cdot \frac{(G + C - 16.4)}{(A + T + G + C)}$$

两种法则都假设退火发生于以下标准条件下：

50 nM引物、50 mM Na⁺和pH 7.0。

“盐调整”法稍微准确一些，考虑到了反应缓冲液中的Na⁺离子浓度。

$$T_m = 100.5^\circ\text{C} + 41^\circ\text{C} \cdot \frac{C + G}{A + C + G + T} - \frac{820}{A + C + G + T} \cdot 16.6 \cdot \log_{10}([\text{Na}^+])$$

最复杂的方法称为“碱基堆积”法。这里的计算中包括了杂交期间的焓(H)和熵(S)。

计算出的解链温度可用于估算最佳退火温度。但是，经常需要经验性地估算最佳温度。

提示

所选引物的解链温度应允许退火温度介于55°C和65°C之间。一个引物对的两条引物都应具有相同或极相近的解链温度。

引物设计的重要因素

避免互补的引物序列

引物设计应避免一条引物内的互补性超过3个碱基。如果不遵循这个法则，那么可能出现使引物不能与其目标序列结合的二级结构。引物之间的同源性也应避免，尤其在作为扩增起始点和关键区域的3'端。同源性将导致强引物二聚体形成，后者将与所需要的PCR反应竞争资源，导致PCR效率降低，在极端情况下，甚至导致完全无特异性PCR产物生成（图1）。



3'-序列

应小心避免在退火步骤期间将PCR引物的3'端错配。3'端为G-或C-核苷酸较好，因为能增加结合强度。同时它将提高PCR效率，因为引物-模板复合物的开放将达到最小。但是，超过3个G/C碱基将会具有负面效果，因为会降低反应的专一性。

针对特殊应用的其他提示

针对特殊应用的其他提示

逆转录(RT-PCR)

对于RT-PCR，例如基因表达分析，推荐采用mRNA特异性引物对，以避免或识别基因组DNA扩增。可选择两种方法（图2）。

首先，引物可设计用于在内含子序列前后两个不同的外显子之间结合（图2A）。在这种情况下，所产生的基因组DNA来源PCR片段将远大于mRNA来源者。根据内含子的长度，可以缩短聚合时间，这样将不会合成长片段。但是，基因组DNA的扩增会消耗资源，从而降低所需要的mRNA扩增的效率。

另一个推荐方法是设计跨越mRNA上外显子-外显子联合而结合的引物。这可以预防基因组DNA的扩增（图2B）。

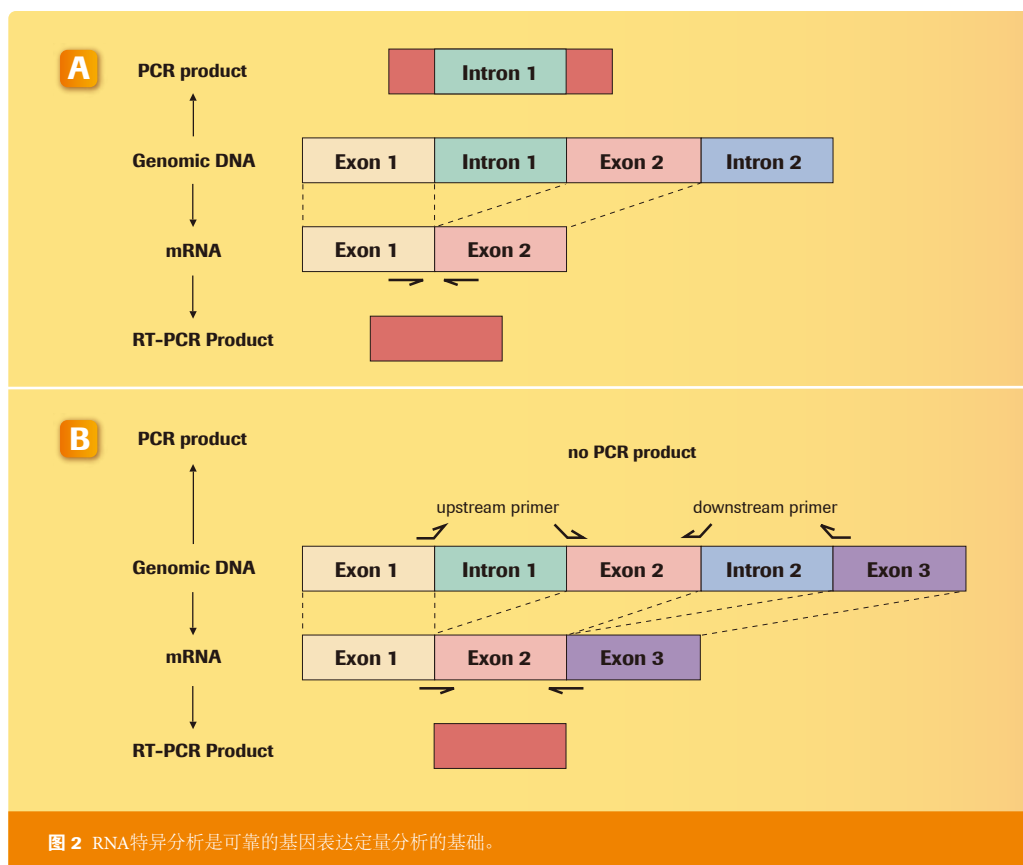


图 2 RNA特异分析是可靠的基因表达定量分析的基础。

在两步法RT-PCR应用中，mRNA必须转录为cDNA。在这种情况下，采用不依赖序列的引物，例如寡(dT)引物或随机六聚体。在采用寡(dT)引物时，推荐选择3'端引物用于以后的PCR反应。原因是许多逆转录酶不能高效地将全长mRNA序列转录到5'端。

针对特殊应用的其他提示

提示

锚定的寡 (dT)_n引物与聚 (A) 尾部的起点杂交，这样能确保mRNA编码部分的靶向转录。这是生成全长cDNA的大多数两步RT-PCR应用中较受欢迎的引物延伸法。

提示

如果目标序列位于基因的5'端，那么推荐采用随机六聚体引物或随机六聚体与寡 (dT)_n引物的混合物用于逆转录步骤。一般采用60μM随机六聚体和2.5μM寡 (dT)_n。

实时PCR

为了达到高效反应，应将实时PCR应用的引物设计为能生成短的扩增子。用结合DNA双链的荧光染料（如SYBR Green I）分析时的扩增子长度应短于300 bp，探针分析时的扩增子长度应短于150 bp。

提示

为了获得最大便利，请将您的分析设计为全部在相同的PCR条件下运行。为了达到这一目的，可将引物设计为具有极相近的解链温度，以便能选择相同的退火温度。如果分析是用免费的ProbeFinder软件设计，那么最佳退火温度都是60°C。

对于TaqMan® 分析的设计，应遵循以下推荐：

- 扩增子长度应小于150 bp。
- 荧光标记染料不应结合到G-残基，这样可以避免探针的5'端上出现G-残基。
- 选择能为探针提供C'多于G'的链。
- 最大TaqMan® 探针长度为30个碱基，以获得最佳退火效果。
- 探针的T_m应介于68-70°C之间。
- 探针应经HPLC纯化，母液（通常为2-4μM）应在-20°C下等分和保存。应避免反复冻融（写成冷冻、融化）循环。（又参见“引物的质量和纯度”）
- 设计引物应在设计完探针后进行。
- 引物设计应尽可能接近探针而又不与探针重叠。良好的距离应为距探针3个核苷酸。
- 引物的T_m应比探针低8-10°C，通常为至少60°C。

TIP

围绕探针设计多个引物。这将使您能经验性地确定并选择最好的引物探针组合。

针对特殊应用的其他提示

克隆

如果必须引入限制性位点，那么应在引物的5'端进行。

提示

因为限制性内切酶不会在片段的端部切割，所以推荐增加另外2-6个碱基，并选择正好在DNA片段的端部切割的限制性内切酶。（例如EcoR I, BamH I, Kpn I, Xba I）。对于ProbeFinder软件，最佳退火温度都是60°C。

简并引物

对于相关生物序列的扩增，例如研究微生物生态学时的普通情况，使用简并引物可能会有帮助。简并引物是相似寡核苷酸的混合物，具有相同序列—除了所选的（简并）位置以外—并使得相似的序列被共同扩增。简并引物也能用于引物设计必须基于蛋白质序列时。

LNA 引物

锁核酸（LNA）是核苷酸类似物，其中核糖环由亚甲基桥封闭。LNA-核苷酸与其互补碱基配对。其优势在于LNA-核苷酸增加寡核苷酸的解链温度，每个LNA单体可增加2-8°C，从而比标准寡核苷酸提高了专一性。这个优势可用于一系列不同的应用，尤其是在微小RNA的定量分析中或在 *Universal ProbeLibrary* 通用型探针的使用中。

	Perfect Match	Single Mismatch	ΔT_m
 <p>LNA 8-mer 5'-TGCIGGTC-3'</p>	3'-ACGACCAC-5' 71 °C	3'-ACGGCCAC-5' 45 °C	26 °C
 <p>DNA 8-mer 5'-TGCIGGTC-3'</p>	35 °C	25 °C	10 °C

引物的质量和纯度

引物的质量和纯度

茎环引物

茎环引物主要用于逆转录期间，以便后面进行微小RNA的量化分析。茎环引物结合到微小RNA的3'端[®]，这样它可由逆转录酶进行转录。然后借助于微小RNA特异性正向引物、逆向引物和水解探针（TaqMan探针），可以对RT产物进行定量分析（Chen等人,2005）。

引物的质量和纯度

如果可能的话，应只采用高度纯化的引物（例如HPLC纯化）。在非纯化引物样品中，总会存在较短的片段，这是引物合成期间生成的副产物。这些副产物将促进引物二聚体的形成，并将降低PCR反应的敏感性和产量。

提示

尽管引物设计很小心，但是为了防止出现引物二聚体及其他非特异性PCR产物，PCR反应中应始终采用HPLC纯化引物，以及具有热启动功能的聚合酶。

FastStart Taq聚合酶，dNTPack和FastStart高保真PCR系统，dNTPack以及所有FastStart Universal SYBR Green、LightCycle[®]480/2.0系列的SYBR Green Master Mix或Probes Master Mix都含有经过化学修饰的酶，这些酶在75°C以下将失活。在PCR开始时，95°C下短时间孵育足以激活这些酶。因为逆转录酶不具有内源性热启动功能，Transcriptor一步式RT-PCR试剂盒包含特殊的热启动补充剂，能减少逆转录以及随后PCR期间的引物二聚体，从而提高专一性。

引物通常以冻干制剂提供。它们可以保存在2-8°C的冰箱中。引物母液应在-20°C下等分和保存。应避免反复的冷冻、融化循环。

提示

为了生成浓缩母液（例如100μM），应采用以不含核酸酶的水配制的、适合于PCR的低浓度无菌Tris缓冲液（5-10μM，pH 7-8）。纯水的缺点是没有缓冲能力。这样，pH值将经常处于4-5的范围内。引物在这个pH值下不稳定。应避免TE缓冲液，因为它含有会结合Mg²⁺离子的EDTA，而Mg²⁺离子是PCR反应中的主要成分。

更多阅读材料

文献

- PCR Applications Manual, 3rd edition (2006), Roche Applied Science.
- Lab FAQs: Find a quick solution, 3rd edition (2007), Roche Applied Science.
- Technical Tip: Real-Time PCR – The Essentials, Roche Applied Science.
- Technical Tip: Relative Quantification in Perfection, Roche Applied Science.
- Chen C, et al. (2005) Nucleic Acids Res. 2005; 33(20): e179.
- SantaLucia, J. (1998) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 95, 1460.
- Allawi, H.T. and SantaLucia, J. Jr. (1997) Biochemistry 36, 10581.

网页

www.roche-applied-science.com

www.roche-applied-science.com/sis/campaigns/qpcr/index.jsp

www.exiqon.com

www.lightcycler.com

www.roche-applied-science.com/specials

Published by

罗氏诊断产品(上海)有限公司
罗氏应用科学部

上海市淮海中路1045号淮海国际广场12楼 邮编: 200031
Tel: +86 21 2412 1000 Fax: +86 21 2412 1188
订货热线: 800-820-3361 400-820-3361
技术服务: 800 820 0577
邮箱: china.as@roche.com

北京分公司
北京市东城区东长安街1号东方广场
东方经贸城中二办公楼六层09室 邮编: 100738
Tel: +86 10 8515 4100 Fax: +86 10 8515 4188

广州分公司
广州市环市东路403号 广州国际电子大厦25楼
邮编: 510095
Tel: +86 20 8713 2600 Fax: +86 20 8713 2700

© 2010 Roche Diagnostics Limited
All rights reserved.

TRADEMARK

PROBELIBRARY and LNA are registered trademarks of Exiqon A/S, Vedbaek, Denmark.

SYBR is a registered trademark of Molecular Probes, Inc.

FASTSTART, LIGHTCYCLE and TAQMAN are trademarks of Roche.

Other brands or product names are trademarks of their respective holders.

DISCLAIMER

The information contained in this document is intended to assist researchers in their activities. Roche does not guarantee experimental results based on the information contained within.