

به نام خداوند بخشنده مهربان

روشها و
پروتکل‌های
ژنتیکی



ژنتیکا

www.genetica.ir

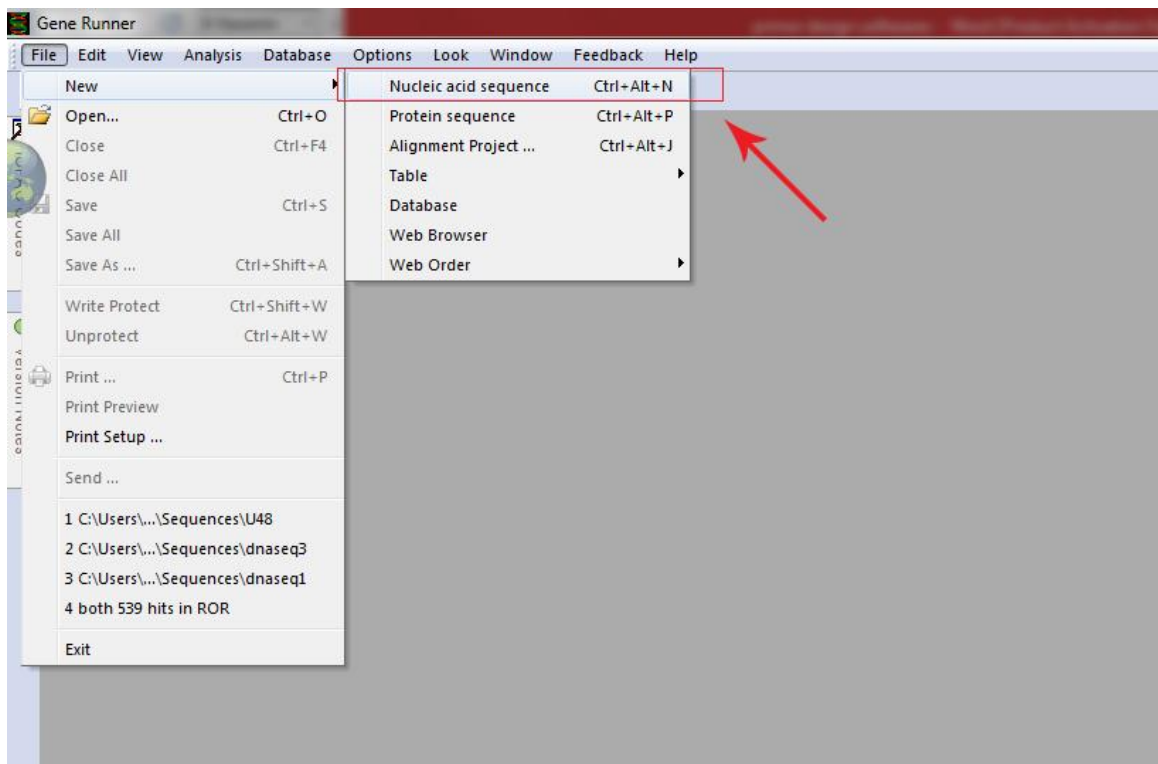
آموزش طراحی گام به گام پرایمر با نرم افزار GENE RUNNER

آشنایی با نرم افزارهای طراحی پرایمر:

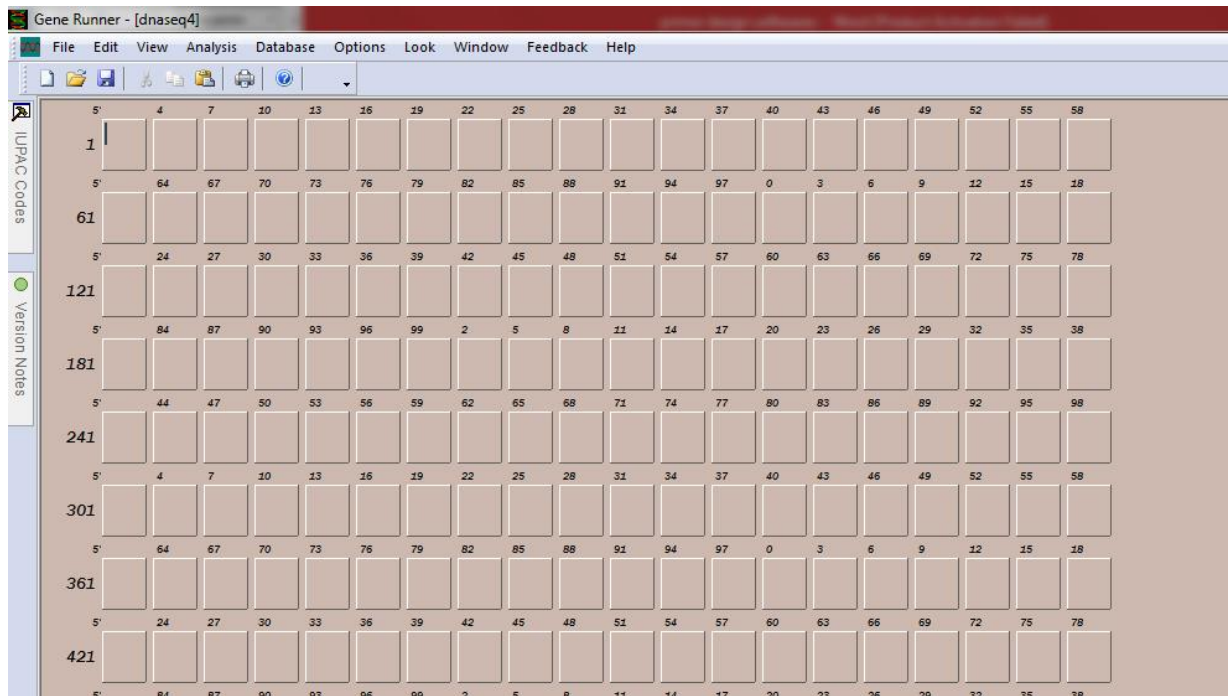
این روزها تنوع نرم افزارهای طراحی پرایمر به قدری زیاد شده که گاهی برای انتخاب یک نرم افزار جامع با مشکل مواجه می‌شویم. در راهنمای زیر اطلاعاتی از برخی از این نرم افزارها آورده شده است و یک بار از یک مسیر برای طراحی پرایمر استفاده شده است. این مسیر شامل استفاده از تعدادی از نرم افزارها و وبسایت‌های مرتبط می‌باشد.

GeneRunner:

این نرم افزار را می‌توانید به صورت رایگان دانلود کنید. در صفحه اصلی این نرم افزار مطابق شکل ۱، گزینه File و سپس Nucleic acid sequence را انتخاب کنید. صفحه‌ای مشابه شکل ۲ باز خواهد شد.

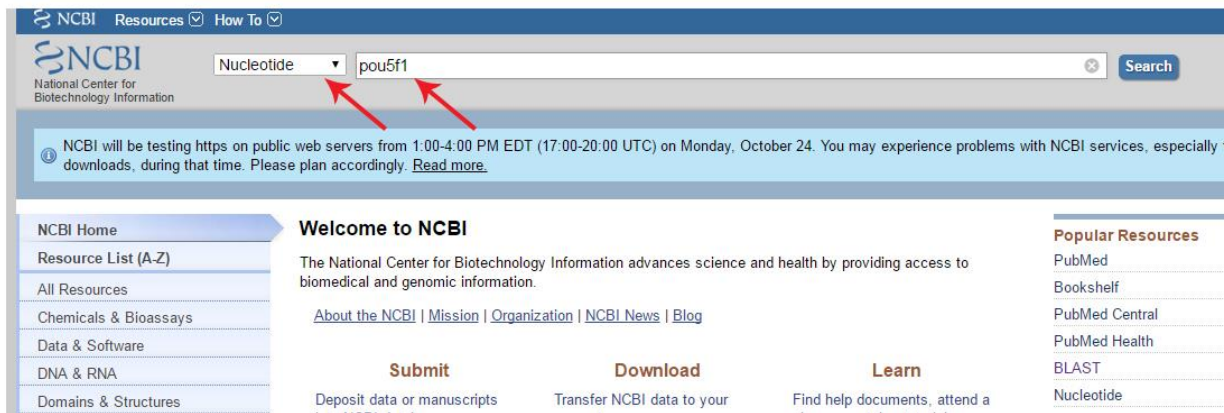


شکل ۱



شکل ۲

در این صفحه توالی مورد نظر الگو را باید قرار دهید. برای گرفتن توالی ژن مورد نظر خود می‌توانید از پایگاه داده NCBI به آدرس www.ncbi.nlm.nih.gov استفاده کنید. کافی است وارد سایت شوید و نام ژن مورد نظر خود را در بخش جستجو وارد کنید. برای دریافت توالی در قسمت پایگاه داده، Nucleotide را انتخاب کنید (شکل ۳).



شکل ۳

پس از وارد کردن نام ژن مورد نظر و سپس انتخاب گزینه search، صفحه ای مشابه شکل ۴ باز می شود که در آن لیستی از ژن ها با کلیدواژه ای که شما جستجو کرده اید ردیف می شود. بسته به گونه مورد نظر خود باید از این لیست ژن خود را انتخاب کنید.

NCBI will be testing https on public web servers from 1:00-4:00 PM EDT (17:00-20:00 UTC) on Monday, October 24. You may experience problems with NCBI services, especially file downloads, during that time. Please plan accordingly. [Read more](#)

Species: Animals (683) | Summary | 20 per page | Sort by Default order | Send to: | Filters: [Manage Filters](#)

Molecule types: genomic DNA/RNA (241) | mRNA (432) | Customize ...

Source databases: INSDC (GenBank) (288) | RefSeq (405) | Customize ...

Sequence length: Custom range ...

Release date: Custom range ...

Revision date: Custom range ...

[Clear all](#) | [Show additional filters](#)

Items: 21 to 40 of 699

Selected: 1

21. [Homo sapiens POU class 5 homeobox 1 \(POU5F1\), transcript variant 5, mRNA](#)
2,075 bp linear mRNA
Accession: NM_001285987.1 | GI: 553727232
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)

22. [Homo sapiens POU class 5 homeobox 1 \(POU5F1\), transcript variant 2, mRNA](#)
2,075 bp linear mRNA
Accession: NM_203289.5 | GI: 553727231
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)

23. [Homo sapiens POU class 5 homeobox 1 \(POU5F1\), transcript variant 4, mRNA](#)
2,300 bp linear mRNA
Accession: NM_001285986.1 | GI: 553727229
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)

24. [Homo sapiens POU class 5 homeobox 1 \(POU5F1\), transcript variant 3, mRNA](#)
1,589 bp linear mRNA
Accession: NM_001173531.2 | GI: 553727228
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)

25. [Homo sapiens POU class 5 homeobox 1 \(POU5F1\), transcript variant 1, mRNA](#)
1,430 bp linear mRNA
Accession: NM_002701.5 | GI: 553727227
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)

Results by taxon

Top Organisms [\[Tree\]](#)

- Homo sapiens (193)
- Danio rerio (70)
- Mus musculus (24)
- Bubalus bubalis (16)
- Oryctolagus cuniculus (14)
- All other taxa (382)

More...

Find related data

Database: [Select](#)

[Find Items](#)

Search details

pou5f1[All Fields]

[Search](#)

Recent activity

شکل ۴

پس از انتخاب گزینه مورد نظر صفحه ای مشابه شکل ۵ باز می شود که همه اطلاعات مربوط به ژن شما در آن صفحه موجود است. با انتخاب گزینه FASTA در بالا و سمت چپ این صفحه به توالی قطعه مورد نظر خود در قالب FASTA دسترسی پیدا خواهید کرد.

GenBank | Send: | [Change region shown](#)

Homo sapiens POU class 5 homeobox 1 (POU5F1), transcript variant 1, mRNA

NCBI Reference Sequence: NM_002701.5

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to: \[v\]](#)

LOCUS NM_002701 1430 bp mRNA linear PRI 07-OCT-2016

DEFINITION Homo sapiens POU class 5 homeobox 1 (POU5F1), transcript variant 1, mRNA.

ACCESSION NM_002701

VERSION NM_002701.5

KEYWORDS RefSeq.

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 1430)

AUTHORS Kosaka T, Mikami S, Yoshimine S, Miyazaki Y, Daimon T, Kikuchi E, Miyajima A and Oya M.

TITLE The prognostic significance of OCT4 expression in patients with prostate cancer

Analyze this sequence

- Run BLAST
- Pick Primers
- Highlight Sequence Features
- Find in this Sequence

Articles about the POU5F1 gene

- The prognostic significance of OCT4 expression in patients with prostate cancer [Hum Pathol. 2016]
- Oct4 plays a crucial role in the maintenance of gefitinib- [Biochem Biophys Res Commun. 2016]
- Sox2/Oct4: A delicately balanced partnership in pluripotent stem cells [Biochim Biophys Acta. 2016]

شکل ۵

توالی به دست آمده مشابه شکل ۶ را کپی کرده و در صفحه نرم افزار GeneRunner، paste کنید (شکل ۷).

Homo sapiens POU class 5 homeobox 1 (POU5F1), transcript variant 1, mRNA
 NCBI Reference Sequence: NM_002701.5

GenBank Graphics

>NM_002701.5 Homo sapiens POU class 5 homeobox 1 (POU5F1), transcript variant 1, mRNA
 AGAGAGGGGTGGAGTCCCTTCGCAAGCCCTCATTTCACCAAGCCCGGGCTGGGGCGCTTCTCTC
 CCTATGGCGGACACCTGGCTTCGGATTTCGCTTCTCGCCCTCCAGGTGGAGGTGAAGGGCCAG
 GGGGGCCGGACCGGGCTGGTGTATCTCGAACCTGGCTAAGCTTCCAAAGCCCTCTGGAAGGCCAGG
 AATCGGGCCGGGGGTGGGGCAGGCTGAGGTGTGGGGATTCCTCCATGCCCCCGCGTATGAGTTC
 TGTGGGGGATGGCTACTGTGGGCCCAAGTTGGAGTGGGGTAGTGCCTCCAAAGCCGGCTGGAGACT
 CTAGCTGAGGGCAGAGCAGGAGTGGGGTGGAGAGCACTCCGATGGGGCTCCCGGAGCCCTGCAC
 CGTCAACCTGGTGCCTGAAGCTGGAGAAGGAGAAGCTGGAGCAAAACCGGAGGAGTCCAGGACATC
 AAAGCTCGAGAAAGAACTCGAGCAATTTGCAAGCTCTGAAGCAGAAGAGGATCACCTGGGATATA
 CACAGGCCGATGTGGGGCTACCTCGGGGTTCTATTGGGAAGGTATTGAGCAAAACGACATCTCGCC
 CTTTGGAGCTCTGAGCTTAGCTTCAAGAACATGTGAAGCTCGGCCCTTGTGTCAGAAGTGGGTGGAG
 GAAGCTGACAACAATAAATACTTCAGGAGATATGCAAGAGCAAAACCTCTGTGAGGCCGAAAGGAA
 AGCGAACAGTATCGAGAACGAGTGGAGGCAACTGGAGAATTTGTTCTGCAAGTCCGAAACCCAC
 ACTGACAGAGTCAAGCAGTCTGGCCAGCAGCTGGGGTGGAGAAGGATGTGCTCGAGTGTGGTCTGT
 AACCGGCCGCAAGAGGGCAAGGATCAAGCAGCAGCTATGCAACAGAGAGGATTTGAGGCTGCTGGGT
 CTCTTCTCAGGGGACAGTGTCTTCTCTGGCCAGGGCCCAATTTGGTACCCAGGCTATGG
 GAGCCCTCACTCACTGACTCTCGGTCTTCTTCCGAGGGGGAAGCCTTCCCTGTCTCC
 CTCACACTCTGGCTCCCATGCAATCAAACTGAGTGCCTGCTTCTAGGAATGGGGGACAGGGGG
 AGGGGAGGAGCTAGGGAAGAAACCTGGAGTTGTGCAAGGGTTTGGGATTAAGTCTTCACTCACT
 AAGGAAGGAAATGGGAACAAAGGGTGGGGCAGGGGAGTTGGGGCACTGTTGGAGGAGGTGAA
 GTTCAATGATGCTCTGATTTAAATCCACATCATGTATCACTTTTTCTTAAATAAAGAAAGCTGGGAC
 ACAGTAGATAGACACACTTAAAAA

Customize view

Analyze this sequence
 Run BLAST
 Pick Primers
 Highlight Sequence Features
 Find in this Sequence

Articles about the POU5F1 gene
 The prognostic significance of OCT4 expression in patients with prostate cancer [Hum Pathol. 2016]
 Sox2/Oct4: A delicately balanced partnership in pluripotent stem cells [Biochim Biophys Res Commun. 2016]
 Oct4 plays a crucial role in the maintenance of gefitinib- [Biochem Biophys Res Commun. 2016]
 Sox2/Oct4: A delicately balanced partnership in pluripotent stem cells [Biochim Biophys Acta. 2016]

Pathways for the POU5F1 gene
 POU5F1 (OCT4), SOX2, NANOG repress genes related to differentiation

شکل ۶

Gene Runner - [dnaseq4]

File Edit View Analysis Database Options Look Window Feedback Help

5' 4 7 20 33 26 29 22 25 28 32 34 37 40 43 46 49 52 55 58
 1 AGA GAG GGG TTG AGT AGT CCC TTC GCA AGC CCT CAT TTC ACC AGG CCC CCG GCT TGG GGC
 TCT CTC CCC AAC TCA TCA GGG AAG CGT TCG GGA GTA AAG TGG TCC GGG GGC CGA ACC CCG

61 GCC TTC CTT CCC CAT GGC GGG ACA CCT GGC TTC GGA TTT GCG CTT CTC GAG CCG CCC TCC AGG
 CCG AAG GAA GGG GTA CCG CCG TGT GGA CCG AAG CCT AAA GCG GAA GAG CCC CCG CCG AGG TCC

121 TGG TGG AGG TGA TGG GGC AGG GGG GGC GGA GGC GGG CTG GGT TGA TCC TCG GAC CTG GCT
 ACC ACC TCC ACT ACC CCG TCC CCG CCT CCG GAC CCA ACT AGG AGC CTG GAC CGA

181 AAG CTT CCA AGG CCC TCC TGG AGG GGC AGG AAT CCG GCC GGG GGT TGG GCC CTC TGA
 TTC GAA GGT TCC GGG AGG ACC TCC CCG TCC TTA GCC CCG CCC CCA ACC CCG TCC GAG ACT

241 GGT GTG GGG GAT TGC CCG ATG CCC CCG GGC GTA TGA GTT CTG TGG GGG GAT GGC GTA GAC
 CCA CCA CCA TCA AGG GGG TAC GGG GGG CCG GAT ACT CAA GAC ACC CCG CTA CCG CAT GAC

301 TGG ACC CCA GGT TGG AGT GGG GCT AGT GGC CCA AGG CCG CTT GGA GAC CTC TCA GCC TGA
 CCG GCG GGT CCA TCA CCG CCG CCG GGT TCC CCG GAA CCT CTG GAG ACT CCG GGT ACT

361 GGG CGA AGC AGG CCC GGT GGA GAG CAA CTC CGA TGG GGC CTC GAG CCC GAG GGG CCG CCG GAC
 CCG CCG TCG TCC TCA GGC CCA CCT CTC GTT GAG GCT ACC CCG GAG GGG CCG CCG GAC GTG

421 GGT CAC CCC TGG TGC CCG GAA GCT GGA GAA GGA GAA GCT GGA GCA AAA CCC GGA GGA GTC
 GCA GTG GGG ACC ACG GCA CTT CCA CTT CCA CTT CCA CTT CCA CTT CCA CTT CCA CTT CCA CTT

481 CCA GGA CAT CAA AGC TCT GCA GAA AGA ACT CGA GCA ATT TGC CAA GCT CCT GAA GCA GAA
 GGT CTT GTA GTT TCG AGA CGT CTT TCT TGA GCT CGT TAA ACG GTT CGA GGA CTT CGT CTT

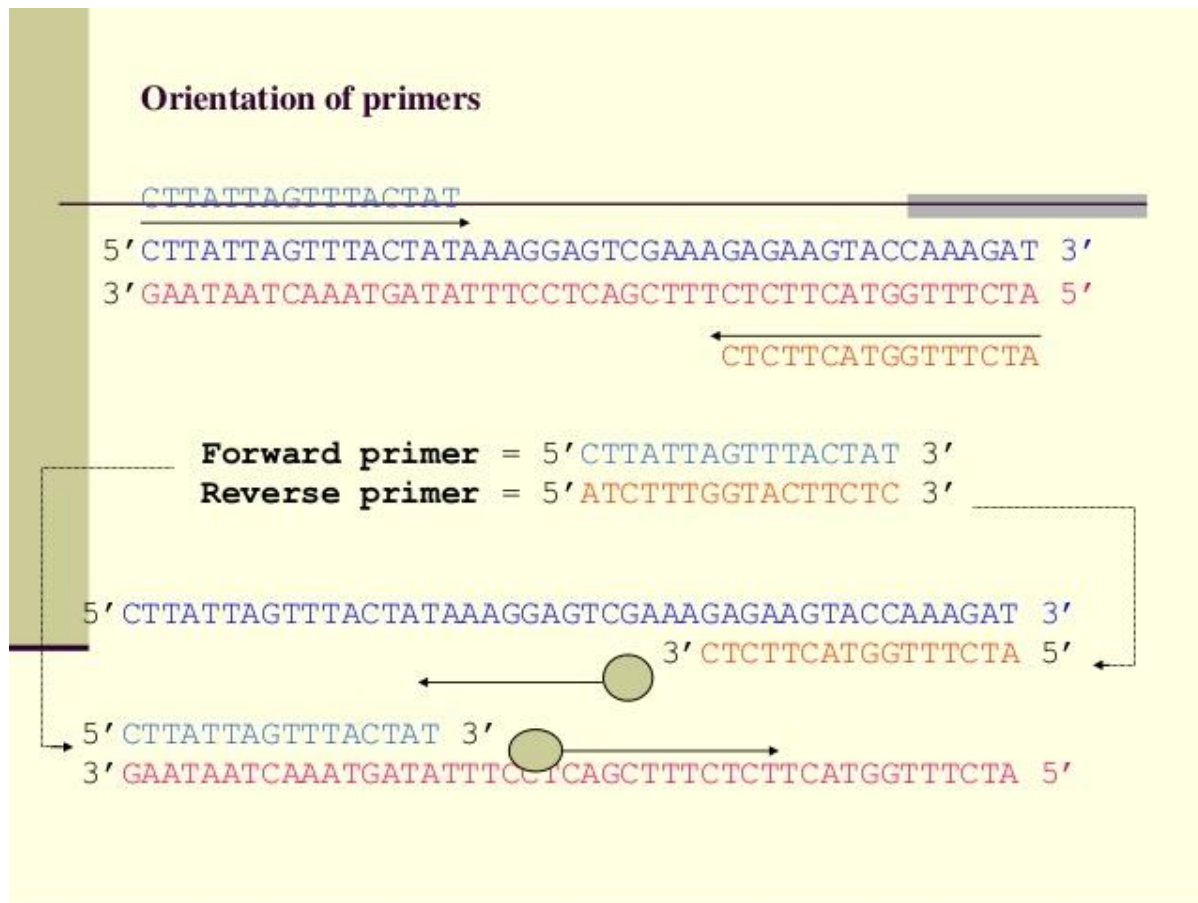
541 GAG GAT CAC CTT GGG ATA TAC ACA GGC CGA TGT GGG GCT CAC GCT GGG GGT TCT ATT TGG
 CTA GTG GGA CCC TAT ATG TGT CCG GCT ACA CCC CGA GTG GGA CCC CCA AGA TAA ACC

5' 4 7 20 33 26 29 22 25 28 32 34 37 40 43 46 49 52 55 58

شکل ۷

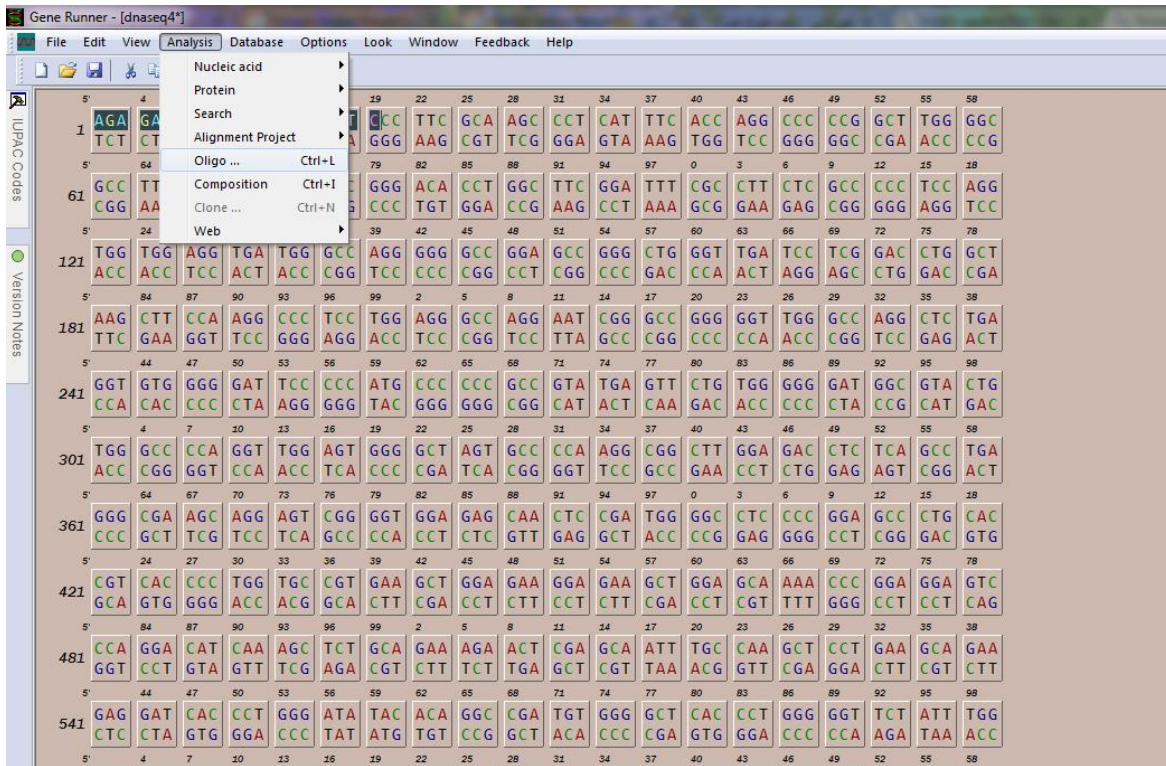
این نرم افزار قابلیت دو رشته‌ای کردن توالی‌ها را دارد. بنابراین شما با کپی کردن توالی یک رشته‌ای مورد نظر خود به توالی دو رشته‌ای آن دست پیدا می‌کنید. همانطور که می‌دانید برای انتخاب توالی پرایمر جلوپیباید از رشته sense استفاده کرد. به عبارت ساده‌تر، ژن مورد نظر شما روی هر رشته‌ای باشد از توالی همان رشته

در جهت '۵ به سمت '۳ برای پرایمر جلویی باید استفاده کنید و برای پرایمر عقبی هم از توالی رشته مکمل انتخاب کنید. دقت داشته باشید که جهت این پرایمرها حتما از '۵ به سمت '۳ باشد (شکل ۸).



شکل ۸

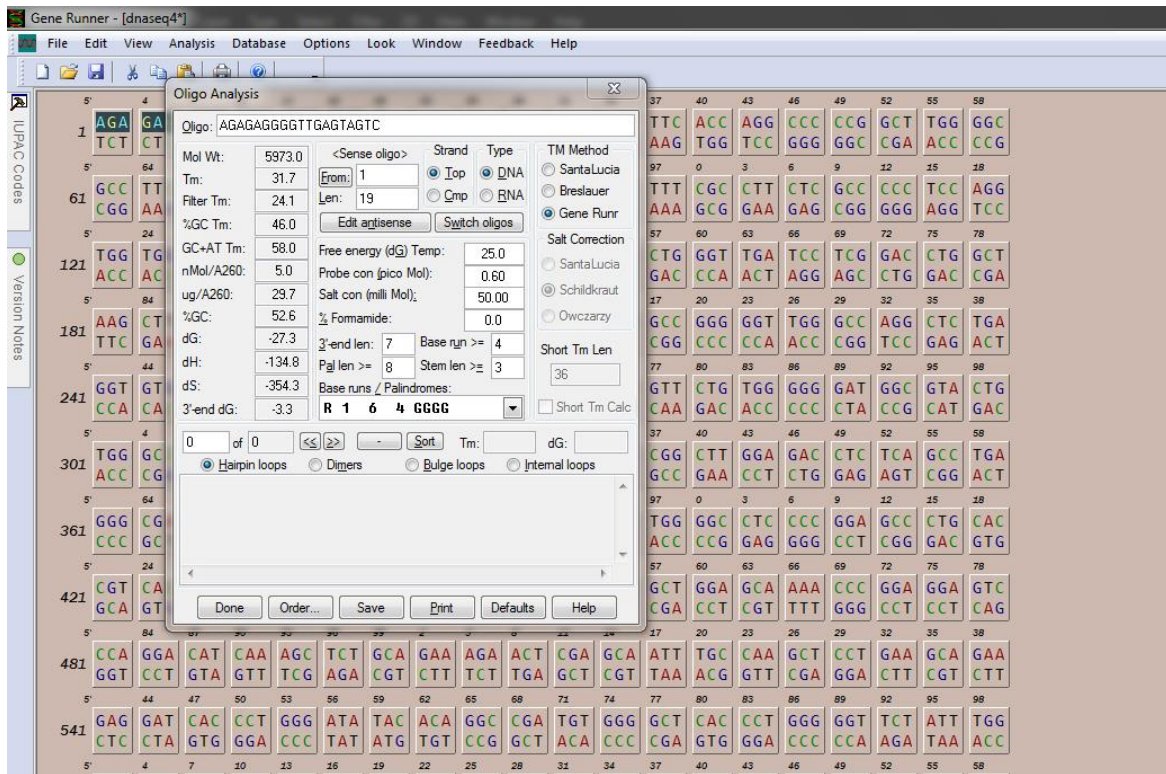
با در نظر گرفتن این نکته، به صورت دستی از ابتدای قطعه مورد نظر توالی‌های ۱۸-۲۲ نوکلئوتیدی را انتخاب کرده و سپس از منوی بالای صفحه GeneRunner، گزینه Analysis و سپس Oligo را انتخاب کنید (شکل ۹). از میانبر Ctrl-L نیز می‌توانید استفاده کنید. بعد از این صفحه‌ای برای شما باز می‌شود که در آن ویژگی‌های مهم قطعه انتخاب شده را مشاهده می‌کنید. اطلاعاتی از قبیل درصد GC، پایداری دیمرها و ساختارهای ثانویه و ... در این صفحه ارائه می‌شود (شکل ۱۰). در مبحث راهنمایی طراحی پرایمر، اکثر ویژگی‌های مهم پرایمرها توضیح داده شده‌اند.



شکل ۹

یک راه میانبر!

یک راه میانبر برای دست یابی به پرایمرها، استفاده از ابزار primer Blast سایت NCBI است. اگرچه پرایمرهای پیشنهادی این بخش لزوماً قابل اطمینان ترین نیستند و حتی گاهی مشکلات فاحشی دارند، اما راه بسیار سریعی است و اگر خوش شانس باشید شاید بهترین پرایمرها را هم به شما بدهد!



شکل ۱۰

برای استفاده از این روش، باید توالی قطعه مورد نظر را داشته باشید. نحوه دست یابی به توالی پیش از این توضیح داده شده است. وارد سایت NCBI شوید و از گزینه‌های سمت راست صفحه اصلی، Blast را انتخاب کنید. بعد از ورود به صفحه Blast، از بخش‌های پایین صفحه تحت عنوان specialized searches، گزینه primer blast را انتخاب کنید.

Primer-BLAST Primer-Blast results

NCBI Primer-BLAST : results: Job id=UVuOXzO6PhZLCQpKUKAG1NSESI-QQo0fw [more](#)

Input PCR template [NM_002701.5](#) Homo sapiens POU class 5 homeobox 1 (POU5F1), transcript variant 1, mRNA
Range 1 - 1430
Specificity of primers Primer pairs are specific to input template as no other targets were found in selected database: Refseq mRNA (Organism limited to Homo sapiens)
Other reports [Search Summary](#)

For better specificity checking, we have substituted the PCR template with the GenBank refseq record [NM_002701.5](#) which is identical to your input template

Graphical view of primer pairs

Primer pair 1

	Sequence (5'>3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TGAGTAGTCCCTTCGCAAGC	Plus	20	11	30	59.75	55.00	4.00	2.00
Reverse primer	TTAGCCAGGTCCGAGGATCA	Minus	20	182	163	60.03	55.00	4.00	2.00
Product length			172						

Products on intended target
[>NM_002701.5](#) Homo sapiens POU class 5 homeobox 1 (POU5F1), transcript variant 1, mRNA

product length = 172
 Forward primer 1 TGAGTAGTCCCTTCGCAAGC 20
 Template 11 30
 Reverse primer 1 TTAGCCAGGTCCGAGGATCA 20
 Template 182 163

Primer pair 2

	Sequence (5'>3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CCTTCGCAAGCCCTCATTC	Plus	20	20	39	59.55	55.00	4.00	0.00
Reverse primer	AACCACACTCGGACCACATC	Minus	20	906	887	59.97	55.00	3.00	0.00
Product length			887						

Products on intended target
[>NM_002701.5](#) Homo sapiens POU class 5 homeobox 1 (POU5F1), transcript variant 1, mRNA

product length = 887
 Forward primer 1 CCTTCGCAAGCCCTCATTC 20
 Template 20 39
 Reverse primer 1 AACCACACTCGGACCACATC 20

شکل ۱۲

پس از ورود به صفحه primer blast، در باکس بالای صفحه باید توالی مورد نظر خود را قرار دهید و گزینه get primers را در پایین صفحه را انتخاب کنید. اکنون صفحه ای مشابه شکل ۱۱ برای شما باز می شود که موقعیت و سایر اطلاعات جفت پرایمرهای پیشنهادی را در آن مشاهده می کنید.

نکته بسیار مهم: پرایمرها را چک کنید!

حتما پرایمرها را قبل از سفارش چک کنید. چه پرایمرها را خودتان با روش اول انتخاب کردید، چه از NCBI به صورت آماده به دست آورده اید و چه از مقالات توالی را استخراج کرده اید، حتما در نرم افزارهای دیگر

هم چک کنید. هر نرم افزار یا وب سایتی که برای این کار طراحی شده است از الگوریتم‌های ویژه خودش استفاده می‌کند. وقتی پرایمرها را با چند الگوریتم مختلف بررسی می‌کنید در حقیقت اطمینان بیشتری به دست می‌آورید. آنچه کیفیت یک پرایمر را بالا می‌برد کارایی بالای آن در شناسایی قطعه مورد نظر شماست. حتما بعد از طراحی، پرایمرها را Blast کنید. وارد بخش primer blast سایت NCBI شوید و این بار توالی پرایمر جلویی و عقبی را در باکس‌های مربوط به خودشان کپی کنید. بسته به کارتان پایگاه داده مورد نظر را انتخاب کنید و در آخر، گزینه get primers را بزنید. در صورتی که پرایمر شما علاوه بر قطعه خودتان، قطعه‌های دیگری را بشناسد، بهتر است پرایمرها را عوض کنید. مگر اینکه قطعه غیر اختصاصی‌ای که می‌شناسد اختلاف طول فاحشی با قطعه شما داشته باشد. البته برای real-time PCR این مساله جدی تر است و هیچ قطعه دیگری را نباید بشناسد.

منبع:

<http://techazma.com/%D8%B7%D8%B1%D8%A7%D8%AD%DB%8C-%DA%AF%D8%A7%D9%85-%D8%A8%D9%87-%DA%AF%D8%A7%D9%85-%D9%BE%D8%B1%D8%A7%DB%8C%D9%85%D8%B1-%DB%8C%D8%A7-%D9%86%D8%B1%D9%85-%D8%A7%D9%81%D8%B2%D8%A7%D8%B1-generunner/>