به نام خداوند بخشنده مهربان

ژنتیکا

روشها و پروتکلهای ژنتیکی

www.genetica.ir

جدیدترین مفاهیم ضروری در طراحی پرایمر

نویسندگان: طیب بهرامی۱، فارس بهرامی۲*، نسیبه سلطانی۱، آرش سلمانی نژاد۱
۱گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران.
۲گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
* نویسنده مسئول: faresbahrami@yahoo.com

چکیده

توجه به اصول طراحی پرایمر مهم‌ترین معیار در موفقیت‌آمیز بودن PCR است. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) یک واکنش آنزیمی است که از اصول ریاضی ساده و قابل فهم پیروی می‌کند. این واکنش در محیط in vitroقادر به تکثیر یک قطعه از DNA در مقیاس لگاریتمی است که اساس ظهور بیولوژی مولکولی مدرن می‌باشد؛ چرا که تکثیر انتخابی مولکول‌های اسید نوکلئیک از یک منبع اولیه با مقدار کم، زمینه بررسی دقیق‌تر این مولکول‌ها را فراهم می‌آورد. به‌کار بردن اصول صحیح طراحی پرایمر، اختصاصیت و حساسیت PCR را بهبود می‌بخشد. این اصول شامل پارامترهای طول، Ta ،Tm، مقدار GC، نوکلئوتیدهای انتهایی پرایمر و نیز طول و محتوای GC قطعه هدف می‌باشد. در این مطالعه سعی شده است که با ارائه مهم‌ترین اصول طراحی پرایمر و معرفی چندین سایت تخصصی بیوانفورماتیکی مرتبط و به‌روز، چگونگی طراحی پرایمر نشان داده شود.

مقدمه

مهم‌ترین معیار در انجام یک واکنش PCR موفقیت‌آمیز، توجه به اصول طراحی پرایمر است. زیرا یک پرایمر نامناسب منجر به تکثیر ناچیز قطعه مورد نظر و یا عدم انجام واکنش PCR (به دلیل تکثیر غیراختصاصی و یا تشکیل پرایمر دایمر) می‌شود(۱). در طراحی پرایمر دو هدف اصلی وجود دارد: اختصاصیت و حساسیت واکنش. در صورتیکه پرایمرها با اختصاصیت کم طراحی شوند، منجر به تکثیر غیر اختصاصی شده و به راحتی با الکتروفورز ژلی و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید یا SBR green تشخیص داده می‌شوند(۲). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) یک واکنش آنزیمی‌است که از اصول ریاضی ساده و قابل فهم پیروی می‌کند و در محیط invitroقادر به تکثیر یک قطعه از DNA در مقیاس لگاریتمی‌است که اساس ظهور بیولوژی مولکولی مدرن می‌باشد؛ زیرا تکثیر انتخابی‌مولکول‌های اسید نوکلئیک از یک منبع اولیه با مقدار کم، زمینه بررسی دقیق‌تر این مولکول‌ها را فراهم می‌کند(۳).

یک PCR پربازده و مقرون به صرفه، نیازمند مواردی چون Taq پلیمراز، بافر، دئوکسی نوکلئوتیدهای تری‌فسفات(dNTP)، عوامل پایدار کننده، الگوی DNA و پرایمر-های الیگونوکلئوتیدی است. برای تکثیر یک قطعه هدف، می‌بایست دو پرایمر به انتهاهای توالی مورد نظر متصل شوند (شکل۱).

شکل۱: پرایمر forward(<<<<<) مکمل با رشته پایین، در جهت ۵'-۳' قرار گرفته و توالی ۵'-CTGTCCACACAATCTGCC -۳' را دارد. پرایمر reverse(>>>>>) که مکمل با رشته بالا در جهت ۳'-۵' قرار گرفته و توالی ۳'-GACCCTAATGTGTACCGTAC-۵' را دارد. از آنجا که همواره توالی DNA در جهت ۵'-۳' نوشته می‌شود، پرایمر reverse نیز باید بصورت ۵'-CATGCCATGTGTAATCCCAG-۳' نوشته شود.

طی ۱۵ سال اخیر، کامپیوتر تبدیل به یک ابزار مهم و ضروری برای زیست‌شناسان سلولی و مولکولی جهت طراحی پرایمر شده‌است که ترکیب آن با علم بیولوژی، بیوانفورماتیک نامیده می‌شود. در بیوانفورماتیک با استفاده از فن‌آوری اطلاعات، می‌توان اطلاعات بیولوژیکی را به‌طور مناسب تجزیه و تحلیل نمود تا برای سوالات پیچیده بیولوژیکی، به پاسخی مناسب دست یافت(۴). نرم‌افزارها و سایت‌های اینترنتی طراحی پرایمر، پارامترهایی چون طول پرایمر، دمای ذوب(Tm)، محتوای GC پرایمر، پایداری انتهای ۵ پریم، اختصاصیت انتهای ۳ پریم پرایمر و... را در نظر می‌گیرند(۵). این متغیرها تاثیرات قابل سنجشی بر روی اختصاصیت و بازدهی PCR می‌گذارند. البته با توجه به نوع انجام واکنش PCR، برخی از این معیارهای PCR استاندارد، قابل تغییر است. به‌عنوان مثال در کاربردهای تشخیصی PCR، معمولا پارامترها و شرایط دمایی واکنش PCR برای افزایش اختصاصیت و به قیمت کاهش حساسیت تغییر می‌یابد، چرا که در این‌گونه موارد، پرهیز از نتایج مثبت کاذب نسبت به تکثیر زیاد محصول PCR در اولویت قرار دارد(۳و۶).

پارامترهای مهم در طراحی پرایمر

طول پرایمر

طول پرایمر یک پارامتر مهم در طراحی پرایمر است. این معیار همراه با دمای اتصال پرایمر به قطعه هدف (دمای annealing)، اختصاصیت واکنش PCRرا تعیین می‌کند. در صورتی که دمای annealing نزدیک به دمای Tm پرایمر (دمای دناتوره شدن داپلکس پرایمر-الگو) باشد، طولی بین ۱۸ تا ۲۴ باز برای پرایمر مناسب بوده و این طول با توجه به دمای Tm برابر ۵۴ درجه (یا بیشتر)، اختصاصیت و بازدهی واکنش

PCR را بـه مقـدار قابـل ملاحظـه‌ای افزایـش می‌دهـد(۷). البتـه حداقـل طـول پرایمـر بسـته بـه طـول ژنـوم موجـود تعریـف می‌شـود. بـرای ژنـوم انسـان حداقـل طـول در نظرگرفتـه شـده، ۱۷ نوکلئوتیـد بـوده اسـت تـا شـانس اتصـال غیراختصاصـی را بـه حداقـل برسـاند(۸). البتـه حداقـل طـول انتخابی‌پرایمرهـا باتوجـه بـه الگـوی مـورد اسـتفاده در واکنـش PCR تغییـر می‌کنـد. به‌عنـوان مثـال در مـواردی کـه cDNA تخلیـص شـده، الگـوی واکنش PCR باشـد، به‌دلیـل کاهـش احتمـال اتصـال غیراختصاصـی بیـن پرایمـر و الگـو، می‌تـوان حداقـل طـول پرایمرهـا را کمتـر از ایـن میـزان نیـز انتخـاب کـرد(۹). در تعییـن طـول پرایمـر بایـد توجـه داشـت کـه بـه‌ازای افزایـش هـر نوکلئوتیـد، اختصاصیـت پرایمـر ۴ برابـر می‌شـود. در مـواردی کـه پرایمـر کوتـاه باشـد (بـرای مثـال ۱۲جفـت بـاز)، ایـن پرایمـر توانایـی اتصـال بـه ۲۰۰ مـکان در ژنـوم انسـان را خواهـد داشـت (ژنـوم انسـان برابر$۳^{۹}\times۱۰$نوکلئوتیـد اسـت، پـس $\frac{۳\times۱۰^{۹}}{۴^{۱۲}}=۲۰۰$). همچنیـن می‌بایسـت در نظـر داشـت کـه افزایـش طـول پرایمـر (بدلیـل ایجـاد شـرایط سـخت‌گیرانه)، مانـع اتصـال مناسـب پرایمـر بـه الگـو می‌شـود(۹).

Tm، Ta و مقدار GC پرایمر

نکتـه مهـم دیگـر در طراحـی پرایمرهـای کارا، محاسـبه دمـای ذوب (Tm) جفـت پرایمرهاسـت. Tm دمایـی اسـت کـه در آن نیمـی‌از پرایمـر هـا بـه توالـی هـدف می‌چسـبند. به‌طـور کلـی دمـای مناسـب بـرای ایـن اتصـال در محـدوده ۵۸۰۰-۵۲ تعریـف شـده کـه نتایـج بهتـری نسـبت بـه دماهـای پائین‌تـر دارد(۱۰). بـرای پرایمرهایـی بـا طـول بیـن ۱۸ تـا ۳۰ نوکلیوتیـد، تخمیـن دمـای Tm بـا اسـتفاده از رابطـه والاس (Tm=۴(G+C)+۲(A+T)) قابـل محاسـبه اسـت(۱۱). بـرای تخمیـن دمـای Tm پرایمرهـا بـا طـول بیشـتر، از پارامترهـای ترمودینامیکـی اسـتفاده می‌شـود. بـرای محاسـبه ایـن پارامترهـای ترمودینامیکـی می‌تـوان از فرمـول زیـر کـه توسـط Rychlik پیشـنهاد شـده اسـتفاده کـرد (۱۲و۱۳):

$$T_m(^\circ C)=\frac{dH}{dS+R\ln\left(\frac{C}{4}\right)+0.368(L-1)\ln([K^+])}-273.15$$

کـه در آن dH وdS بـه ترتیـب آنتالپـی (میـزان گرمـای واکنـش) و انتروپـی (میـزان بی‌نظمی‌واکنـش) اتصـال پرایمـر بـا قطعـه هـدف، R ثابـت مولـی گاز و برابـر بـا cal/K mol ۱/۹۸۷، C غلظـت مولـی اسـید نوکلئیـک و K+ نیـز غلظـت بافـر اسـت کـه مقـدار قـراردادی برابـر بـا ۵۰ mM دارد.

به‌دلیـل افزایـش پتانسـیل تشـکیل سـاختارهای ثانویـه (سـنجاق سـر) در پرایمـر، از Tm بالاتـر از ۶۵ درجـه نیـز بایـد پرهیـز شـود. در عمـل، دمای جفت‌شـدن مناسـب بـه صـورت تجربی‌مشـخص می‌شـود. به‌طـور ایـده‌آل بایـد بالاتریـن دمـای جفت‌شـدن را اسـتفاده کـرد تـا محصـول دلخـواه بـا کارآمـدی بهتـر تکثیـر گـردد و از تکثیـر غیراختصاصـی جلوگیـری شـود(۱۴). دسترسـی بـه یـک دسـتگاه ترموسـایکلر بـا بلـوک حرارتـی

گرادیانی، بهینه‌سازی دماهای جفت-شدن را تا حدود زیادی آسان می‌کند.

محتوای GC برروی Tm پرایمرها تاثیر می‌گذارد. برای بهینه‌کردن شدت annealing، باید پرایمرهایی با محتوای GC بین ۴۵ تا ۶۰ درصد طراحی کرد و درصورتیکه پرایمرها از نوکلیوتیدهای با GC کمتر از ۵۰ درصد طراحی شده باشند، جهت حفظ Tm بالای ۵۰ درجه، می‌بایست طول پرایمر را به بیش از ۱۸ نوکلیوتید رساند. باید توجه داشت که بین دمای Tm، دمای annealing و درصد GC رابطه مستقیم وجود دارد(۱۵). Ta یا دمای اتصال پرایمر به الگو تقریبا ۵°c زیر حداقل Tm جفت پرایمر مورد استفاده می‌باشد. در این بازه دمایی بازدهی تکثیر PCR به بیشترین مقدار خود می‌رسد. معمولا Ta را با توجه به کیفیت پرایمر، Tm پرایمر و طول قطعه هدف محاسبه می‌کنند. یک فرمول تجربی‌برای محاسبه Ta بهینه به صورت زیر می‌باشد که L همان طول قطعه هدف است(۱۶):

$$Ta(^{o}c) = Tmmin+lnL$$

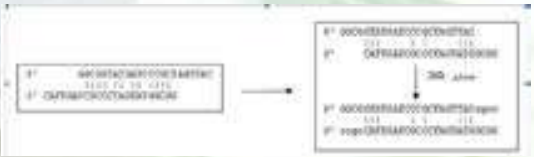
نوکلئوتیدهای انتهایی

هر دو انتهای ۳ پریم و ۵ پریم یک پرایمر برای عملکرد مناسب آن اهمیت دارد. موقعیت انتهای ۳ در پرایمر برای کنترل اتصال نسبی‌مهم است(۱۷). در برخی پروتکل‌های PCR، برای مثال در روشARMS، اتصال نسبی‌انتهای پرایمر به توالی DNA مورد نیاز است. بنابراین در طراحی پرایمر اختصاصی ARMS، ممکن است عمداً یک عدم تطابق بازی در انتهای ۳ در نظر گرفته شود(۱۸). برای یک واکنش PCR استاندارد نباید در انتهای ۳ پرایمر از تکرارهای سه‌تایی یا تعداد زیادی از نوکلیوتیدهای C و G استفاده کرد؛ چون انتهای غنی از GC منجر به اتصال نسبی‌و ناقص پرایمرها به الگو می‌شود. از طرف دیگر مکمل بودن انتهای ۳ پرایمرها، منجر به کاهش میزان اتصال شده که در این شرایط، زمینه تشکیل اتصال پرایمرها به خود(primer dimer) افزایش یافته و تکثیر قطعه DNA مورد نظر کاهش می‌یابد(۱۷). انتهای ۵ پرایمرها نسبت به انتهای ۳ می‌بایست چسبنده‌تر و پایدارتر باشد تا به عنوان گیره اتصالی به الگو عمل کند. انتهای ۳ نیز بهتر است نسبتاً ناپایدار طراحی گردد تا از اتصال کاذب و غیر اختصاصی و تشکیل باندهای ثانویه و اضافی جلوگیری شود(۹).

دایمر پرایمر و تشکیل ساختار ثانویه

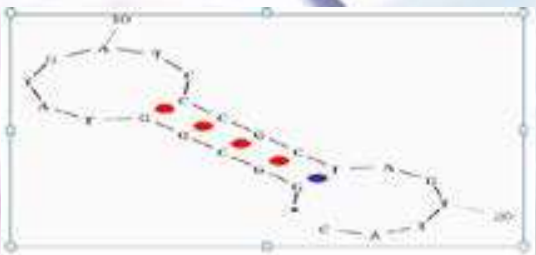
اتصال ناخواسته بین انتهای ۳´ پرایمر و انتهای ۵ پرایمر دیگر، در حین واکنش PCR منجر به ایجاد یک محصول ناخواسته به نام پرایمر دایمر می‌شود(شکل ۲). در واقع یک حالت رقابتی بین محصول پرایمر دایمر و قطعه مورد نظر جهت تکثیر به‌وجود می‌آید. به‌طور کلی، اتصال پرایمر به هر توالی به جز توالی هدف، سبب کاهش تکثیر مطلوب می‌شود که نتیجه آن اتصال ضعیف توالی هدف در ژل یا تشکیل اسمیر است(۱۹). در صورتیکه در واکنش PCR از

چندیـــن جفـــت پرایمـــر اســـتفاده شـــود (روش multiplex PCR)، احتمـال مکمـل بـودن پرایمرهـا را بایـد در نظـر داشـت(۲۰). معمـولاً بـرای بـه حداقـل رسـاندن تشـکیل پرایمـر دایمـر و اتصـالات کاذب، دمـای annealing واکنـش PCR را بـالا می‌برنـد (بیشـتر از ۵۰ درجـه). همچنیـن بـرای پیشـگیری از احتمـال تکثیـر غیراختصاصـی پرایمـر قبـل از شـروع چرخـه حرارتـی، می‌تـوان از پروتـکل Hot start اسـتفاده کـرد. در روش Hot start همـه اجـزای واکنـش بـه جـز یـک مـورد (معمـولاً آنزیـم taq پلیمـراز) در دمـای اتـاق مخلـوط شـده و پـس از انجـام مرحلـه دمایـی دناتوراسـیون اول، نمونه‌هـا را بـر روی یـخ بـه مـدت دو دقیقـه قـرار داده و سـپس آنزیـم taq پلیمـراز را بـه منظـور شـروع واکنـش اضافـه می‌کننـد(۲۱).



شـکل۲: پرایمـر دایمـر و گسـترش آن طـی واکنـش PCR

وجـود توالـی پالیندرومـی‌در پرایمـر، منجـر بـه تـا شـدن (بـه عقـب برگشـتن) پرایمـر و تشـکیل سـاختار سـنجاق سـر(hairpin) می‌شـود کـه پیامـد ایـن حالـت نیـز کاهـش راندمـان PCR اسـت (شـکل ۳). به‌منظـور جلوگیـری از تشـکیل پرایمـر حلقـوی و ایجـاد سـاختار سـنجاق سـری، می‌بایسـت پرایمرهـا بـه گونـه‌ای طراحـی شـوند کـه فاقـد هـر گونـه همولـوژی درداخـل توالـی نوکلیوتیـدی خـود باشـند. نکتـه دیگـر خطـر وجـود همولـوژی بیـن پرایمـری اسـت کـه همولـوژی نسـبی‌در نواحـی داخلـی دو پرایمـر منجـر بـه هیبریـد شـدن دو پرایمـر و تشـکیل پرایمـر دایمـر می‌شـود. بـرای جلوگیـری از احتمـال رخـداد چنیـن مشـکلاتی می‌بایسـت پرایمرهـای طراحی‌شـده را بـا اسـتفاده از برنامه‌هـای بیوانفورماتیکـی چـون FinEnzime و jPCR مـورد بررسـی قـرارداد. از دیگـر نـکات حایـز اهمیـت در طراحـی پرایمـر، بررسـی عـدم وجـود توالی‌هـای پلی‌مورفیـک در توالـی پرایمـر بـوده کـه در ایـن مـورد نیـز می‌تـوان از برنامـه SNPcheck کمـک گرفـت(۱۴).



شکل۳: ساختار ثانویه .Hairpain

طـول و محتوای GC قطعه هدف

میـزان محصـول PCR بـر روی راندمـان تکثیـر موثـر اسـت. طـول بهینـه محصـول، بسـتگی بـه نـوع الگـوی اسـید نوکلئیـک و نیـز هـدف از انجـام واکنـشPCR دارد. معمـولاً بـا اسـیدهای نوکلئیـک اسـتخراج شـده از بافت‌هـای تثبیـت شـده نمی‌تـوان قطعـات بزرگـی تکثیـر کـرد،

امـا از پلاسـمید خالـص و یـا DNA بـا وزن مولکولـی بـالا می‌تـوان محصـولات بیشـتر از ۳ کیلوبـاز را به‌دسـت آورد. اگـر هـدف از PCR توالی‌یابی‌باشـد، طـول بهینـه قطعـه تکثیـر شـونده بیـن ۱۵۰ تـا ۱۰۰۰ بـاز می‌باشـد ولـی اگـر هـدف هیبریداسـیون یـک قطعـه خـاص DNA باشـد، طـول قطعـه بیـن ۱۲۰ تـا ۳۰۰ بـاز نیـز مناسـب اسـت(۹).

طـول قطعـه هـدف بـه نـوع روش PCR نیـز بسـتگی دارد، به‌عنـوان مثـال در روش PCR کمـی(Real time PCR) کـه بـرای بررسـی بیـان ژن مـورد اسـتفاده قـرار می‌گیـرد، طـول بهینـه قطعـه توالـی بـرای کسـب بیشـترین راندمـان، بیـن ۲۵۰ تـا ۷۵۰ جفـت بـاز می‌باشـد. ایـن مقـدار از طـول قطعـه هـدف، راندمـان مرحلـه رونوشـت‌برداری معکـوس و PCR را بـالا می‌بـرد(۲۲).

انواع پرایمر

همانطـور کـه قبـلا ذکـر شـد اختصاصیـت هـر واکنـش PCR بسـتگی مسـتقیم بـه پرایمرهـای آن دارد و در نتیجـه بـرای هـر نـوع پروتـکل PCR می‌بایسـت پرایمـر خـاص آن طراحـی شـود. تاکنـون پرایمرهـای مختلفـی بـرای انـواع روش‌هـای PCR طراحـی شـده انـد کـه در جـدول ۱ بـه برخـی از آنهـا اشـاره شـده اسـت.

جدول۱: برخی از انواع پرایمرها

پرایمر	کاربرد
Anchor Primer	این پرایمر با یک قسمتی پرایمری متصل شوند به توالی شناخته در روش Anchor-PCR استفاده می‌شود. خود پرایمر Anchor به توالی شناخته شده متصل می‌شود که در این مقطع توالی شناخته تکثیر می‌یابد.
Competimer	در روش‌های کمی PCR کاربرد دارد این پرایمر غیرفعال کننده‌ای است.
Inner primer	یکی از جفت پرایمرهایی که در فاز دوم Nested PCR استفاده می‌شود
Outer primer	یکی از جفت پرایمرهایی که در فاز اول Nested-PCR استفاده می‌شود
Self-repairing primer	یک پرایمر مخلوط شده با نوکلیوتید است که با تشکیل توالی مورد نظر فعال می‌شود

هـر روزه توالی‌هـای اسـید نوکلئیکـی جدیـدی بـه پایگاه‌هـای داده افـزوده می‌شـود. بسـیاری از ژن‌هـای مهـم در چندیـن گونـه توالی‌یابی‌شـده‌اند، حتـی در برخـی مـوارد نیـاز اسـت بـه مطالعـه ژن‌هـای همتـا در گونه‌هـای دیگـر (کـه به‌عنـوان مدل‌هـای حیوانـی بـرای مطالعـات بیمـاری اسـتفاده می‌شـود) بپردازیـم. بدیـن منظـور در دهه‌هـای گذشـته از توالی‌یابی‌مجـدد ایـن ژن‌هـای همتـا بـرای بررسـی سـطح بیـان ژن و دیگـر مطالعـات مرتبط بـا PCR اسـتفاده می-شـد. امـا در سـال ۱۹۹۲ bulat، و همـکاران کاربـرد پرایمرهـای جهانـی را معرفـی کردنـد(۸). ایـن پرایمرهـا مطالعـه سـریع ژن‌هـای جدیـد در مدل‌هـای حیوانـی جدیـد را فراهـم می‌کنـد.

در سـال ۱۹۹۸ بـر اسـاس توالـی پلی‌پپتیـدی ژن‌هـای همتـا، اسـتراتژی جدیـدی بـرای طراحـی پرایمـر بـرای تکثیـر قطعـات ناشـناخته ارائـه شـد. به‌منظـور کاهـش میـزان دژنـره بـودن کـد ژنتیکـی، ایـن پرایمرهـا بـرای نواحـی بـا حفاظـت شـدگی بـالا بـر اسـاس توالـی آمینواسـیدی طراحـی شـدند (بـه جـزء امینـو اسـید TRP و MET، سـایر آمنواسـیدها بیشـتر از یـک کـد ژنتیکـی در توالـی نوکلئوتیـدی دارنـد کـه ممکـن اسـت منجـر بـه تفـاوت توالـی در ژن‌هـای همتـا شـود). در طراحـی پرایمـر بـر اسـاس توالـی پپتیـدی کـد شـده بـه وسـیله قطعـه مـورد مطالعـه بایـد بـه دژنـره بـودن کدژنتیکـی توجـه داشـت. گاهـا محقیقیـن کـه

در زمینه کلون‌کردن ژن‌های جدید فعالیت دارند ممکن است شناخت جزئی از توالی پلی پپتیدی داشته باشند. در این حالت یا از پرایمرهای جهانی استفاده می‌شود و یا این که از ترجمه معکوس توالی پروتئینی به توالی نوکلئوتیدی و سپس طراحی پرایمر برای آن توالی استفاده می‌شود. این پرایمرها را پرایمرهای دژنره می‌نامند(۲۳و۲۴).

برای کاهش تعداد بالقوه توالی‌های پرایمری، سعی براین است که توالی‌های کمتر دژنره در داخل قطعه‌ی مورد مطالعه استفاده شود. از کاربردهای دیگر پرایمرهای دژنره شناسایی خانواده‌های ژنی در یک ژنوم است زیرا این ژن‌ها همولوژی بالایی از لحاظ توالی نوکلئوتیدی و نیز آمینواسیدی دارند(۲۴).

Nested PCR

از روش Nested PCR در زمانی که نمونه اولیه DNA از لحاظ کیفی وکمی‌برای تکثیر مناسب نبوده یا خلوص نمونه اولیه کم است، استفاده می‌شود. در این روش ابتدا نمونه با استفاده از یک جفت پرایمر بیرونی که قطعه مد نظر را پوشش می‌دهد، طی ۳۰-۲۰ چرخه تکثیر یافته و سپس مقدار بسیار کمی‌از محصول واکنش را برای مرتبه دوم و با استفاده از یک جفت پرایمر داخلی، برای تکثیر قطعه هدف طی ۲۵-۱۵ چرخه تکثیر می‌دهند. پرایمرهای داخلی، مکمل قطعه‌ای از توالی هدف‌اند که در داخل ناحیه بزرگتر محصول واکنش PCR اول قراردارد. این روش بسیار موفقیت‌آمیزتر و اختصاصی‌تر از روش‌های دیگر جهت تکثیر مقدار ناچیزی از DNA است. در هنگام طراحی پرایمرهای Nested PCR باید به عدم وجود دایمر پرایمر یا دایمر دو رگه (cross dimer) دقت کرد(۲۵).

Multiplex PCR

تکثیر هم‌زمان دو یا تعداد بیشتری از توالی‌های هدف در یک نمونه واحد را Multiplex PCR می‌نامند. بهتراست برای هر توالی هدف یک جفت پرایمر ویژه طراحی گردد، اما می‌توان پرایمرها را به گونه‌ای طراحی کرد که یک پرایمر ویژه، نواحی متفاوتی را با دو یا تعداد بیشتری از پرایمرهای همتا تکثیر کند. در هنگام طراحی پرایمرهای Multiplex PCR، باید به دمای annealing و محتوای GC مشابه پرایمرها دقت بسزایی داشت. درصورتیکه برای تفسیر قطعات حاصل از این نوع PCR از ژل الکتروفورز استفاده گردد، باید اندازه طول قطعات با دقت انتخاب گردند؛ به‌گونه ای که فرآورده تکثیری محل‌های مختلف از یکدیگر قابل تمایز باشند. امروزه از Multiplex PCR برای اهداف تشخیصی بالینی مانند شناسایی حاملین DMD به‌طور گسترده استفاده می‌شود(۲۶).

منابع اینترنتی و نرم افزارهای طراحی پرایمر

استفاده از نرم‌افزار در بیولوژی، بعد جدیدی از حوزه بیوانفورماتیک است. در حال حاضر

برنامه‌هـای متنوعـی به‌منظـور طراحـی پرایمـر در دسـترس می‌باشـد کـه بسـیاری از آن‌هـا بـه صـورت رایـگان در اینترنـت موجـود اسـت و بسـیاری از دانشـگاه‌ها بـرای کاربـران خـود سـرورهایی را تعریـف کرده‌انـد کـه کاربـر بعـد از ورود می‌توانـد بـه صـورت رایـگان مراحـل آنالیـز پروتئیـن و اسـیدنوکلئیک را انجـام دهـد. همچنیـن به‌صـورت تجـاری نرم‌افزارهایـی بـا نسـخه-های کامـل، بـرای آنالیـز پروتئیـن و DNA، پیش‌بینـی سـاختار ثانویـه، طراحـی پرایمـر، مدل‌سـازی مولکولـی و... موجـود اسـت. از شـروع عرضـه اولیـن نـرم افزارهـا بعضـی از دانشـمندان، الگوریتم‌هـا و برنامه‌هـای کامپیوتـری متنـوع طراحـی پرایمـر را توسـعه داده‌انـد. در جـدول ۲، سـایت‌های اینترنتـی در مـورد طراحـی پرایمـر معرفـی شـده اسـت.

آدرس اینترنتی	سایت
http://biocka.ffhcc.org/codebog.html	CODEHOP
http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/genefisher	Gene Fisher
http://dopimer.interactiva.de	DoPimer
ftp://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi http://www.basic.nwu.edu/biotools/Primer3.html http://www.justbio.com/primer/index.php	Primer3
http://ak.vet.uga.edu/cgi-bin/primer.html	Primer Selection
http://genome-www5.stanford.edu/cgi-bin/SGD/web-primer	Web Primer
http://cedar.genetics.soton.ac.uk/public_html/primer.html	PCR Designer
http://www.changbioscience.com/primo/primo.html	Primo Pro 3.4
http://www.changbioscience.com/primo/primod.html	Primo Degenerate 3.4
http://pga.mgh.harvard.edu/cgi-bin/primer/primer.cgi	PCR Primer Design
http://www.med.jhu.edu/medcenter/primer/primer.cgi	The Primer Generator
http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/eprimer3.html	EPRIMER3
http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/primo.html http://atlas.synmed.edu/primo/primo_form.html	PrimerQuest
http://www.cgr.ki.se/cgr/MEDUSA	MEDUSA
http://www.ott2.fr/bio2/Oligo2kb.html	Oligonucleotides for the PCR

جـدول۲: لیسـتی از سـایت‌های طراحـی پرایمـر همـراه بـا لینـک مربـوط بـه هـر سـایت.

یـک ابـزار رایـج طراحـی پرایمـر نسـخه بـه‌روز شـده Primer۳ می‌باشـد کـه توسـط موسسـه Whitehead در ماساچوسـت آمریـکا طراحـی شـده اسـت. ایـن نسـخه کـه Primer۳Plus نـام دارد بـه صـورت رایـگان در دسـترس اسـت. در ایـن نرم‌افـزار، کاربـر می‌توانـد بـا مشـخص نمـودن نواحـی هـدف تکثیـر، بـه طراحـی پرایمـر بپـردازد. از آنجـا -کـه ۳۰ نوکلئوتیـد اول یـک توالـی کـه توسـط یـک توالی‌یـاب اتوماتیـک ایجـاد شـده قابـل اعتمـاد نیسـتند و نیـز چنـد بـاز اولـی کـه بلافاصلـه مجـاور اگزون‌هـا هسـتند، از نظـر بیولوژیکـی بـرای کارآمـدی و صحـت پیرایـش اهمیـت دارنـد، معمـولاً اسـتفاده از Primer۳Plus بـرای انتخـاب توالی‌هـای پرایمـری بالقـوه ارجحیـت دارد. ایـن پرایمرهـا توسـط حداقـل ۳۰ نوکلئوتیـد از اگـزون مـورد نظـر جـدا شـده‌اند. هم‌چنیـن نرم‌افـزار مذکـور بـه کاربـر ایـن امـکان را می‌دهـد کـه حداقـل و حداکثـر طـول پرایمرهـا و درجـه شـباهت مـورد نیـاز بیـن دمـای annealing جفـت پرایمرهـا به‌عـلاوه دیگـر معیارهـا را مشـخص کنـد. برنامـه مـورد اشـاره لیسـتی از توالی‌هـای پرایمـری ممکـن را فراهـم خواهـد آورد کـه دماهـای annealing پیش‌بینـی شـده و نیـز تخمیـن احتمـال تشـکیل سـاختار ثانویـه ناخواسـته بـه سـبب جفـت شـدن بازهـای داخلـی پرایمـر را نشـان می‌دهد(شـکل ۴).

کـردن دسـتورالعمل هایـی کـه بـا کلیـک روی گزینـه"How to obtain a Genbank file" لینـک بـه صفحـه حاصـل می‌شـود قابـل دست‌یابی‌اسـت. فایـل Genbank مذکـور بایـد در ابتـدا در دیسـک saveشـده باشـد و سـپس بـا اسـتفاده از دکمـه"Browse" کـه در صفحـه Genomic Primers واقـع اسـت، uploadشـود.

شکل۴: primer۳plus

در جـدول ۳، نرم‌افزارهایـی به‌منظـور طراحـی پرایمـر ارائـه شـده اسـت:

نرم افزار	لینک دانلود
PrimerDesign	http://www.chemic.unimelbourg.de/?c?/tbrclass/pdhome.html
Primer Premier	http://www.biosoft.com/freesamples/downlds23.html
Primer Designer	http://genomics.com/expressions/primer.htm
OligoD7	http://www.oligo.net
PrimerSelect	www.dnastar.com
Beacon Designer 1.2	http://www.premierbiosoft.com/molecular_beacons/index.html
Primer Premier 5	http://www.premierbiosoft.com/primerdesign/primerdesign.html

جـدول۳: تعـدادی از نرم‌افزارهـای طراحـی پرایمـر همـراه بـا لینـک دانلـود بـرای کامپیوترهـای شـخصی، توضیحـات مربـوط بـه اسـاس کار ایـن نـرم افزارهـا در لینـک مربوطـه ارائـه شـده اسـت.

وب‌سـایت دیگـری وجـود دارد کـه عـلاوه بـر اینکـه توالی‌هـای پرایمـری را به‌طـور اتوماتیـک انتخـاب می‌کنـد، بلکـه ایـن عمـل را بـرای هـر اگـزون یـک ژن نیـز انجـام می‌دهـد. ایـن صفحـه وب کـه بـر پایـه Primer۳ اسـت و "Genomic Primer" نامیـده شـده اسـت، کاربـردی می‌باشـد. امـا به‌عنـوان فایـل مرجـع، بـه یـک فایـل توالـی Genbank نیـاز دارد. مـورد اخیـر بـا دنبـال