

PCR 引物设计

PCR 技术实际上就是在模板 DNA、引物、dNTP 都存在的条件下依赖于 DNA 聚合酶的酶促反应，其效率和特异性取决于两个方面：一是引物与模板的特异结合；二是多聚酶对引物的有效延伸。因此，引物的设计对于 PCR 极为重要，引物设计的不好，会导致无法顺利扩增得到目的片段。

本文主要对 PCR 引物设计的原则，常见的引物设计工具及引物设计的总体流程做一介绍。

引物设计基本原则

设计 PCR 引物的目的是为了找到一对合适的核苷酸片段，使其能有效地扩增模板 DNA 序列。根据多年来的实践经验，引物的设计有一些大家都认可的原则。

引物设计有 3 条基本原则：首先引物与模板的序列要紧密互补，其次引物与引物之间避免形成稳定的二聚体或发夹结构，再次引物不能在模板的非目的位点引发 DNA 聚合反应（即错配）。具体实现这 3 条基本原则需要考虑诸多因素，如引物长度，GC 含量，引物碱基分部，Tm 值，引物特异性，形成引物二聚体及发夹结构的能值等等。

- 长度：引物的长度一般为 15-30bp，常用的是 18-27bp，但不能大于 38bp；
- GC 含量：引物 GC 含量一般为 40%-60%，以 45-55%为宜，上下游引物 GC 含量和 Tm 值要保持接近；
- 碱基分布：碱基要随机分布，且引物自身和引物之间不能有连续 4 个碱基的互补。3'端最好不要是连续碱基，GGG 或 CCC 会导致错误的引发，同时 3'端最后一个碱基最好不要是 A 或 T，会导致错配；
- Tm 值：引物所对应的模板序列的 Tm 值最好在 72°C 左右，至少要在 55-80°C 之间，Tm 值曲线以选取 72 度附近为佳；
- 引物序列在模板内没有相似性较高的序列，否则容易导致错配（设计完成后可以使用 BLAST 检索，确认引物特异性）；
- 引物二聚体及发夹结构的能值不能过高（能值的绝对值一般不要超过 4.5），过高易导致产生引物二聚体带并且降低引物有效浓度而使 PCR 反应不能正常进行；
- 引物修饰：引物的延伸是从 3 端开始的，不能进行任何修饰；引物的 5 端限定着 PCR 产物的长度，它对扩增特异性影响不大。因此，可以被修饰而不影响扩增的特异性；

- 如果扩增区域为编码区域，引物 3' 端不要终止于密码子的第 3 位，因密码子的第 3 位易发生简并，会影响扩增特异性与效率；

常用的引物设计软件

目前引物的设计主要借助一些分子生物学软件或在线工具来实现。常见的引物设计软件有 Oligo 6、Premier Premier、Primer 3、Vector NTI Suit、Dnasis、Omiga、Dnastar 等。最为常用的是 Oligo 6、Premier Premier 及 Primer 3。

Oligo 6

Oligo 是一款非常著名的软件，可以实现引物的设计及引物的评估分析，是目前最好、最专业的引物设计软件。其主要功能包括：普通引物对的搜索、测序引物的设计、杂交探针的设计以及评估引物对质量等等。

Premier Premier

Premier Premier 是由加拿大的 Premier 公司开发的专业用于 PCR 或测序引物以及杂交探针的设计和评估的软件，也是一款应用很广泛的软件。利用该软件还可以实现简并引物的设计。

Primer 3

Primer 3 是由美国 whitehead 生物医学研究所基因组研究中心在因特网上提供的一款免费的在线 PCR 引物设计程序（在线网址：<http://primer3.ut.ee/>），一个非常简单却高效的引物设计在线软件。只需在目标序列中粘贴 DNA 序列后点击搜索即可。其中，可通过多种方式来对结果进行筛选，包括 PCR 产物的大小、引物大小、Tm 范围和其它参数。同样，还可使用 Primer3 来设计用于 PCR-ELISA 的杂交探针和其他基于探针的 PCR 引物设计。

引物设计流程

引物设计及初步筛选

运用软件 Premier Premier 或 Primer 3 来设计引物，再用软件 Oligo6 进行引物评估，就可以初步获得一组比较满意的引物。

引物的二次筛选

引物的二次筛选是指在初次筛选出的几对引物中进一步筛选出合适我们进行特异、高效 PCR 扩增的那对引物。本步骤应注意一下两点，一是得到一系列引物分别在 Genebank 中进行回检。也就是把每条引物在对比工具 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) 的 blastnr 中进行源性检索，弃掉与基因组其它部分源性比较高的引物，也就是有可能形成错配的引物。一般连续 10bp 以上的同源有可能形成比较稳定的错配，特别是引物的 3' 端应避免连续 5-6bp 的同源。二是以 mRNA 为模板设计引物时要先利用生物信息学的知识大致判断外显子与内含子的剪切位点，然后弃掉正好位于剪切位点的引物。

引物的修饰

引物确定以后，可以对引物进行必要的修饰，例如可以在引物的 5' 端加酶切位点序列；标记生物素、荧光素、地高辛等。

引物的最终评估

经过初次筛选和二次筛选后得到的那对引物便可以用于合成，合成后我们经过 PCR 扩增可以对引物进行最终的评估。一是 PCR 扩增的特异性和效率。经过 PCR 条件优化后能否获得特异性条带，即无目的条带之外的多余条带。另外，PCR 产物的量是否足够，即无不出带和条带很弱的现象。二是以 DNA 为模板设计引物时，PCR 扩增产物是否与预期 PCR 产物大小相当。如果差距太大（大于 100bp），有可能是错配产物，三是是否形成引物二聚体带。我们结合引物最终评估和测序的结果可以对引物设计的成败做出判定，为我们以后进行引物设计积累宝贵的经验。

更多阅读

- [PCR 实验模板的制备](#)
- [PCR 聚合酶的选择](#)
- [PCR 标准操作流程](#)

更多优质服务推荐

1

SingleB® mAb Discovery Service

SingleB®单B细胞快速单抗发现

德泰生物提供SingleB®单B细胞快速单抗发现服务,利用SmartFlow® FACS记忆B细胞筛选平台与DeepLight®浆细胞筛选平台,实现记忆B细胞与浆细胞的双筛选。平台适用于小鼠、兔、羊驼、人源化小鼠、绵羊等多种免疫对象,从动物免疫到获得单抗,快至29天,比传统杂交瘤技术至少节省120天。

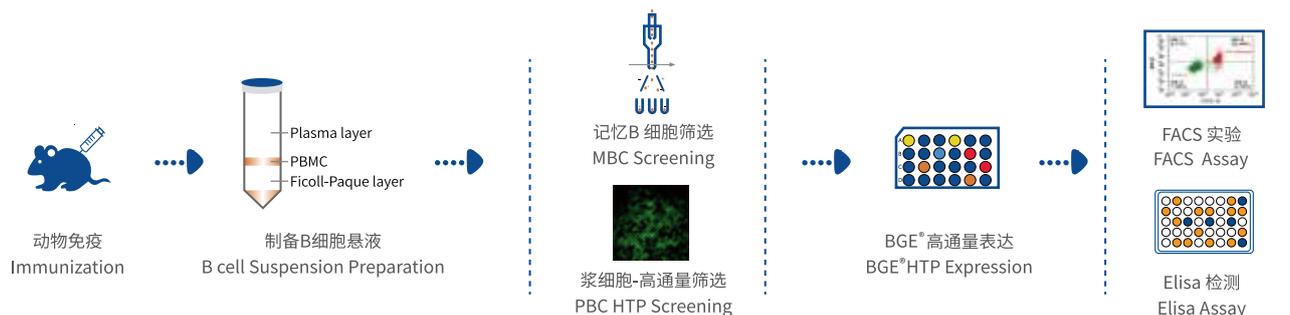
平台优势

- 支持蛋白、多肽、细胞、病毒等多种类型抗原免疫
- 记忆B细胞 & 浆细胞双筛选,保证B细胞多样性
- 单细胞扩增阳性率高,无需刺激培养,减少多样性损失
- 重轻链天然配对,亲和力更优
- 高通量,周期短,单抗发现快至29天
- ELISA、FACS、WB、IHC等多平台验证

可开发单抗物种



服务流程





Recombinant Antibody Expression Service

重组抗体表达

德泰生物拥有完善的重组抗体表达与纯化体系、抗体多工艺质量验证体系。已交付的重组抗体项目种类包括scFv、Fab、(Fab')₂、VHH、嵌合抗体、双特异性抗体、Fc融合蛋白、全长IgG、IgM。cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器用于HEK293/CHO细胞的小试及大量培养。HPLC纯度、内毒素、浓度等要求均可以根据您的下游应用进行定制。

服务优势



服务流程

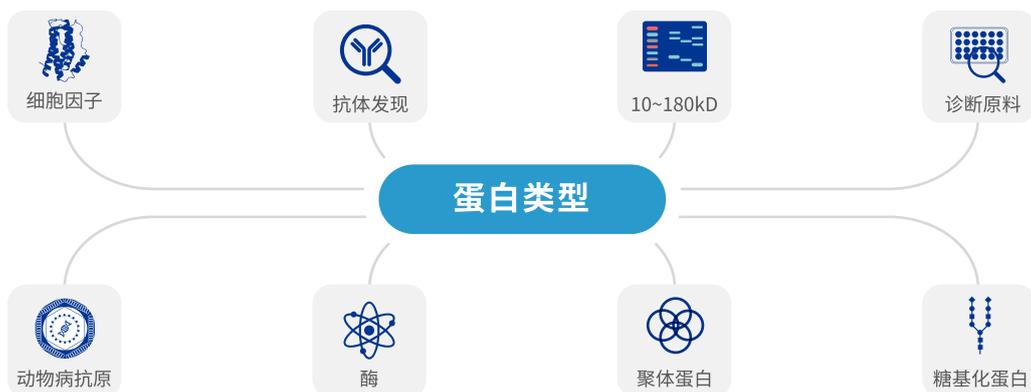


Recombinant Protein Expression Service

重组蛋白表达

原核蛋白表达系统、哺乳动物细胞蛋白表达系统

德泰生物拥有完善的原核蛋白表达与纯化体系和哺乳动物细胞蛋白表达与纯化体系。基于细胞因子、酶、诊断原料蛋白的工业化需求，我们配备了发酵设备并推出了大规模发酵制备服务；我们还配备了cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器，用于HEK293/CHO等真核细胞的小试及大量培养。



4

Hybridoma Antibody Gene Sequencing Service

杂交瘤抗体基因测序

德泰生物拥有mRNA全长测序平台和Failsafe®假基因排除技术,能够提供快速、可靠的杂交瘤抗体基因测序服务。

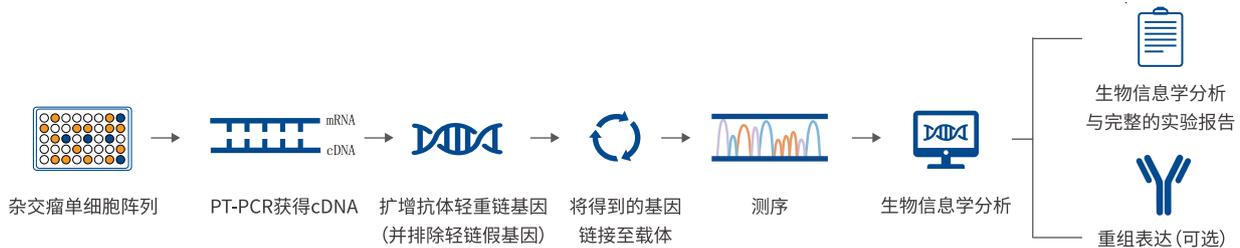
应用场景

- 抗体序列保护:获取抗体基因序列后可通过专利对CDR区进行保护。
- 生产方式备份:杂交瘤存在退化转阴风险,抗体序列可通过基因工程方式轻松转化为抗体样品。
- 抗体工程改造:获得的抗体序列可用于抗体人源化、双特异性抗体等抗体工程改造。

服务优势

- 极速体验:测序5天,表达5天,全程高通量
- 细胞需求少:只需1~5个细胞,可以接收孔板样品
- 保证测序结果准确:采用Failsafe®假基因排除技术,可排除κ轻链假基因
- 测序范围广:可测小鼠、大鼠、兔、羊等物种的IgM和IgG的所有亚型
- 一站式服务:德泰生物拥有丰富经验,可提供表达验证服务

服务流程



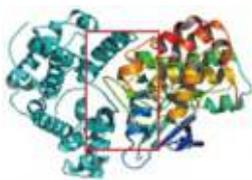
5

Biomolecular Interaction Analysis Service

分子间相互作用检测

德泰生物提供的分子间相互作用检测服务基于表面等离子共振 (SPR) 平台及生物膜干涉技术 (BLI) 平台,能够实现对分子间亲和力的定量和定性分析。与传统的GST pull down, 免疫共沉淀, 酵母双杂交等相比, 具有更高的灵敏度、检测通量及较低的样品要求等优点。

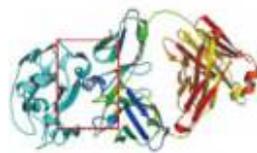
检测范围



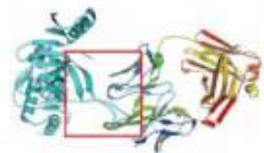
蛋白和蛋白



蛋白和小分子



蛋白和抗体



蛋白和抗体Fab片段

检测范围包括蛋白-蛋白、抗体-抗原、抗体片段-抗原、蛋白-抗体、蛋白-小分子、抗体-多肽、蛋白-DNA、DNA-DNA间的相互作用。

6

Antibody Humanization Service

抗体人源化

德泰生物人源化改造服务基于人工智能之深度学习算法,通过构建抗体结构模型、CDR移植与回复突变、识别关键氨基酸及人源化运算,获得人源化程度高且突变能低的抗体序列。

服务优势



重链和轻链同时参与优化



改造后的抗体人源化程度>90%



人源化抗体的亲和力与初始抗体相当



可进行多物种的抗体人源化

服务流程

- 1 Antibody sequence confirmation
- 2 Human germline acceptor selection
- 3 CDR grafting
- 4 Back mutation
- 5 Mutation energy ranking
- 6 Antibody expression
- 7 Affinity ranking

7

Stable Cell Line Development Service

生产型稳转细胞株构建

德泰生物提供高表达哺乳动物稳定细胞株构建服务,筛选过程使用先进的可视化DeepLight®单克隆细胞筛选平台,较传统筛选流程快近100天,大大缩短了稳定细胞株的开发周期。

DeepLight®细胞筛选平台的优势

	有限稀释法筛选	DeepLight® On-chip筛选
筛选时间	8周	1天
细胞分离效率	低	高
筛选通量	低	高
单细胞水平筛选	否	是

服务流程



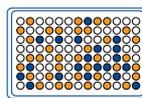
基因合成&质粒抽提



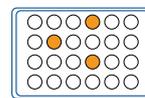
稳定转染



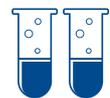
On-chip筛选



压力筛选



扩大培养



交付单克隆细胞株

服务优势



更快的筛选速度

从DNA到细胞株
较传统方法快近100天



百k级筛选通量

一次筛选640k细胞
优选高表达细胞株



可视化筛选结果

先进DeepLight®平台
高表达细胞株实时成像



稳定高产

可稳定转代50代
重组单抗可达5 g/L