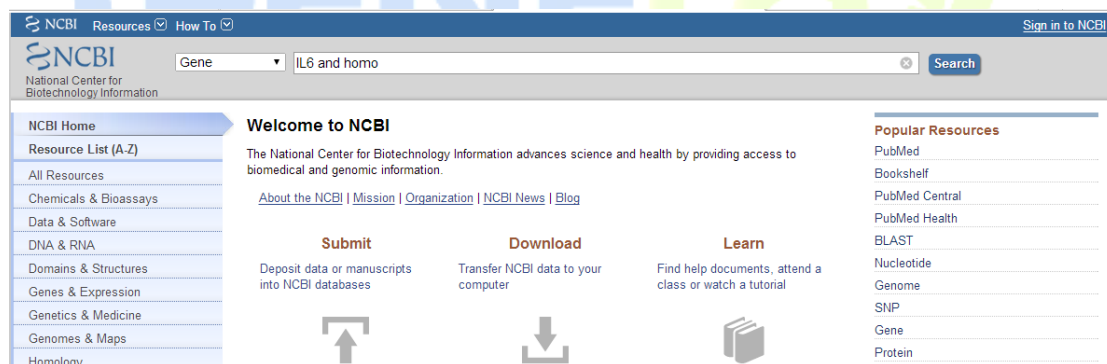


如何设计 SybrGreen 法荧光定量 PCR 引物

荧光定量 PCR 是利用荧光定量 PCR 仪 (如 ABI 7500、stepone、ROChe LightCycler、Bio-Rad CFX96 等) 通过实时追踪 PCR 每一步循环的荧光信号值来达到对起始模板量的定量分析。一次成功的荧光定量 PCR 反应除了需要稳定的仪器、优质的 Taq 酶、比较好的模板质量, 更需要高质量的引物对。想要得要高质量的引物对的前提是引物的设计必须要精益求精。下面我们以人 IL6 基因为例(以人 IL6 基因 mRNA 序列作为模板设计引物), 给大家讲解如何进行高质量的引物设计。

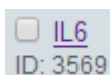
(1) 利用 NCBI 数据库, 查询基因的序列。登录 NCBI 官方主页:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>。在栏目项中选择“Gene”, 关键词输入“IL6 and homo”, 具体如下所示, 点击“Search”。

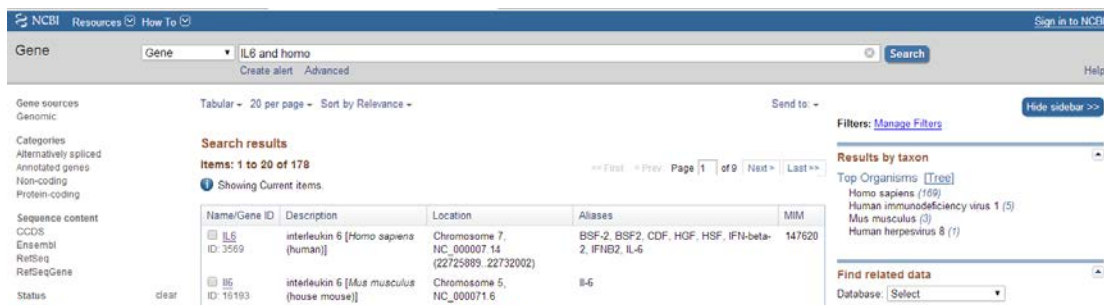


(2) 结果如下, 一般第一条基因即为所要查询的基因, 这里需要注意“Aliases”

一栏, 因为很多基因有很多别名, 在查询时需要注意。明确基因后, 直接点击



, 进入人 IL6 基因的主页。



(3) 进入人 IL6 基因的主页后，往下拉动网页，看到如下界面。由于我们设计引物的模板是 mRNA，所以我们要找到该基因的转录本信息。点击“[reference sequence details](#)”。



(4) 得到如下界面，我们看到，人 IL6 基因在 NCBI 里的记录是 2 个转录本，我们在设计引物时，除非需要检测某个特定的转录本，一般的做法是将该基因所有的转录本序列进行比对分析，找到他们共有的序列区域，选择该共有区域作为模板设计引物，这样设计的引物就能尽可能的扩增出该基因的所有 mRNA 信息。针对 IL6 基因，我们分别点击“[NM_000600.4](#)”和“[NM_001318095.1](#)”打开这两个转录本信息。

mRNA and Protein(s)	
1. NM_000600.4 → NP_000591.1 interleukin-6 isoform 1 precursor	
See identical proteins and their annotated locations for NP_000591.1	
Status: REVIEWED	
Description	Transcript Variant: This variant (1) represents the longer transcript and encodes the longer isoform (1).
Source sequence(s)	AK301141 , BC015511 , CD013918 , HY076725
Consensus CDS	CCDS5375.1
UniProtKB/Swiss-Prot	P05231
UniProtKB/TrEMBL	B4DVM1 , Q75MH2
Related	ENSP00000258743 , ENST00000258743
Conserved Domains (1) summary	
	pfam00489 IL6; Interleukin-6/G-CSF/MGF family Location:57 → 210
2. NM_001318095.1 → NP_001305024.1 interleukin-6 isoform 2	
Status: REVIEWED	
Description	Transcript Variant: This variant (2) lacks an exon in its 5' UTR and uses a downstream in-frame start codon, compared to variant 1. The encoded isoform (2) has a shorter N-terminus than isoform 1.
Source sequence(s)	CD013918 , HY076725
UniProtKB/TrEMBL	B5MC21
Related	ENSP00000385043 , OTTHUMP00000198488 , ENST00000407492 , OTTHUMT00000320075
Conserved Domains (1) summary	
	pfam00489 IL6; Interleukin-6/G-CSF/MGF family Location:1 → 134

(5) 我们看到，人 IL6 基因的两个转录本序列大小不一样，分别为 1197bp 和 1006bp。我们将这两条 mRNA 序列复制到比对软件（如 BIOEDIT 等）中，运用软件对这两条序列进行比对分析。

Homo sapiens interleukin 6 (IL6), transcript variant 1, mRNA

NCBI Reference Sequence: [NM_000600.4](#)

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

Go to:

LOCUS [NM_000600](#) 1197 bp mRNA linear PRI 05-JAN-2016
 DEFINITION Homo sapiens interleukin 6 (IL6), transcript variant 1, mRNA.
 ACCESSION [NM_000600](#)
 VERSION [NM_000600.4](#) GI:969812508

Homo sapiens interleukin 6 (IL6), transcript variant 2, mRNA

NCBI Reference Sequence: [NM_001318095.1](#)

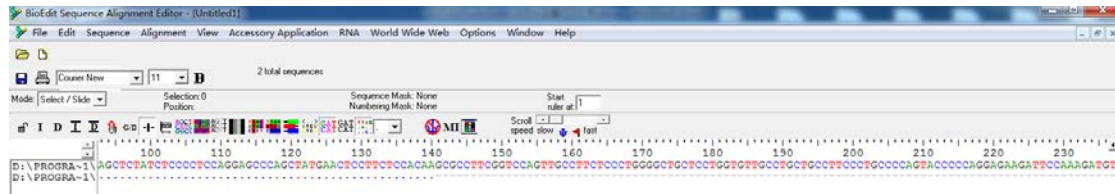
[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to:

LOCUS [NM_001318095](#) 1006 bp mRNA linear PRI 25-DEC-2015
 DEFINITION Homo sapiens interleukin 6 (IL6), transcript variant 2, mRNA.
 ACCESSION [NM_001318095](#) [XM_011515391](#)
 VERSION [NM_001318095.1](#) GI:969812509
 KEYWORDS RefSeq.
 SOURCE Homo sapiens (human)
 ORGANISM [Homo sapiens](#)

(6) 比对结果如下，从比对结果看出，这两条序列前后均一致，只有转录本 2 在 141-331bp 处发生了缺失，我们选择共有区域 331bp-1197bp 的序列作为

模板设计引物。



(7) 将这段共有序列复制到引物设计软件中，引物设计的软件很多，比如 Primer premier6.0、Oligo7.37、在线 Primer3、Beacon Designer、在线 NCBI Primer-BLAST 等。不同的引物设计软件的工作原理大同小异，基本都具备引物设计的基本原则（后面列出），但是对引物 Tm 值的计算结果不同的软件可能有差异，这主要跟计算方法有关。捷瑞生物提供免费的引物设计服务，所使用的设计软件是自主开发，并自主运行 ePCR（电子 PCR），具备引物 BLAST 功能，尽量选择最优化的引物对。下面以在线 NCBI Primer-BLAST 为例，说明引物的设计过程。

(8) 打开在线 NCBI Primer-BLAST 主页：

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome。将序列复制到制定的位置，如下图。在“PCR product size”选择 Min “80”；Max “250”（荧光定量 PCR 产物的大小尽量不要很大，保证 PCR 扩增的效率）。在“Database”一栏选择 mRNA 数据库（一般默认为 Refseq mRNA）。在“Organism”一栏选择物种是人（一般默认为 Homo sapiens）。一切设置好后，点击“Get Primers”即可。

▶ **NCBI/ Primer-BLAST: Finding primers specific to your PCR template (using Primer3 and BLAST).**

(9) 打开后会出现以下选择项，需要观察这段序列是否属于所要设计的基因序列，这里直接点击“Submit”即可。

Accession	Title	Identity	Alignment length	Seq. start	Seq. stop
NM_001318095.1	Homo sapiens interleukin 6 (IL6), transcript variant 2, mRNA	100%	865	141	1006
NM_000500.4	Homo sapiens interleukin 6 (IL6), transcript variant 1, mRNA	100%	866	332	1197
XM_011515390.2	PREDICTED: Homo sapiens interleukin 6 (IL6), transcript variant X2, mRNA	100%	858	665	1522

(10) 得到如下结果，图中给出所设计的引物的上下游引物位置；具体的某一对引物的参数；该对引物的 ePCR 结果等。考察一对引物质量是否理论上优异，需要看如下几个方面：引物 Tm 值一致，尽量在 60°C 左右；引物尽量无发卡结构二聚体等；ePCR 产物尽量单一，尽量无非特异性产物等。

Primer-BLAST results

NCBI Primer-BLAST : results: Job id=XfaDxZa2_L8yM3HwK3p_7q2_MZXpePQig more...

Input PCR template
 Range 1 - 866
 Specificity of primers primers may not be specific to the input PCR template as targets were found in selected database: Refseq mRNA (Organism limited to Homo sapiens)...help on specific primers
 Other reports Search Summary

Graphical view of primer pairs

Detailed primer reports

Primer pair 1

Primer pair 1	Sequence (5'>3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AGTGAGGAACAAGCCAGAGC	Plus	20	196	215	59.96	55.00	2.00	2.00
Reverse primer	AGCTGCGCAGAATGAGATGA	Minus	20	382	363	59.82	50.00	8.00	1.00
Product length	187								

Products on potentially unintended templates

>XM_011515390.2 PREDICTED: Homo sapiens interleukin 6 (IL6), transcript variant X2, mRNA

product length = 197
 Forward primer 1 AGTGAGGAACAAGCCAGAGC 20
 Template 860G..... 879

Reverse primer 1 AGCTGCGCAGAATGAGATGA 20
 Template 1046G..... 1027

>XM_006718447.2 PREDICTED: Homo sapiens contactin (CTTN), transcript variant X1, mRNA

product length = 1627
 Forward primer 1 AGTGAGGAACAAGCCAGAGC 20
 Template 1155 CTG.....G..... 1174

Reverse primer 1 AGCTGCGCAGAATGAGATGA 20
 Template 2782 G...C.T...G...G..... 2762

>XM_006714928.1 PREDICTED: Homo sapiens unc-5 netrin receptor A (UNC5A), transcript variant X3, mRNA

product length = 3158
 Forward primer 1 AGTGAGGAACAAGCCAGAGC 20
 Template 337 C..C.A.....T... 356

Reverse primer 1 AGCTGCGCAGAATGAGATGA 20
 Template 3494 ..G..TA...C.....T 3475

(11) 至此，引物设计的工作就结束了，接下来就是将设计的引物序列发送到引物合成公司合成，在拿到引物成品后，按照仪器和相关试剂盒说明书做预实验，调试引物的质量。理论上，选择再优的引物对，只有且只能通过真实的实验验证，才能 100%确定该对引物是否能用。在做荧光定量 PCR 实验时，对引物扩增效率的测试非常的重要，这块后续我们再具体探讨。

(12) 荧光定量 PCR 引物设计的一般原则：

① PCR 产物的长度在 70-300bp 之间，避免产物太长导致 PCR 扩增效率降低，影响定量结果；

- ② 引物设计的区域尽量选择在 mRNA 的 3' 段，尽量保证扩增的产物为该基因所表达的全部 mRNA 信息；
- ③ 如果一个基因有很多转录本，尽量选择他们的共有序列为模板来设计引物，保证扩增产物的稳定性；
- ④ 引物尽量避免发卡结构、二聚体结构、非特异性扩增产物、引物 Tm 值不一致、引物序列中有连续 4 个碱基以上的 Poly 结构等等；
- ⑤ 总之，理论上再好的引物对，只有通过真实的实验验证才能判断其是否能用、好用。

