

# PCR引物设计

李余动

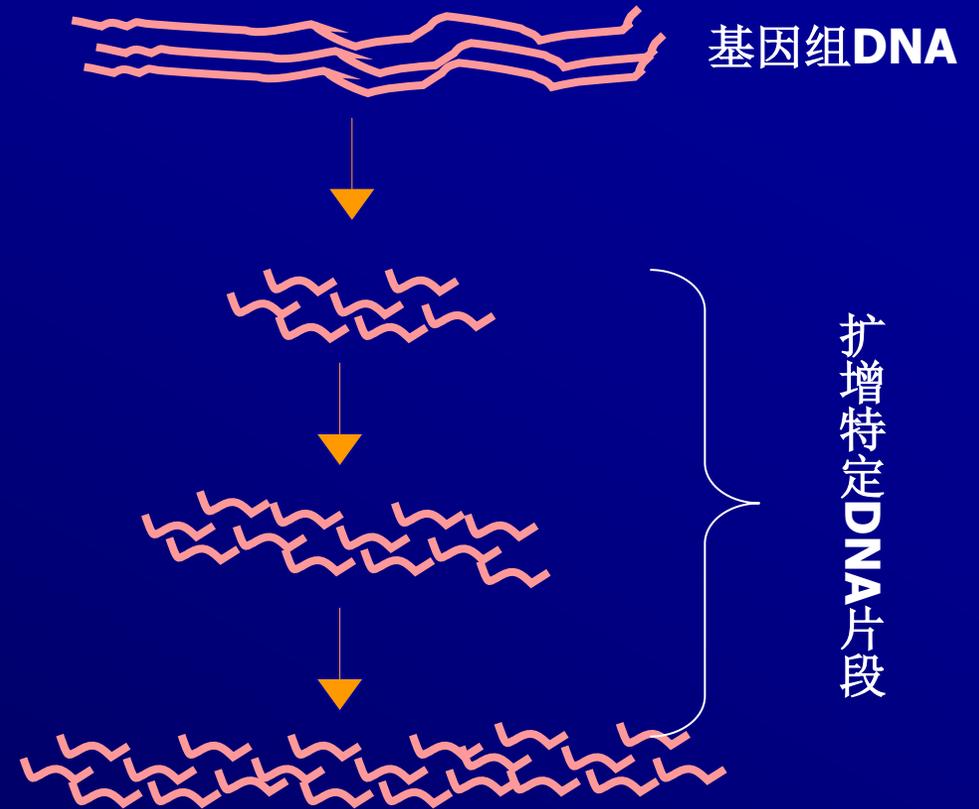
lyd@zjsu.edu.cn

# 目 录

- PCR技术简介
- PCR引物设计
- Primer Premier5引物设计
- 实时荧光定量PCR (RT-qPCR)
- Primer-BLAST引物设计

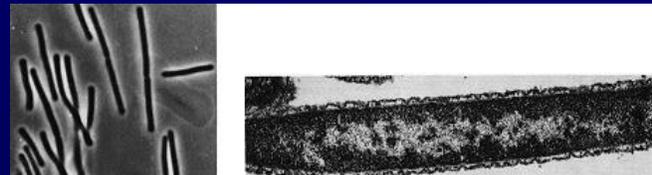
# 何为PCR技术？

- 聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)是一种体外扩增特异DNA片段的技术。此法操作简便，可在短时间内在试管中获得数百万个特异的目标DNA序列的拷贝。
- PCR技术已在分子克隆、目的基因检测、遗传病基因诊断、法医学、考古学等方面得到了广泛的应用。



# PCR技术的发展史

- 1971年, Khorana 等提出在体外经DNA变性,与适当引物杂交,再用DNA聚合酶延伸,克隆DNA的设想。
- 1976年, 中国台湾学者钱嘉韵从美国黄石公园温泉分离出的一株嗜热菌(*Thermus aquaticus* YT-1)中获得耐高温的DNA聚合酶 (**Taq酶**)。
- 1983年, Kary B. Mullis发明了PCR技术, 使Khorana的设想得到实现。
- 1988年, Saiki等将耐热DNA聚合酶 (Taq) 引入了PCR技术。



*Thermus aquaticus*

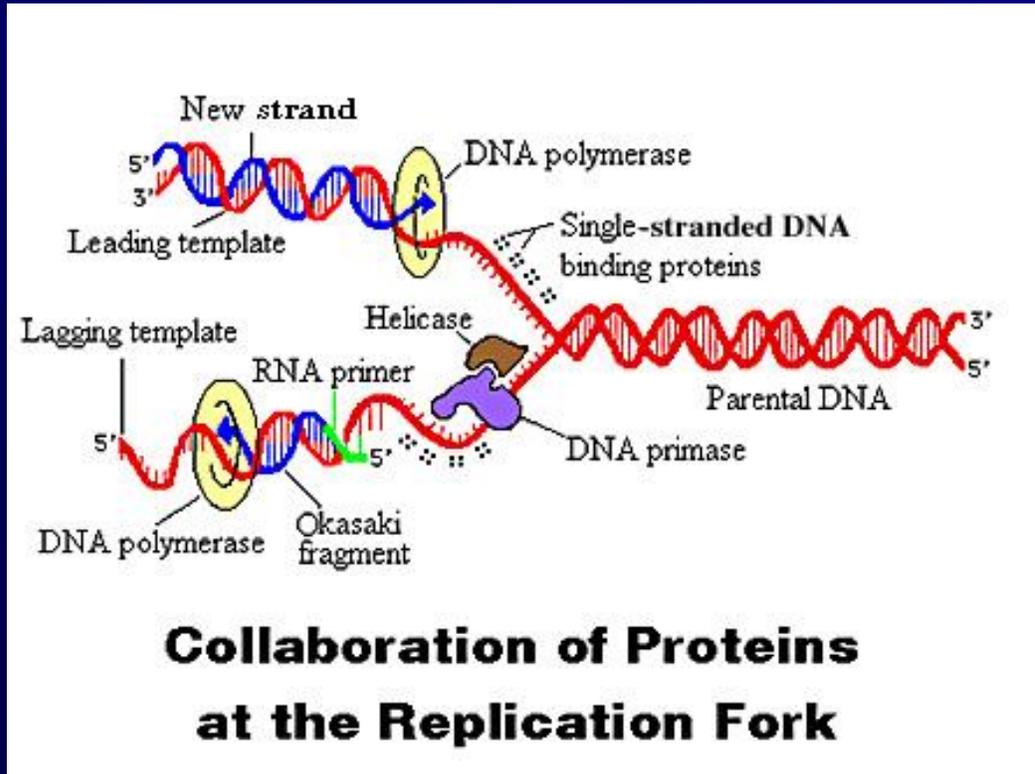


Mullis荣获1993年度诺贝尔化学奖

The bacterium *Thermus aquaticus* was first discovered in several springs in the Great Fountain area of the Lower Geyser Basin at Yellowstone National Park

# PCR技术原理

- PCR技术的基本原理是DNA的半保留复制。由于DNA复制是半保留的，两条链都可以作为模板。

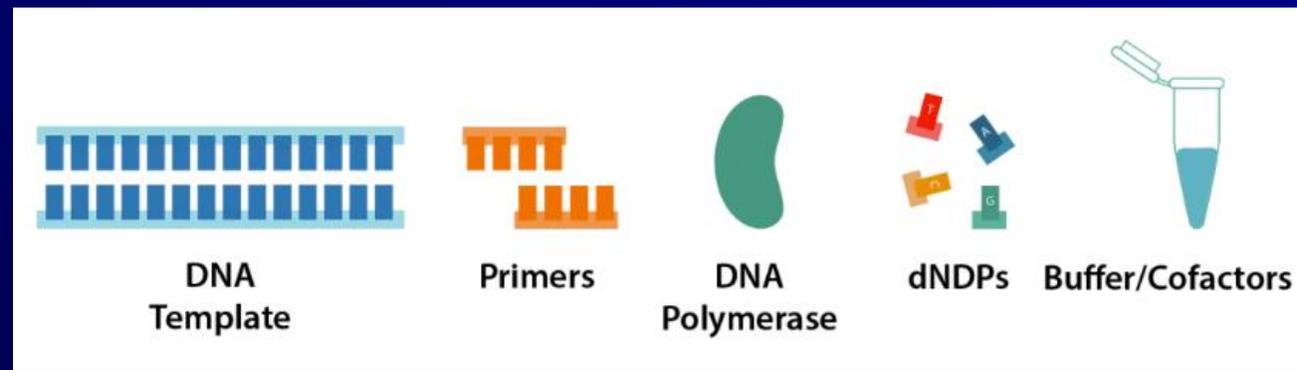


The Taq polymerase needs ca. **1 min** to synthesise **1 kbp**. So the synthesis time depends on the length of your product



# PCR技术原理

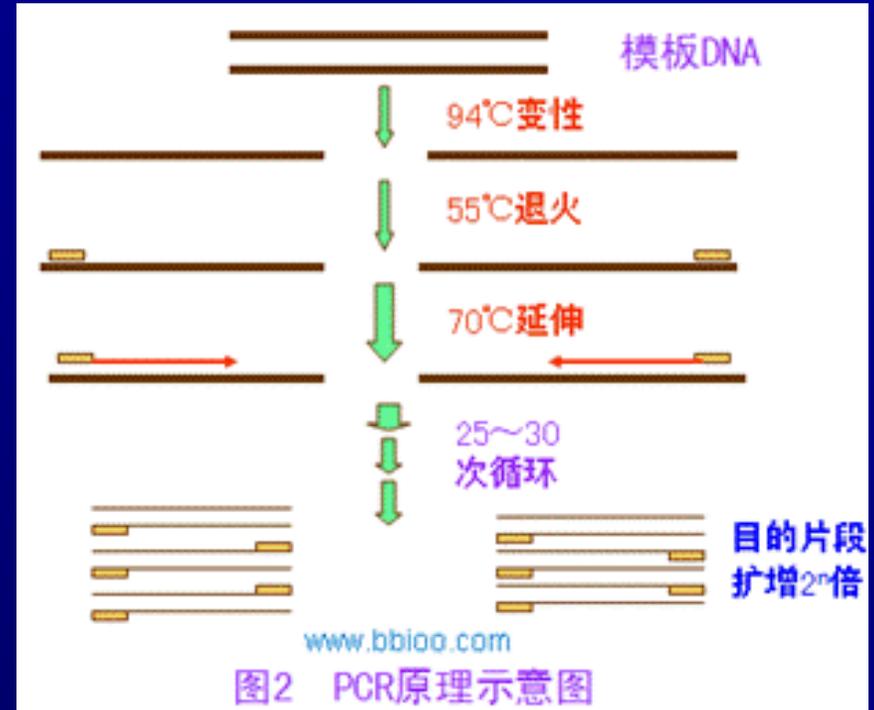
- PCR技术实际上是在**模板DNA**，**引物**和4种脱氧核苷酸(**dNTP**)存在的条件下依赖于**DNA聚合酶**的酶促合成反应。
  - ①模板DNA
  - ②引物
  - ③DNA聚合酶
  - ④4种脱氧核苷酸(dNTP)



# PCR技术原理

- PCR反应分三步：

- ①变性（denaturation）， $95^{\circ}\text{C}$ ；
- ②退火（annealing）， $55^{\circ}\text{C}$ ；
- ③延伸（extension）， $72^{\circ}\text{C}$ 。

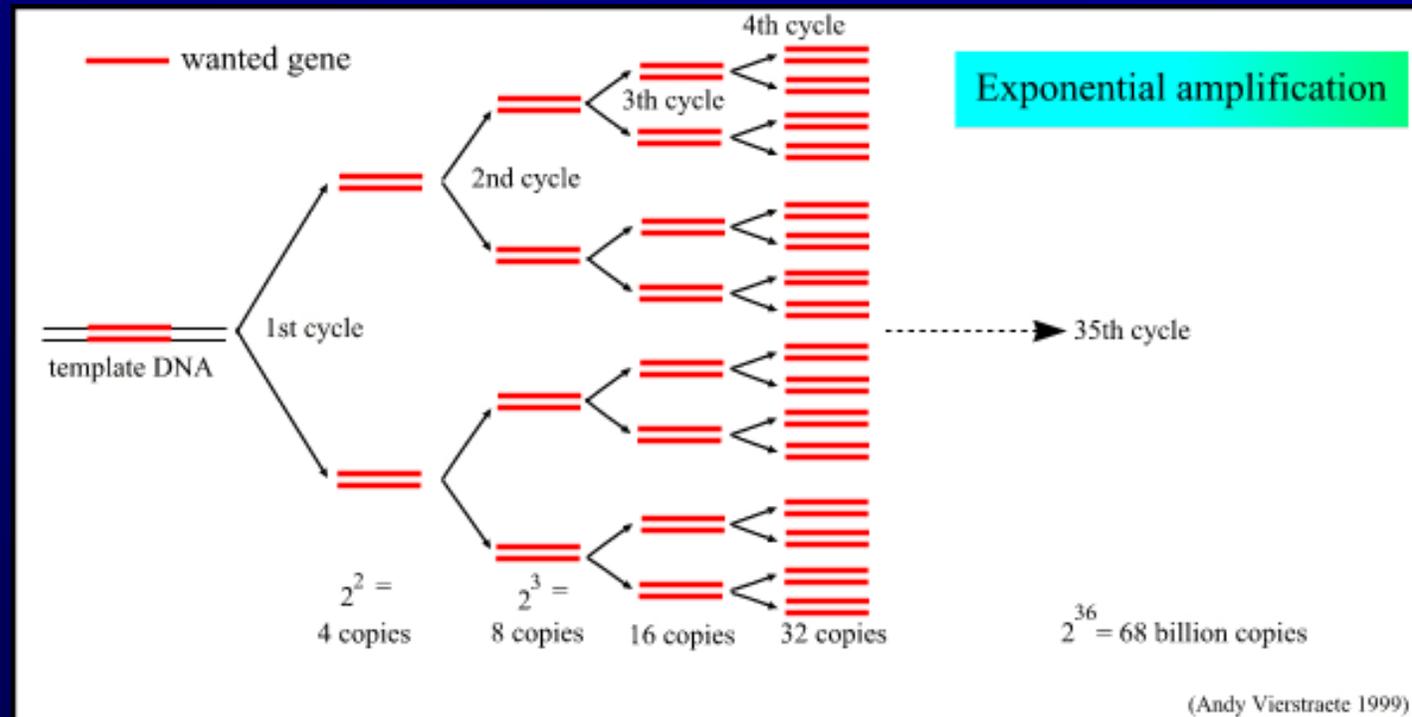


PCR反应的特异性取决于引物和模板DNA结合的特异性。

PCR is an exponential processes:

$$Y = (1+X)^n$$

(Y - DNA片段扩增后的拷贝数, X - 平均每次的扩增效率, n - 循环次数)



By applying several times this cycle, the quantity of DNA obtained is quickly enough to perform any analysis. Starting with one DNA molecule after just 20 cycles there will be a million copies and after 30 cycles there will be a billion copies.

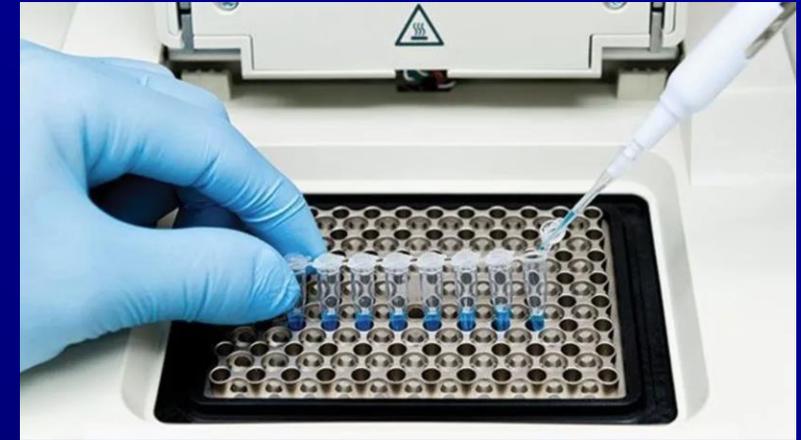
# PCR实验方法

1. 在冰浴中，向无菌的500 $\mu$ l Eppendorf管中依次加入以下溶液：

反应物	体积
无菌水(ddH <sub>2</sub> O)	11 $\mu$ l
10 $\times$ buffer	2.5 $\mu$ l
4 $\times$ dNTP(1mM)	2.5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2.5 $\mu$ l
模板DNA (20ng)	4 $\mu$ l
引物1	1 $\mu$ l
引物2	1 $\mu$ l
Taq酶 (1U/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l

---

总体积	25 $\mu$ l
-----	------------



2. 将上述反应体系混匀，稍加离心，立即置于PCR仪上。

# PCR实验方法

3. 在PCR仪上按以下循环调整好反应程序：

95°C预变性 5min

95°C变性 40s

58°C退火 50s

72°C延伸 2min (1000bp ca. 1min)

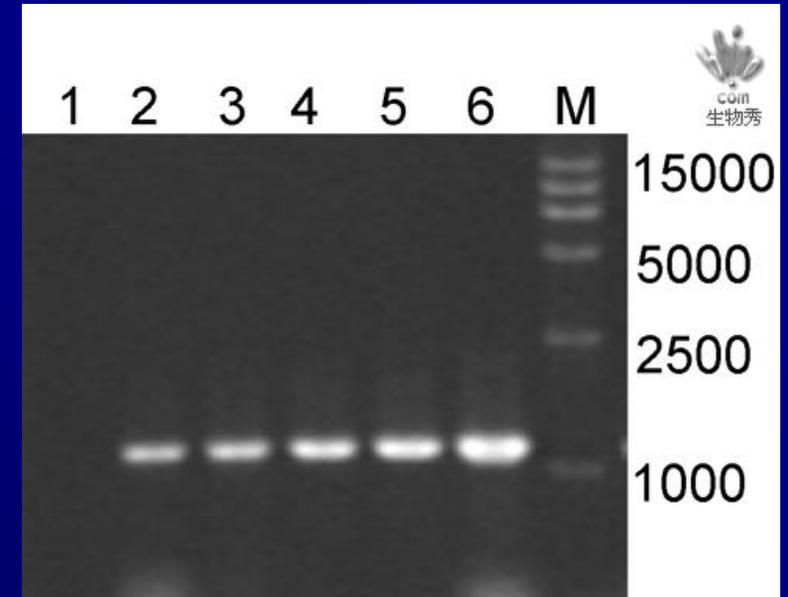
最后72°C延伸反应7分钟。

经过30-35个循环

4. 结束反应，PCR产物放置于4°C待电泳检测或-20°C长期保存。

5. 取5 $\mu$ l反应液加Loading buffer在1%琼脂糖凝胶上，120伏，电泳1小时。

7. 在凝胶成像系统上观察记录实验结



PCR实验结果

1. 对照(无模板); 2-6. PCR产物

# PCR实验的注意问题:

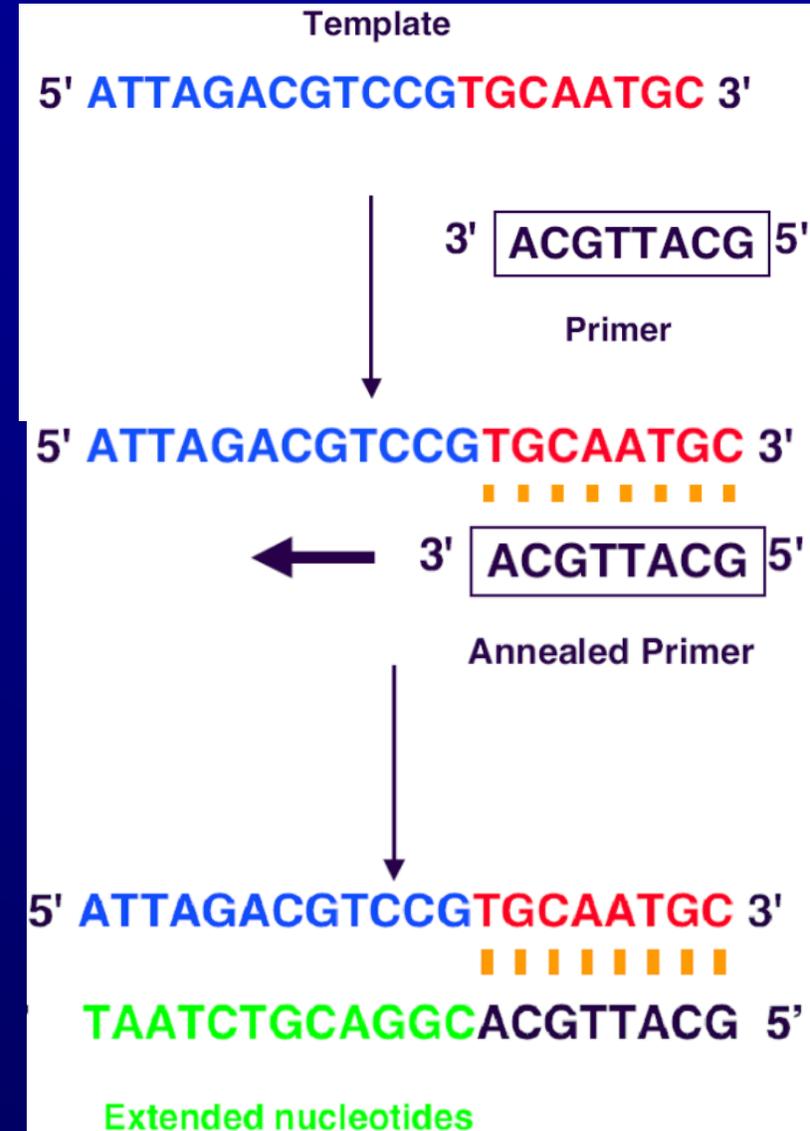
1. DNA模板: 反应中DNA量在50ng~200ng左右。且DNA纯度较高, 以增加反应特异性。
2. dNTP: 反应体系中达100 $\mu$ M~200 $\mu$ M。
3. Mg<sup>2+</sup>: Mg<sup>2+</sup>是Taq酶的辅基浓度在2.0mM左右, 浓度太低Taq酶活力降低; 太高反应特异性降低。
4. 引物: 根据目的基因两侧特定序列设计。引物约20碱基左右; G+C含量在40%—70%之间; 引物内部不能有回该序列; 引物3'端不能互补。
5. Taq酶: 它是从嗜热杆菌中提取的耐热性DNA聚合酶, 在95 $^{\circ}$ C时30分钟还有50%活力。
6. 变性温度: 在93~95 $^{\circ}$ C之间使模板充分变性。
7. 复性温度: 55 $^{\circ}$ C左右, 选择此温度是根据模板和引物配对结合强弱而定, 它是反应特异性的决定因素。
8. 延伸温度: 70~72 $^{\circ}$ C左右, 为Taq酶最适反应温度。

# PCR引物 (Primers)

PCR引物是人工合成的两段寡核苷酸(Oligonucleotides)，一段与目的基因一端的DNA模板链互补，另一段与目的基因另一端的DNA模板链互补。

引物通过与目标序列的互补碱基配对来定向扩增所需的DNA或RNA片段。

理论上，只要知道任何一段序列，就能按其设计互补的寡核苷酸做引物，用PCR将模板DNA在体外大量扩增。



# PCR引物 (Primers)

PCR引物的作用：

- 决定扩增特异性
- 引导DNA复制起始
- 限定PCR扩增区域
- 限制产物片段大小



引物设计是PCR实验成功与否的前提。

# PCR引物设计

Primer premier 5.0设计引物

Primer—BLAST设计qPCR引物

# GFP基因引物设计

GFP序列(~700bp)

ATGGTGAGCAAG GCGGAGGAGC TGTTCAACGG GGTGGTGCCC  
ATCCTGGTCG AGCTGGACGG CGACGTAAAC GGCCACAAGT  
TCAGCGTGTC CGGCGAGGGC GAGGGCGATG CCACCTACGG  
CAAGCTGACC CTGAAGTTCA TCTGCACCAC CGGCAAGCTG  
CCCGTGCCCT GGCCCACCCT CGTGACCACC TTCGGCTACG  
GCCTGCAGTG CTTCGCCCCG TACCCCGACC ACATGAAGCA  
GCACGACTTC TTCAAGTCCG CCATGCCCGA AGGCTACGTC  
CAGGAGCGCA CCATCTTCTT CAAGGACGAC GGCAACTACA  
AGACCCGCGC CGAGGTGAAG TTCGAGGGCG ACACCCTGGT  
GAACCGCATC GAGCTGAAGG GCATCGACTT CAAGGAGGAC  
GGCAACATCC TGGGGCACAA GCTGGAGTAC AACTACAACA  
GCCACAACGT CTATATCATG GCCGACAAGC AGAAGAACGG  
CATCAAGGTG AACTTCAAGA TCCGCCACAA CATCGAGGAC  
GGCAGCGTGC AGCTCGCCGA CCACTACCAG CAGAACACCC  
CCATCGGCGA CGGCCCCGTG CTGCTGCCTAC CAGTCCGCCC  
TGAGCAAAGA CCCCAACGAG AAGCGCGATC ACATGGTCCT  
GCTGGAGTTC GTGACCGCCG CCGGGATCAC TCTCGGCATG  
GACGAGCTGT ACAAGTAA

# 扩增GFP基本序列

5' **ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC** .....TCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAG**TAA** 3'  
3' TACCACTCGTTCCCGCTCCTCG.....AGAGCCGTACCTGCTCGACATGTTTCATT 5'

变性, 引物复性

5' **ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC** .....TCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAG**TAA** 3'  
.....AGAGCCGTACCTGCTCGACATGTTTCATT 5' Primer2

Primer1: 5'ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC.....

3' TACCACTCGTTCCCGCTCCTCG.....CGTACCTGCTCGACATGTTTCATT 5'

Primer1: 5' **ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC**.....

Primer2: 5' **TTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGA**.....

Primer1: 5' **ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC**.....

Primer2: 5' **CTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGA**.....

# 引物设计的原则

1. 引物要跟模板紧密结合（配对）；
2. 引物与引物之间不能有稳定的二聚体或发夹结构存在；
3. 引物不能在别的非目标位点引起高效DNA聚合反应(即错配)。

# 引物设计需要考虑的因素

1. 引物长度 (primer length) , 15-25bp
2. 产物长度 (product length) , 如qPCR为100-250bp
3. 序列T<sub>m</sub>值 (melting temperature), 55-65°C
  - 粗略估算T<sub>m</sub>值可用公式: $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$
  - 上下游引物T<sub>m</sub>值尽量相似(差距避免超过2°C)。
4. 引物GC含量 (GC composition) , 40-60%
5. 引物的碱基随机分布
  - 引物3'端尽量不是A碱基结尾, 因为错配概率A > G, C > T
  - 引物3'端不要有连续的GGG或CCC、GCGC之类。
6. 引物二聚体及发夹结构 (duplex formation and hairpin) ,
7. 错误引发位点 (false priming site) , 决定于引物序列与模板序列的相似性

# 有时还要对引物进行修饰



限制性内切酶的识别序列

启动子序列

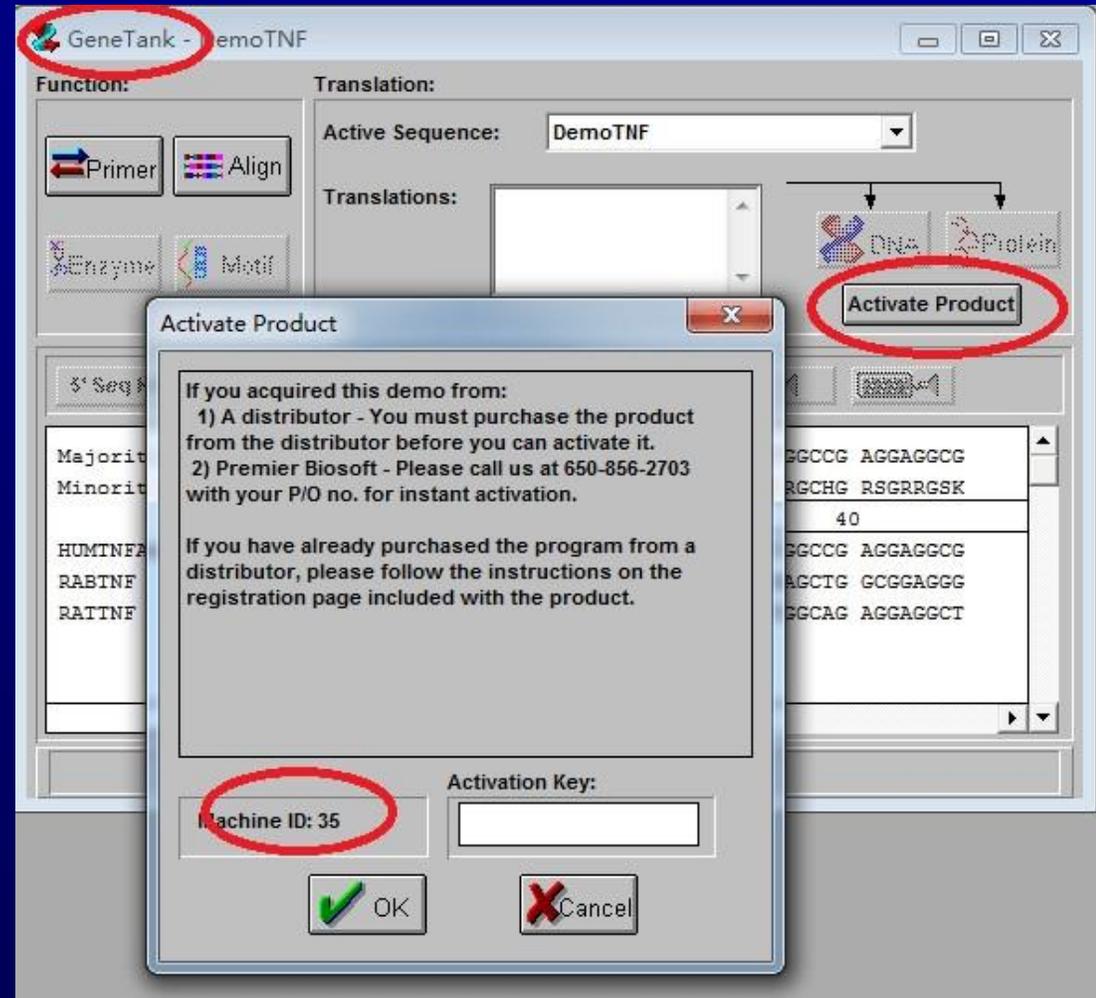
定点突变

探针标记

# Primer Premier 5.0

安装与使用:

- 软件下载解压后直接可使用，无需安装
- 先使用注册机生成激活码（右图）



以绿色荧光蛋白（GFP）定点突变位点的验证引物设计为例，介绍Primer Premier 5设计引物的方法。

## 0、GFP序列的获取：

NCBI 中Nucleotide检索pGFPuv质粒(GeneBank:U62636.1)

```

                                EIGASLKHV
ORIGIN
1  agcgcccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcgttgcc gattcattaa tgcagctggc
61  acgacaggtt tcccgactgg aaagcgggca gtgagcgcaa cgcaattaat gtgagttagc
121 tcaactatta ggcaccccag gctttacact ttatgcttcc ggctcgtatg ttgtgtggaa
181 ttgtgagcgg ataacaatth cacacaggaa acagctatga ccatgattac gccaaacttg
241 catgcctgca ggtcgactct agaggatccc cgggtaccgg tagaaaaaat gagtaaagga
301  gaagaacttt tcaactggagt tgtcccaatt ctgtttgaat tagatgggta ttttaattgg
361  cacaaattht ctgtcagtgg agagggtgaa ggtgatgcaa catacggaaa acttaccttt
421  aaatttattt gcactactgg aaaactacct gttccatggc caacacttgt cactactttc
481  ttttatggtg ttcaatgctt ttcccgttat ccggatcata tgaacggca tgaacttttc
541  aagagtgcca tggccgaagg ttatgtacag gaacgcacta tatctttcaa agatgacggg
601  aactacaaga cgcgtgctga agtcaagttt gaaggtgata cctttgttaa tcttatcgag
661  ttaaaaggta ttgattttaa agaagatgga aacattctcg gacacaaact cgagtacaac
721  tataactcac acaatgtata catcacggca gacaaacaaa agaatggaat caaagctaac
781  ttcaaaattc gccacaacat tgaagatgga tccgttcaac tagcagacca ttatcaacaa
841  aatactccaa ttggcgatgg cctgtcctt ttaccagaca accattacct gtgcacacaa
901  totgcccctt cgaaagatcc caacgaaaag cgtgaccaca tggctcttct tgagtttcta
961  actgctgctg ggattacaca tggcatggat gagctctaca aataatgaat tccaactgag
1021 cgccggtcgc taccattacc aacttgtctg gtgtcaaaaa taataggcct actagtccgc
1081 cgtacgggcc ctttcgtctc ggcggttctg gtgatgacgg tgaaacctc tgacacatgc

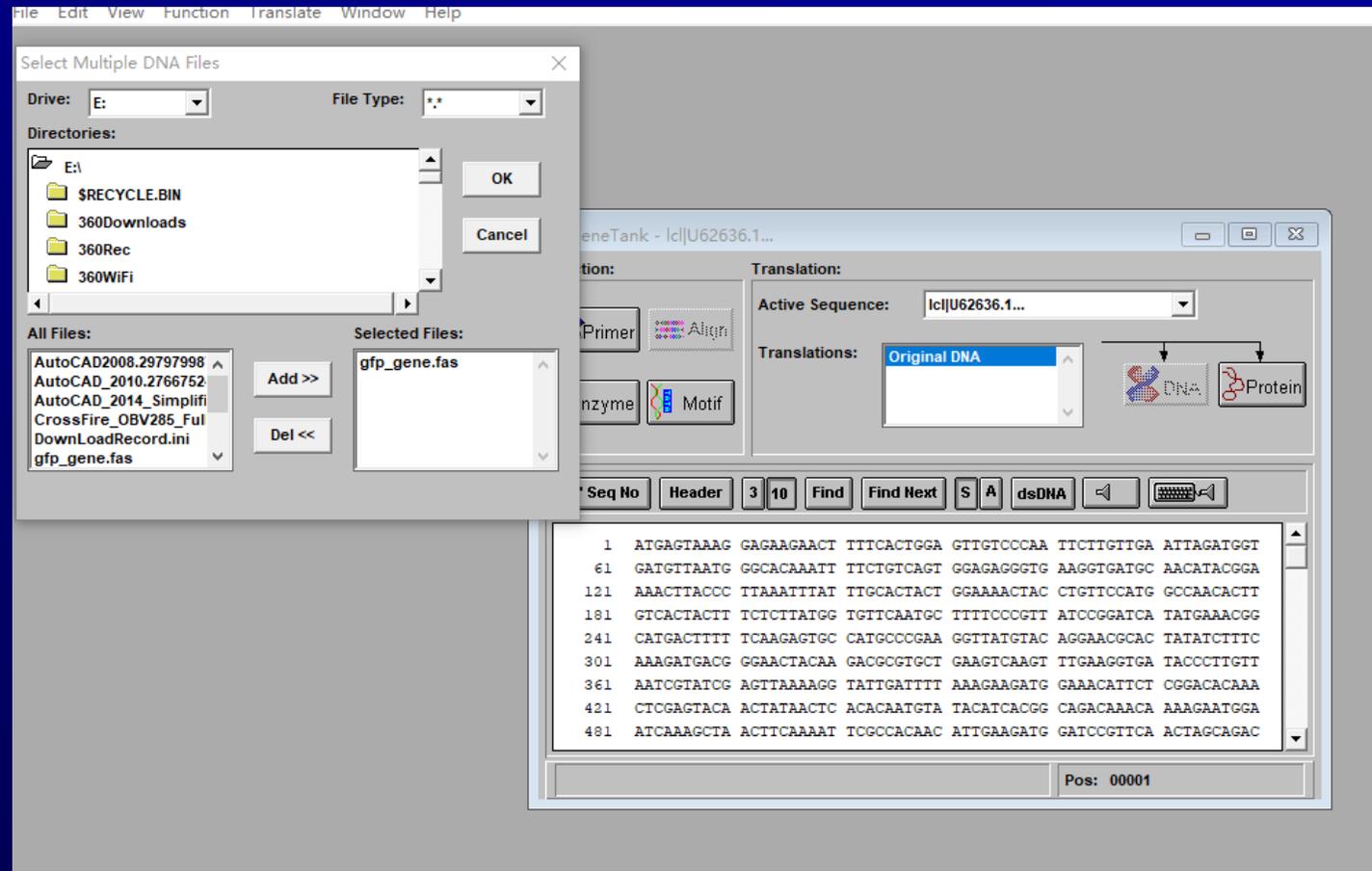
```

GFP基因 (/gene="gfpuv") 高亮部分  
下载FASTA格式

# 1、打开Primer Premier， 导入序列

打开序列文件:

- 菜单File->Open->DNA Sequence
- 先选择路径，再选择序列文件名，加入右框
- 注意目录不要有中文



## 2、序列文件显示如图，点击“Primer”进入引物设计窗口

点击Primer

GeneTank - lc||U62636.1...

Function: **Primer** (circled in red), Align, Enzyme, Motif

Translation: Active Sequence: lc||U62636.1... Translations: Original DNA

5' Seq No Header 3 10 Find Find Next S A dsDNA

```
1 ATGAGTAAAG GAGAAGAAGT TTCTACTGGA GTTGTCCCAA TTCTGTGTTGA ATTAGATGGT
61 GATGTTAATG GGCACAAATT TTCTGTCCAGT GGAGAGGGTG AAGGTGATGC AACATACGGA
121 AAACCTACCC TTAATTTTAT TTGCACTACT GGAAACTAC CTGTTCCATG GCCAACACTT
181 GTCACACTIT TCTCTTATGG TGTTCAATGC TTTTCCCGTT ATCCGGATCA TATGAAACGG
241 CATGACTTTT TCAAGAGTGC CATGCCCGAA GGTTATGTAC AGGAACGCAC TATATCTTTC
301 AAAGATGACG GGAAGTACAA GACGCGTGCT GAAGTCAAGT TTGAAGGTGA TACCCTTGTT
361 AATCGTATCG AGTTAAAAGG TATTGATTTT AAAGAAGATG GAAACATTCT CGGACACAAA
421 CTCGAGTACA ACTATAACTC ACACAATGTA TACATCAGG CAGACAAACA AAAGAATGGA
481 ATCAAAGCTA ACTTCAAAT TCGCCACAAC ATTGAAGATG GATCCGTTCA ACTAGCAGAC
```

Pos: 00001

Primer Premier

Primer: Search Results Edit Primers

Direct Select: (1) 25 (717)

3' TACTCATTTCCTCTTCTTGAAGAAGT 5'  
5' ATGAGTAAAGGAGAAGAAGT TTCTACTGGA GTTGTCCCAA TTCTGTGTTGA ATTAGATGGT 3'

M S K G E E L F T G V V P I L V E L D G D V N G H K F S

	Rating	Seq No	Length	Tm [°C]	GC%	Δ G [kcal/mol]	Activity [μg/OD]	Degeneracy	Ta Opt [°C]
Sense	72	1	25	56.4	32.0	-41.6	29.4	1	--
Anti-sense	89	25	25	56.4	32.0	-41.6	33.3	1	--
Product	25	--	25	62.2	32.0	--	--	--	35.5

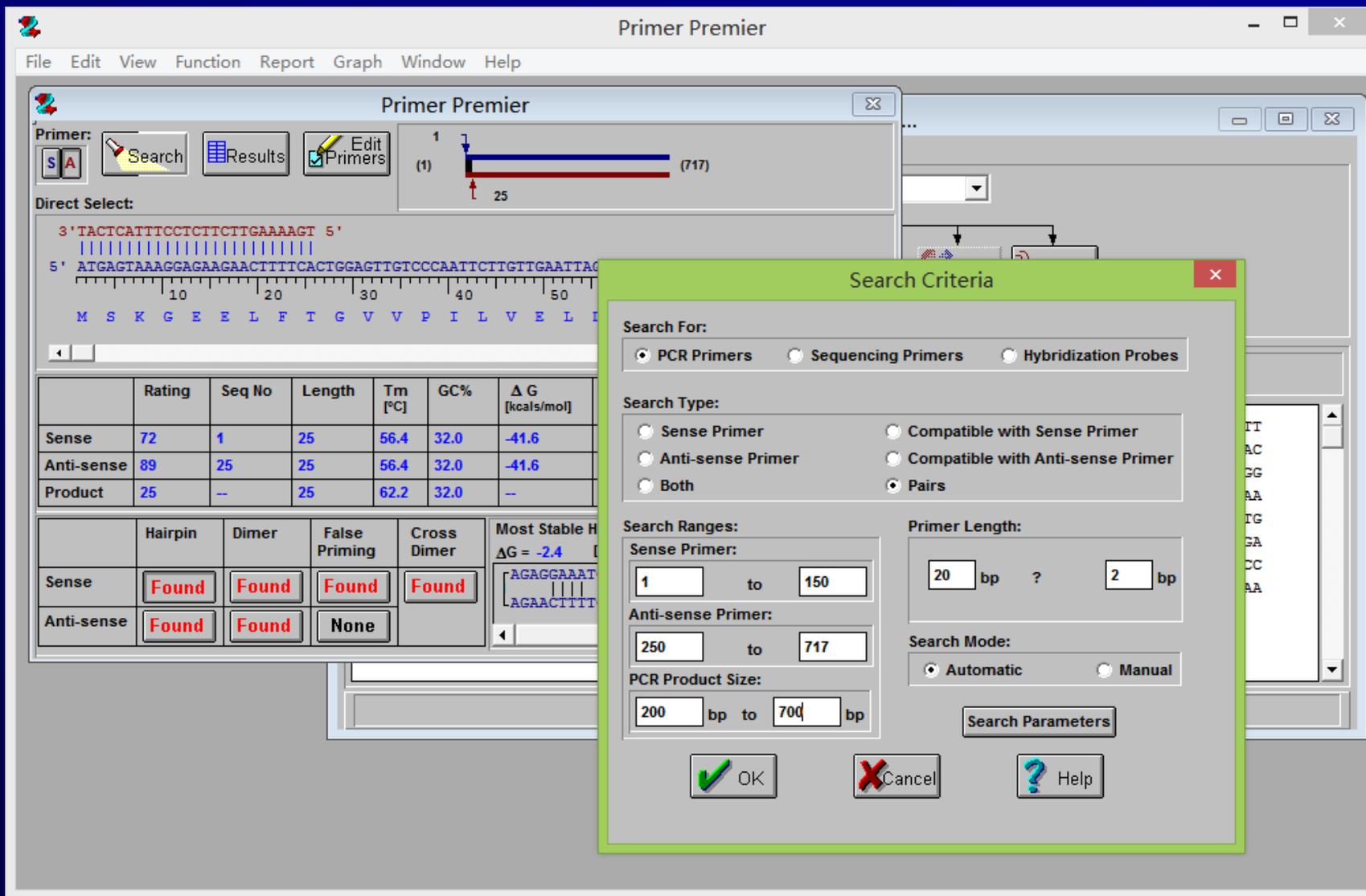
	Hairpin	Dimer	False Priming	Cross Dimer
Sense	Found	Found	Found	Found
Anti-sense	Found	Found	None	

Most Stable Hairpin: ΔG = -2.4 [kcal/mol] (3' Hairpin)

AGAGGAAATGAGTA 5'  
AGAAGTTTCA 3'

引物设计窗口

### 3、点击Search,进入参数设置窗口



- Search for 为“PCR Primers”
- Search Type为“Pairs”
- PCR引物的搜索区域 (Search Ranges)
- 产物长度(Product Size)
- 引物长度(Primer Length)

按照引物设计的原理，设定引物的各种参数，点击“OK”进行引物搜寻

## 4、等待引物搜寻，显示结束后，点击“确定”。

The screenshot shows the Primer Premier software interface with a 'Search Progress' dialog box open. The dialog box displays the following information:

**Search Complete.**

**Primer Search Results:**

	Remaining/Rejected	
	Sense:	Anti-sense:
Total Possible	655	2195
<input checked="" type="checkbox"/> Tm	92	421
<input checked="" type="checkbox"/> GC%	149	285
<input checked="" type="checkbox"/> Degeneracy	0	0
<input checked="" type="checkbox"/> 3' End Stability	41	240
<input checked="" type="checkbox"/> GC Clamp	139	425
<input checked="" type="checkbox"/> Redundancy	201	718
<input checked="" type="checkbox"/> Repeats/Runs	19	34
<input checked="" type="checkbox"/> Dimer/Hairpin	10	56
<input type="checkbox"/> False Priming		
<input checked="" type="checkbox"/> Optimal Primers	4	16

**Stringency:**

- Very High
- High
- Moderate
- Low
- Very Low
- Manual

**Primer Pairs:**

- Pairs Found: 23

The background software interface shows the primer search parameters and results table:

**Direct Select:**

```
3' TACTCAATTCCTCTTCTTGAAAAGT 5'
|||||
5' ATGAGTAAAGGAGAAGAAGTCTTTCCTGAGTGTCCCAATCTTGTGGAATTAGT 3'
```

**Results Table:**

	Rating	Seq No	Length	Tm [°C]	GC%	Δ G [kcal/mol]
Sense	72	1	25	56.4	32.0	-41.6
Anti-sense	89	25	25	56.4	32.0	-41.6
Product	25	--	25	62.2	32.0	--

**Most Stable Hairpin:**

	Hairpin	Dimer	False Priming	Cross Dimer
Sense	Found	Found	Found	Found
Anti-sense	Found	Found	None	

## 5、按照搜寻结果显示，逐条分析，在主窗口中检查该引物对的二级结构情况，依次筛选

The image shows the Primer Premier software interface. The main window displays a DNA sequence with a primer pair (93 and 471) highlighted. Below the sequence is a table of primer properties and a section for secondary structure analysis.

	Rating	Seq No	Length	Tm [°C]	GC%	$\Delta G$ [kcal/mol]	Activity [ $\mu\text{g}/\text{OD}$ ]	Degeneracy	Ta Opt [°C]
Sense	75	93	18	51.9	55.6	-33.8	30.4	1	--
Anti-sense	100	471	18	51.8	44.4	-33.7	34.9	1	--
Product	87	--	379	84.7	40.4	--	--	--	49.8

Secondary Structure Analysis:

	Hairpin	Dimer	False Priming	Cross Dimer
Sense	None	None	Found	None
Anti-sense	None	None	None	

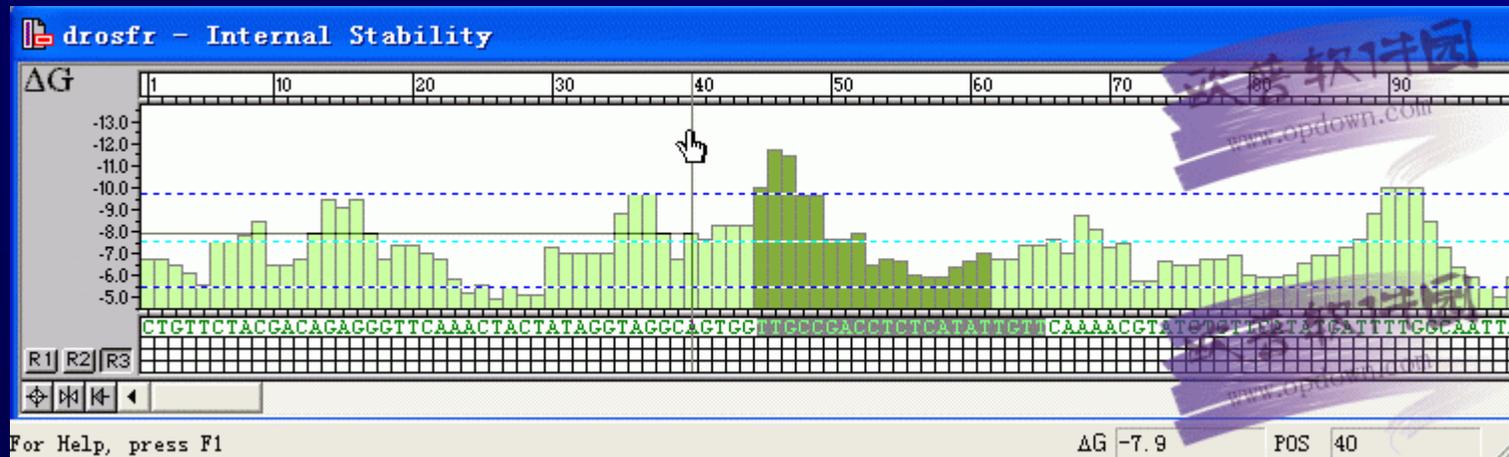
Most Stable Site:  
 $\Delta G = -16.5$  [kcal/mol]; Product = 136  
5' AGAGGGTGAAGGTGATGC 3'  
3' (336) GTTCAAACCTCCACTATG (353) 5'

The Search Results window shows 16 pairs found. The top 5 results are:

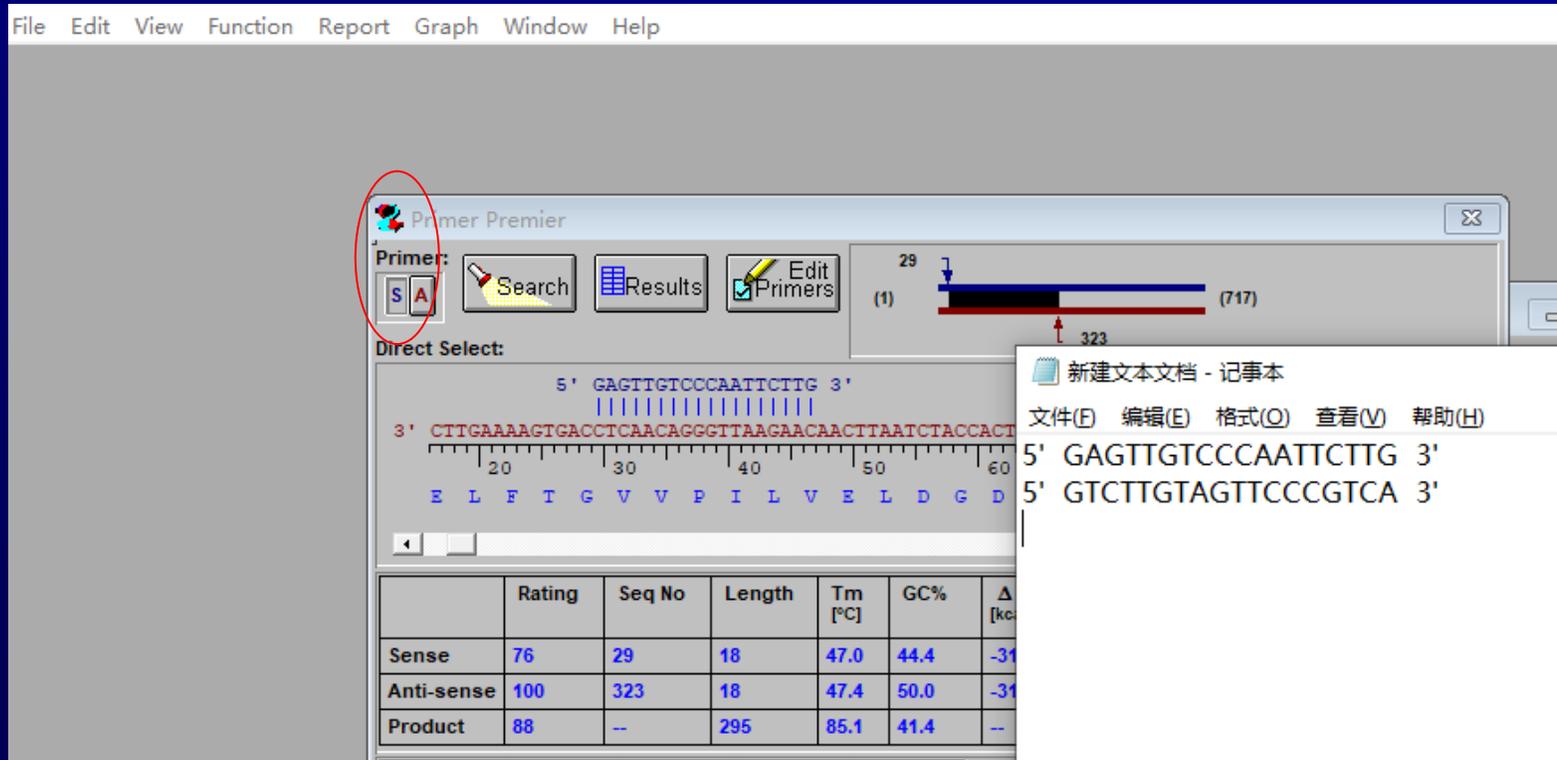
#	Rating	Tm [°C]	Product Size	Ta Opt [°C]	Mark
1	87	51.9 51.8	379	49.8	<input type="checkbox"/>
2	81	47.0 51.8	443	48.3	<input type="checkbox"/>
3	80	46.7 49.2	658	49.2	<input type="checkbox"/>
4	80	48.7 51.8	439	48.8	<input type="checkbox"/>
5	79	46.7 51.8	441	48.2	<input type="checkbox"/>

# 引物 $\Delta G$ 值

- $\Delta G$ 值反映了引物与模板结合的强弱程度，也是一个重要的引物评价指标。
  - 一般情况下，在Oligo 6.0软件的 $\Delta G$ 值窗口中，引物的 $\Delta G$ 值最好呈正弦曲线形状，即5'端和中间部分 $\Delta G$ 值较高，而3'端 $\Delta G$ 值相对较低，且不要超过9（ $\Delta G$ 值为负值，这里取绝对值），则有利于防止错误引发反应。
  - 其原理是引物与模板应具有较高的结合能量，5'端与中间段的 $\Delta G$ 值应较高，有利于引物与模板序列的结合，而3'端 $\Delta G$ 值影响DNA聚合酶对模板DNA的解链，过高则不利于这一步骤。



## 6、引物保存



选择合适引物，先点击S按钮，选择菜单Edit→copy→sense primer复制正向引物序列，后粘贴到指定文件；再点击Edit→copy→Anti sense primer复制反向引物序列，后粘贴到指定文件

# Primer Premier5的引物评价窗口

Primer Premier

File Edit View Function Report Graph Window Help

Primer: Search Results **Edit Primers**

Direct Select:

3' GAGGACCGTCTCGAGCCGACCAGGG 5'  
5' CTCCTGGCAGGACTCGGCTGGTCCCAAAGAAGACAAGAGATCCTTGATCTGTGGATCTACCACACACAAGGCTACTTCCCTG

	Rating	Seq No	Length	Tm [°C]	GC%	Activity [μg/OD]	Degeneracy	Ta Opt [°C]
Sense	82	1	25	76.5	72.0	35.3	1	--
Anti-sense	83	25	25	76.5	72.0	32.4	1	--
Product	10	--	25	78.6	72.0	--	--	53.0

	Hairpin	Dimer	False Priming	Cross Dimer
Sense	Found	Found	None	Found
Anti-sense	Found	Found	None	

Most Stable Hairpin:  
 $\Delta G = -2.9$  [kcal/mol] (3' Hairpin)

```
GCTCAGGACGGTCTC 5'  
|  
|  
|  
|  
CTGGTCCC 3'
```

- 菜单 file→new→DNA sequence, 导入基因序列,
- 再点击 <Primer →S>, 选择正向引物
- 点击Edit Primers

- 输入设计好的正向引物，点击 Analyze→primer→ OK验证；
- 同理可验证反向引物

Primer: S A Search Results Edit Primers

Direct Select:

5' ACNGCNTGYGGNGGNTGYTGYGCNTGYGGNTGYGCNGGNGCNGCNGGNGCNCACNACNA 3'

3' TACAGGCTTCGATGGGAGAGGAGGTTTCGTTTGGTAACTTACCCTTTTGTATTATGAGGCGGGTGTGATGGTGGGGAACGGG 5'

M S E A T L S S K Q T I E W E N K Y S A H N Y H P L P V

	Rating	Seq No	Length	Tm [°C]	GC%	ΔG [kcal/mol]	Activity [μg/OD]	Degeneracy	Ta Opt [°C]
Sense	100	1	61	0.0	67.2	-113.8	34.5	3.43597e+010	--
Anti-sense	14	25	25	68.5	56.0	-48.9	31.3	1	--
Product	0	--	25	72.1	56.0	--	--	--	25.4

	Hairpin	Dimer	False Priming	Cross Dimer
Sense	None	None	None	None
Anti-sense	None	Found	Found	

No Hairpins Found

Edit Primer

T A C G G C C A C G C A G A A G A T T T

5' ACNGCNTGYGGNGGNTGYTGYGCNTGYGGNTGYGCNGGNGCNGCNGGNGCNCACNACNA 3'

3' TACAGGCTTCGATGGGAGAGGAGGTTTCGTTTGGTAACTTACCCTTTTGTATTATGAGGCGGGTGTGATGGTGGGGAACGGG 5'

M S E A T L S S K Q T I E W E N K Y S A H N Y H P L P

AluI

Rating	Seq No	Length	Tm [°C]	GC%	ΔG [kcal/mol]	Activity [μg/OD]	Degeneracy
100	1	61	0.0	67.2	-113.8	34.5	3.43597e+010

Hairpin	Dimer	False Priming
None	None	None

No Hairpins Found

Analyze Enzyme Prime OK Cancel Help

不出现或出现较少“found”为好的引物

# 引物验证

# RT-PCR技术

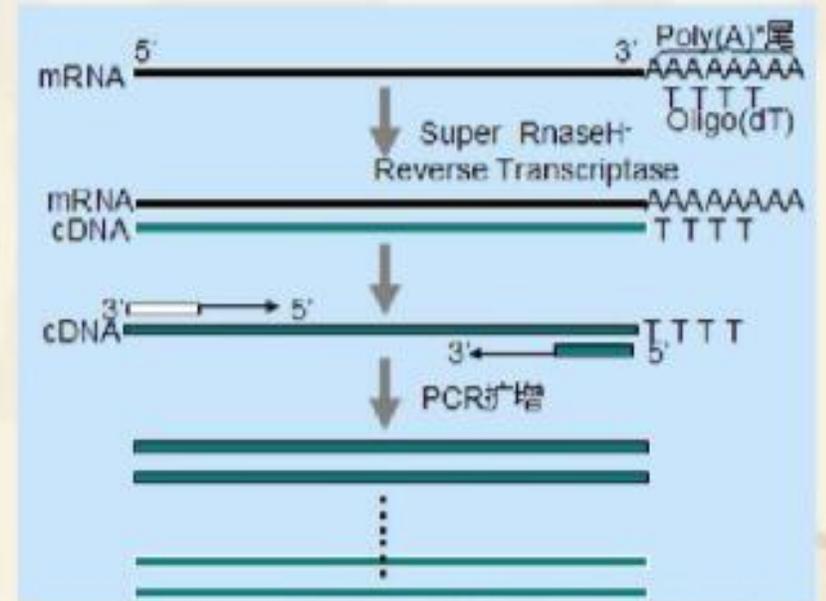
RT-PCR: Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

•反转录PCR: 将RNA的反转录 (RT) 和cDNA的聚合酶链式扩增 (PCR) 相结合, 首先经反转录酶的作用, 从RNA合成cDNA, 再以cDNA为模板, 在DNA聚合酶作用下扩增合成目的片段。

## RT-PCR

反转录PCR

mRNA---cDNA-----PCR



# 实时荧光定量PCR技术

- 实时荧光定量PCR（real time fluorescence quantitative PCR）是一种将PCR扩增和扩增产物检测结合在一起的分子生物学技术。
- 在PCR反应体系中加入能够指示DNA片段扩增的荧光染料或荧光标记的特异性探针，通过对PCR过程中产生的荧光信号进行检测记录，实时监测整个PCR进程，再结合相应的计算方法对所获得的荧光信号数据进行分析，计算待测样品中特定DNA片段的初始浓度。
- 例如，有报道通过定量PCR(qPCR)估计新冠病人的BALF样品中的病毒载量为 $3.95 \times 10^8$ 拷贝/mL。



# 实时荧光定量PCR技术

RT-qPCR

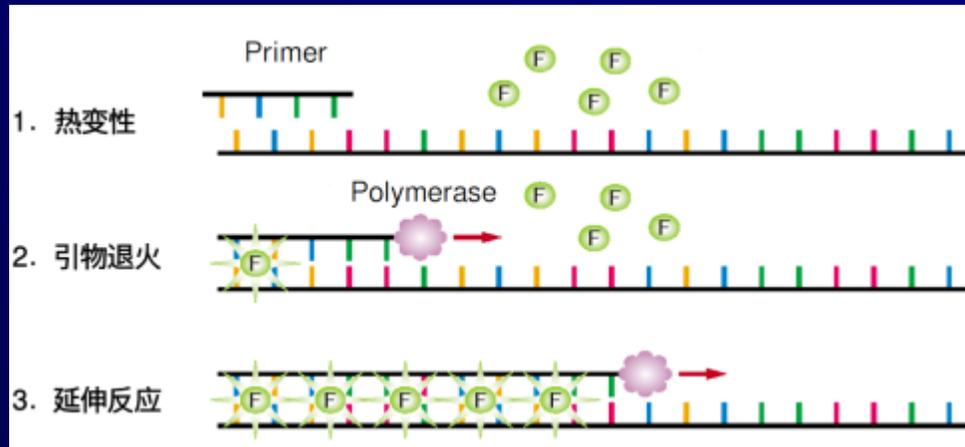
定义： 一种将PCR扩增和扩增产物的检测有机结合在一起的分子生物学技术，对基因拷贝数做到实时定量

分类：

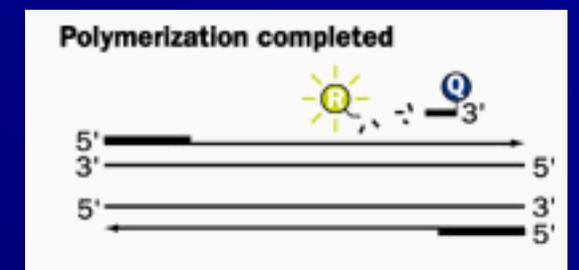
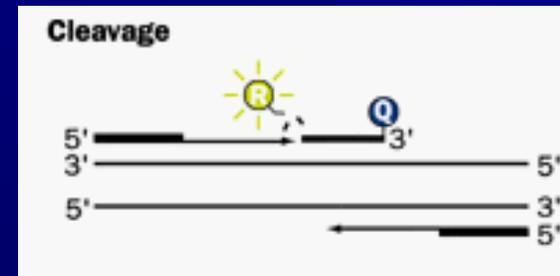
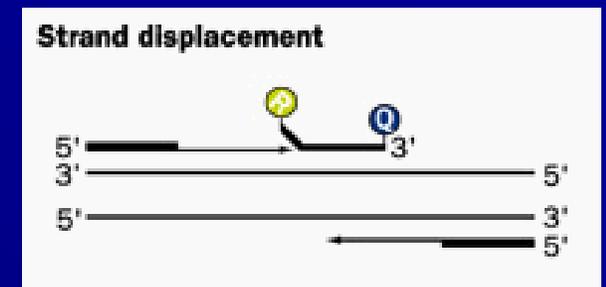
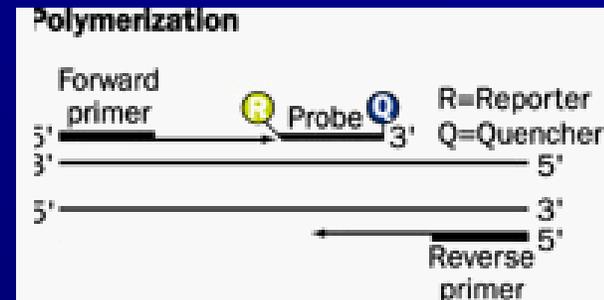
DNA染料法  
(SYBR Green I)

DNA探针法  
(TaqMan荧光标记的特异性探针)

# How Real-Time PCR Works?



SYBR Green I Kit



TaqMan Gold RT-PCR kit (PE Applied Biosystems)

# qPCR扩增曲线

## 荧光基线

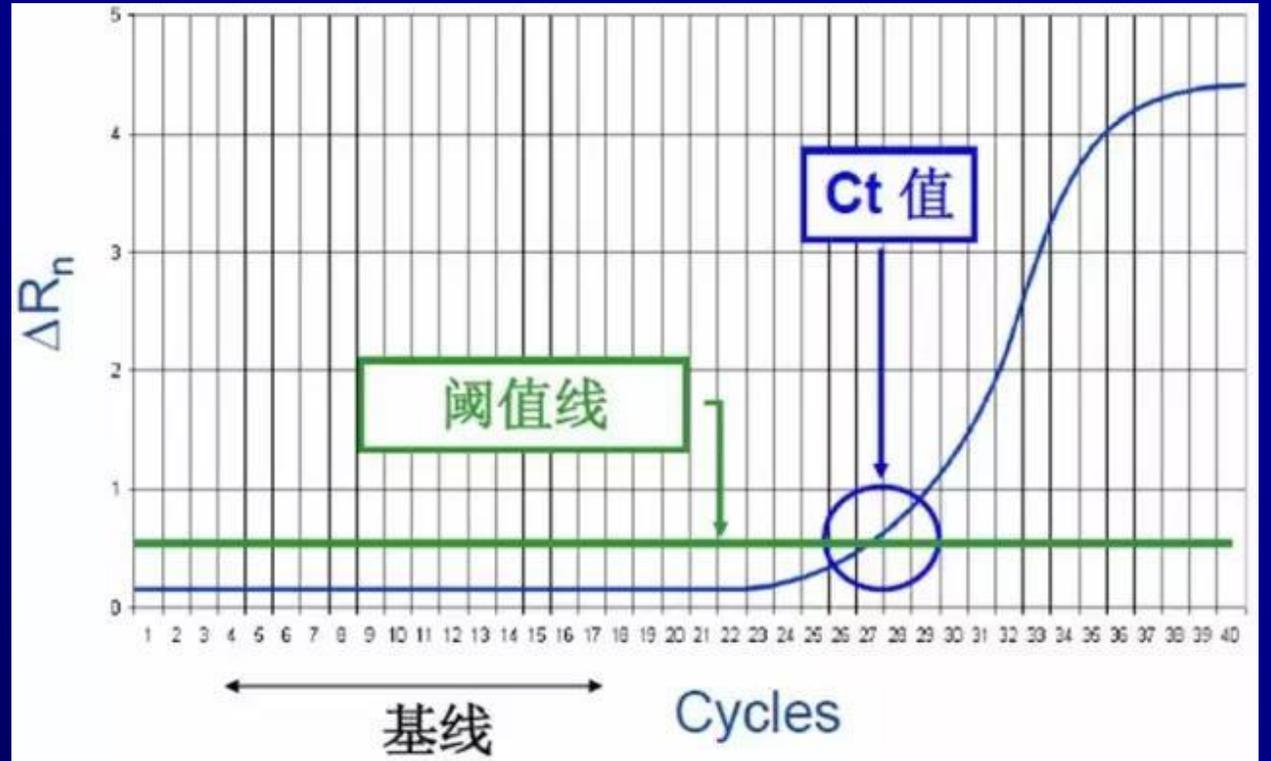
PCR循环开始时，虽然荧光信号累积，但仍在仪器可检测的灵敏度下

## 荧光阈值

荧光扩增曲线上人为设定的一个值，缺省设置为3~15个循环的荧光信号标准偏差的10倍

## 阈值循环数(Ct)

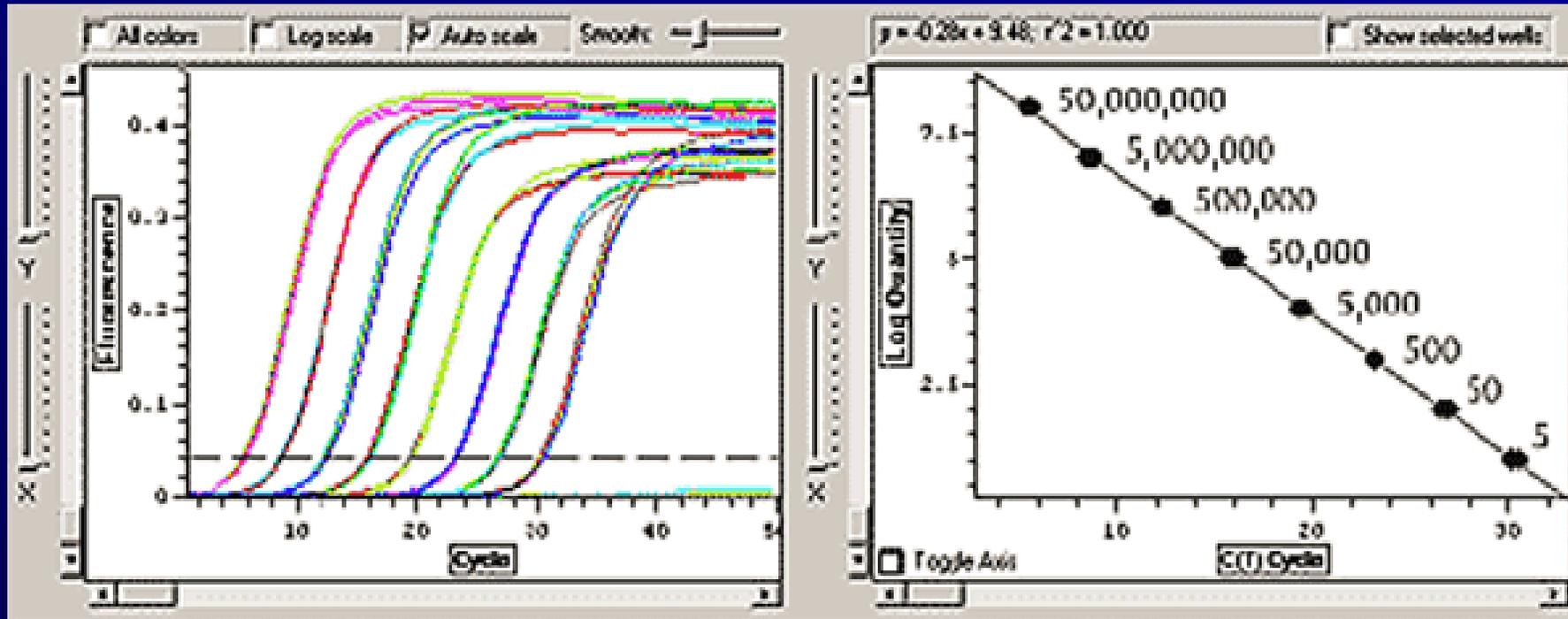
PCR循环过程中，每个反应管内的荧光信号达到设定阈值时所经历的循环次数



新冠病毒核酸检测结果判断：

- 阴性:无Ct值或Ct为40。
- 阳性: Ct值<37, 可报告为阳性。
- 可疑: Ct值在37-40之间, 建议重复实验。

# Real-Time PCR Data



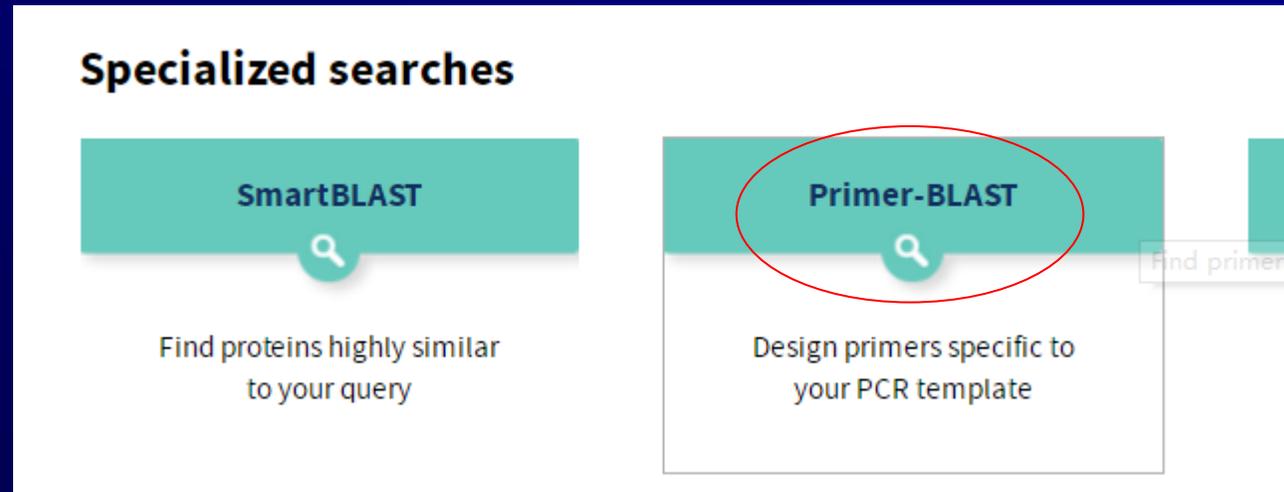
- 在PCR反应体系中加入荧光报告基团，随着PCR反应的进行，扩增产物不断积累，导致荧光信号不断积累；同时，每经过一个热循环，定量PCR仪收集一次荧光信号，从而利用荧光信号的变化实时监测整个PCR进程，最终得到荧光强度随PCR循环数的变化曲线
- 由于在PCR扩增的指数时期，模板的Ct值和该模板的起始拷贝数存在线性关系，所以成为定量的依据

# 荧光定量PCR引物设计的要求：

- 引物的产物大小不要太大，80~150 bp 最为合适；
- 引物的退火温度要高，一般最好要在 60 度以上；
- GC含量40-60%；
- 3'端最后 5 个碱基内不能有多于 2 个的 G 或 C，避免重复碱基，尤其是 G；
- 正向引物与探针离得越近越好，但不能重叠。

# Primer-BLAST设计qPCR引物

Primer-BLAST为一款引物设计工具，将Primer与BLAST合二为一，既能同时完成引物设计与序列同源性比对，从而快速设计合适的PCR引物。



进入NCBI BLAST页面， 点击Primer—BLAST

提交的界面主要分：①PCR template, ②Primer Parameters, ③Exon/intron selection, ④specificity check

### Primer-BLAST

A tool for finding specific primers

Finding primers specific to your PCR template (using Primer3 and BLAST).

Primer3 for target on one template | **Primer3 common for a group of sequences**

[Reset page](#) [Save search parameters](#) [Retrieve recent results](#) [Publication](#) [Tips for finding specific primers](#)

#### PCR Template

Enter accession, gi, or FASTA sequence (A refseq record is preferred) [Clear](#)

```
GGTTAACCTAGGCAGCTCCTTGCGGTACCGACTTCAGGCACCCOCAGCTTCCATGGCTTGACGGGCGGTGTACAAGGCCGGGA  
ACGTATTACCCGGATCATGGCTGATATCCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGGAGTCGAGTTGCAGACTCCGATCCGAAGTGTGA  
CCGGCTTTATAGATTGCTCCCCCTCGCGAGGTGGCTGCTCTGTACCGGCCATTGTAGCACGTGTAGCCCAAGGCGTAAGGGC  
CGTGATGATTTGACGTCATCCACCTTCTCACAGTTTGCAGTGGCAGTCTTGTAGAGTTCCCGACTTGACTCGCTGGCAACTAA  
CAACAGGGGTTGCGCTCGTTATAGGACTTAACCTGACACCTCACGGCACGAGCTGACGACAACCATGCAGCACCTTGTAAATTGTCT
```

Or, upload FASTA file  4-5\_TSS2020...571-1432.seq

Range [Clear](#)

Forward primer	From	To
Reverse primer	From	To

①

#### Primer Parameters

Use my own forward primer (5'→3' on plus strand)  [Clear](#)

Use my own reverse primer (5'→3' on minus strand)  [Clear](#)

PCR product size: Min  Max  **PCR产物大小**

# of primers to return:  **返回10对引物**

Primer melting temperatures (Tm): Min  Opt  Max  Max Tm difference  **设定Tm值**

②

#### Exon/intron selection

A refseq mRNA sequence as PCR template input is required for options in the section

Exon junction span:  **设定跨外显子/内含子区**

Exon junction match: Min 5' match  Min 3' match  Max 3' match

Intron inclusion:  Primer pair must be separated by at least one intron on the corresponding genomic DNA

Intron length range: Min  Max

No preference

Primer must span an exon-exon junction

Primer may not span an exon-exon junction

③

# PCR引物的特异性验证

## Primer Pair Specificity Checking Parameters

④

### Specificity check

Enable search for primer pairs specific to the intended PCR template

### Search mode

Automatic

Primer-blast tries to find target-specific primers by placing candidate primers on unique template regions that are not similar to other targets. However, in some cases, primer-blast cannot determine if a database sequence is an intended target or not, thus the user guidance might be helpful (For example, when your template is a polymorphic form or a partial region of an entry in the search database, or when the database such as the nr contains redundant entries of your template).

The "Automatic" option will ask for user guidance only when the program does not find sufficient unique template regions while the "User guided" option will always ask for user guidance if your template shows high similarity to any other database sequences.

### Database

Refseq mRNA

### Exclusion

Exclude predicted Refseq transcripts (accession with XM, XR prefix)  Exclude uncultured/environmental sample sequences

### Organism

Homo sapiens

Enter an organism name (or organism group name such as enterobacteriaceae, rodents), taxonomy id or select from the suggestion list as you type.

[Add more organisms](#)

### Entrez query (optional)

### Primer specificity stringency

Primer must have at least 2 total mismatches to unintended targets, including

at least 2 mismatches within the last 5 bps at the 3' end.

Ignore targets that have 6 or more mismatches to the primer.

### Max target size

4000

### Allow splice variants

Allow primer to amplify mRNA splice variants (requires refseq mRNA sequence as PCR template input)

选择需要比对的数据库及物种

允许扩增mRNA选择性剪切异构体

Get Primers

Show results in a new window  Use new graphic view

Advanced parameters

# 输出结果

结果会有多对引物，对每一对进行分析后，根据实验需求选择合适的引物用于合成，进行PCR。

▼ Detailed primer reports

Primer pair 1									
	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TGTGTCAGTGGATGGACTGC	Plus	20	2258	2277	59.96	55.00	5.00	2.00
Reverse primer	GCCAACAGAGTTGTTGCAGG	Minus	20	2763	2744	59.97	55.00	7.00	0.00
Product length	506								

**Products on potentially unintended templates**

>[AF394607.1](#) Bean pod mottle virus strain K-Hancock1 segment RNA-2, complete sequence

product length = 506

Forward primer 1 TGTGTCAGTGGATGGACTGC 20  
Template 2258 ..... 2277

Reverse primer 1 GCCAACAGAGTTGTTGCAGG 20  
Template 2763 ..... 2744

>[AF394609.1](#) Bean pod mottle virus strain K-Hopkins1 segment RNA-2, complete sequence

product length = 506

Forward primer 1 TGTGTCAGTGGATGGACTGC 20  
Template 2258 ..... 2277

Reverse primer 1 GCCAACAGAGTTGTTGCAGG 20  
Template 2763 ..... 2744

>[GQ996950.1](#) Bean pod mottle virus isolate Iowa-Desmodium illinoense 1 segment RNA2, complete sequence

product length = 506

# Primer-BLAST验证引物特异性

- 以SARS-CoV-2核酸检测的qPCR引物为例：
  - F: 5'-CTAGGTTTCAAACCTTACTTGC-3'
  - R: 5'-CCTTTTCTACAGTGAAGGATT-3'

**Primer Parameters**

Use my own forward primer (5'->3' on plus strand)  ?

Use my own reverse primer (5'->3' on minus strand)  ?

PCR product size Min  Max

# of primers to return

Primer melting temperatures (T<sub>m</sub>) Min  Opt  Max  Max T<sub>m</sub> difference  ?

Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow

**Primer Pair Specificity Checking Parameters**

Specificity check  Enable search for primer pairs specific to the intended PCR template ?

Search mode  ?

Database  ?

Exclusion  Exclude predicted Refseq transcripts (accession with XM, XR prefix)  Exclude uncultured/environmental sample sequences ?

Organism   ?

Enter an organism name (or organism group name such as enterobacteriaceae, rodents), taxonomy id or select from the suggestion list as you type. ?

Entrez query (optional)  ?

Primer specificity stringency Primer must have at least  total mismatches to unintended targets, including at least  mismatches within the last  bps at the 3' end. ?  
Ignore targets that have  or more mismatches to the primer. ?

Max target amplicon size  ?

Allow splice variants  Allow primer to amplify mRNA splice variants (requires refseq mRNA sequence as PCR template input) ?

# Primer-BLAST引物特异性验证结果

Primer pair 1						
	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CTAGGTTTCAAACCTTTACTTGC	22	53.65	36.36	7.00	2.00
Reverse primer	CCTTTTTCTACAGTGAAGGATT	22	54.01	36.36	5.00	1.00
<b>Products on target templates</b>						
>NC_045512.2 Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate Wuhan-Hu-1, complete genome						
product length = 226						
Forward primer	1	CTAGGTTTCAAACCTTTACTTGC	22			
Template	22269	.....	22290			
Reverse primer	1	CCTTTTTCTACAGTGAAGGATT	22			
Template	22494	.....	22473			

Primer-BLAST比对发现这个引物只和目标基因形成配对（pair），说明引物特异性好；如有和目标序列之外的序列配对(False Priming)，则可能扩出其他序列的产物，那么这个引物的特异性就很差，从而不能用。

# 作业

- 请查找新冠病毒(SARS-CoV-2)的核壳蛋白(nucleocapsid, N)序列的相关资料，并从GenBank中获取它的DNA序列，并设计该序列的核酸检测qPCR引物。
- 某公司使用以下引物检测SARS-CoV-2病毒，请说明这对引物的可能问题？
  - 正向引物 (F) : GACCCCAAATCAGCGAAAT
  - 反向引物 (R) : TCTGGTACTGCCAGTTGAATCTG

