خصوصیات پرایمرها

دکتر رضا میرنژاد – باکتریولوژیست، استادیار دانشگاه

پرایمر یک قطعه اسید نوکلئیک است که دارای توالی بسیار اختصاصی مکمل یک ژن می‌باشد. بطور کلی هرگاه که لازم باشد تا ژن خاصی در بین مجموعه‌ای از ژن‌ها پیگیری و شناسایی شود از پرایمرها (شناساگرها) استفاده می‌شود. برای اینکه شناساگر بطور مناسب مورد استفاده قرار گیرد باید دارای خصوصیاتی باشد که در زیر به آنها اشاره می‌شود:

الف) تک رشته‌ای بودن: از آنجایی که پرایمرها باید با قسمت خاصی از ژن مکمل شوند باید تک رشته‌ای باشند ولی تفاوتی ندارد که شناساگر RNA یا DNA باشند.

ب) اختصاصی بودن: یک پرایمر باید با توجه به ژن‌های مورد بررسی کاملاً اختصاصی باشد. یعنی فقط با ژن‌های مورد نظر هیبرید شود و این مهم‌ترین خصوصیت یک شناساگر می‌باشد.

ج) نشاندار بودن: به منظور پیگیری، یک پرایمر حتماً باید نشان‌دار باشد. نشاندار کردن شناساگر بوسیله مواد رادیواکتیو و یا بوسیله مواد فلورسانس صورت می‌گیرد. این خصوصیت شناساگر نیز مهم است زیر بدون نشاندار بودن نمی‌توان مکان شناساگر را پیدا کرد.

طراحی پرایمرها

برای تهیه و طراحی یک شناساگر برای یک ژن خاص از سه روش زیر استفاده می‌شود:

1- تعیین توالی ژن مورد نظر: برای این کار ژن مورد نظر را جدا کرده و توالی آن را تعیین می‌کنند، سپس قسمت کوتاهی از این توالی را انتخاب نموده و مکمل این قسمت را به طور مصنوعی می‌سازند و پس از نشاندار کردن، از آن به عنوان شناساگر استفاده می‌کنند. این روش در صورت دسترسی توالی ژن مورد نظر راحت‌ترین روش طراحی شناساگر می‌باشد.

2- استفاده از mRNA: برای این کار mRNA ساخته شده از روی ژن مورد نظر را جدا می‌کنند. چون این mRNA دقیقاً از روی ژن مورد نظر نسخه برداری شده است، می‌توان قسمتی از این mRNA را نشاندار کرده و به عنوان شناساگر استفاده کرد.

همچنین می‌توان از روی mRNA، DNA ساخت؛ برای این منظور از آنزیم ترانس- کریپتاز معکوس[1] که از رتروویروس‌ها جدا می‌شود، استفاده می‌کنند. چون آنزیم RT نیز مانند DNA پلی‌مرازها به یک قطعه اولیه برای شروع سنتز نیاز دارد باید یک قطعه پرایمر را در اختیار آن قرار داد. چونmRNA پروکاریوت‌ها معمولاً یک دم پلی A در قسمت ′۳ دارد قطعه پرایمر معمولاً پلی T است. در مرحله بعد بوسیله RNaseH رشته RNA هیدرولیز شده و با کمک آنزیم DNA پلی‌مراز I رشته مکمل DNA ساخته می شود. بدین ترتیب یک DNA دو رشته‌ای حاصل می‌شود چون این DNA بطور مکمل RNA ساخته شده است به آن cDNA (DNA مکمل[2]) گفته می‌شود. سپس دو رشته cDNA از هم جدا شده و پس از نشاندار شدن به عنوان شناساگر مورد استفاده قرار می‌گیرند. باید توجه داشت که در سلول‌های یوکاریوتی به دلیل حذف اینترون‌ها از cDNA، mRNA ساخته شده مکمل قسمت‌های اینترون نخواهد بود.

3- استفاده از پروتئین: توالی اسید آمینه یک پروتئین تابع ژن کد کننده آن است، به همین دلیل از روی توالی یک پروتئین خاص می‌توان به توالی ژن کد کننده آن پی برد. ولی به دلیل وجود چندین کد برای یک اسید آمینه، این تعیین توالی تقریبی می‌باشد. به هر حال برای این منظور پروتئین مورد نظر را خالص کرده و توالی اسید آمینه‌های قطعه‌ای از آن تعیین می‌شود، سپس از روی این توالی‌ها و با استفاده از جدول، کد ژنتیکی قطعه مکمل رشته DNA ساخته می‌شود. برای جلوگیری از بروز اشتباه به دلیل وجود کدهای مختلف برای اسیدهای آمینه، کلیه احتمالات ممکن را در نظر می‌گیرند و چندین نوع مختلف از شناساگرها را سنتز می‌کنند، سپس این قطعات را نشاندار کرده و به عنوان پرایمر مورد استفاده قرار می‌دهند.

در کل باید برای طراحی پرایمری به نکات زیر توجه کرد:

1- طول این الیگونوکلئوتیدهای سنتزی بین 15 تا 30 نوکلئوتید است که بهتر است که بین 24 - 18 نوکلئوتید باشد.

2- برای ساختن پرایمر از طرف ′۵ به ′۳ پرایمر به صورت نوکلئوتیدهای 3 تایی پشت سر هم در نظر گرفته می‌شود. در انتهای جهت ′۳، سعی شود که نوکلئوتید انتهایی G یا C باشد.

3- توالی پرایمر F (Forward) از توالی نوکلئوتیدی ′۵ شروع شود. در حالی که توالی پرایمر R (Reverse) معمولاً از توالی نوکلئوتیدی ′۳ در نظر گرفته می‌شود.

4- هر قدر طول پرایمر بیشتر باشد، دمای اتصال پرایمر (Annealing) نیز افزایش می‌یابد.

5- هر قدر طول پرایمر کوتاه‌تر باشد، تکثیر غیر اختصاصی بیشتر خواهد بود.

---

[1] -Reverse Transcriptase (RT)
[2] - Complementary DNA (cDNA)

6- پرایمرها باید طوری طراحی شوند که در قسمت ′۳ بین پرایمرها، شباهتی وجود نداشته باشد زیرا مانع اتصال با الگو می‌گردد.

7- بین دو پرایمر نباید تشابهاتی وجود داشته باشد زیرا منجر به تشکیل دایمر پرایمر و مانع تکثیر DNA خواهد شد.

8- درصد بازهای C+G باید بین 45 تا 60 درصد باشد. پرایمرPoly G یا Poly C موجب مکمل شدن غیر اختصاصی می شود. از حالت Poly T،Poly A نیز باید اجتناب شود زیرا باعث تکثیر می‌گردد.

9- سعی شود که در انتهای ′۳ پرایمر، نوکلئوتید، یا G یا GC یا CG انتخاب شود که مانع آزاد ماندن انتهای ′۳ شده و به اتصال صحیح کمک خواهد کرد و کارآیی PCR را افزایش می‌دهد.

10- در انتهای ′۳ بیشتر از دو باز C یا G قرار نگیرد تا فرآورده غیر اختصاصی PCR حاصل نشود.

11- دمای ذوب آنها در حدود 72 - 55 درجه و گاهی تا 80 درجه سانتیگراد باشد.

12- دمای ذوب دو پرایمر یکسان بوده و از فرمول زیر محاسبه می‌شود؛ (لازم بذکر است این فرمول برای الیگونوکلئوتیدهای 30 - 18 بازی مناسب می‌باشد):

$$T_m=2\ (A + T) + 4\ (C + G)$$

13- توالی پرایمر نباید موجب ایجاد ساختمان دومی (ثانویه) در آن گردد.

نرم‌افزارهای طراحی پرایمر:

امروزه برنامه‌های متنوعی جهت طراحی پرایمر و پروب مورد استفاده قرار می‌گیرند که مهم‌ترین آنها موارد زیر می‌باشند:

- **Oligo**
- **GCG**
- **Primer3:** http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi
- **BioTools**
- **سایر :** GeneFisher, Web Primer, NBI oligo program, etc.

در شکل زیر نمای کلی از نرم‌افزار آنلاین Primer3 جهت طراحی پرایمر و پروپ نشان داده شده است. لازم بذکر است که بیشتر نرم‌افراهای طراحی پرایمر از چارچوب این نرم‌افزار استفاده می‌کنند.

Primer3 Input (primer3_v

File Edit View Favorites Tools Help

Address http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi

Pick Primers | Reset Form

Sequence Id: A string to identify your output.

Targets: 156,464 — E.g. 50,2 requires primers to surround the 2 bases at positions 50 and 51. Or mark the source sequence with [and]: e.g. ...ATCT[CCCC]TCAT.. means that primers must flank the central CCCC.

Excluded Regions: E.g. 401,7 68,3 forbids selection of primers in the 7 bases starting at 401 and the 3 bases at 68. Or mark the source sequence with < and >: e.g. ...ATCT<CCCC>TCAT.. forbids primers in the central CCCC.

Product Size Ranges 464-800

Click here to specify the min, opt, and max product sizes only if you absolutely must. Using them is too slow (and too computationally intensive for our server).

Number To Return: 5 Max 3' Stability: 9.0

Max Mispriming: 12.00 Pair Max Mispriming: 24.00

Pick Primers | Reset Form

General Primer Picking Conditions

	Min:	Opt:	Max:		
Primer Size	18	20	27		
Primer Tm	57.0	60.0	65.0	Max Tm Difference:	100.0
Product Tm					
Primer GC%	20.0		80.0		

Max Self Complementarity: 8.00 Max 3' Self Complementarity: 5.00

Max #N's: 0 Max Poly-X: 5

Done Internet