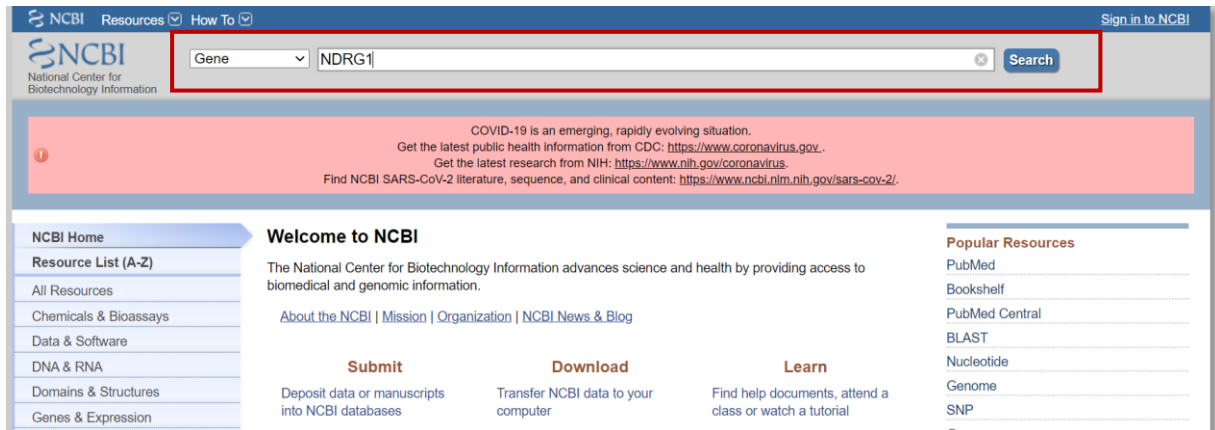


Primer 的設計及購買流程

逸安

一、設計 primer

1. 進入 NCBI 網站，選擇 Gene，輸入想尋找的基因名稱



2. 往下拉，選擇物種(實驗室用的 NDRG1 是來自人類的，所以選擇 human)

Search results

Items: 1 to 20 of 738 Selected: 1

<< First < Prev Page 1 of 37 Next > Last >>

See also 9 discontinued or replaced items.

Name/Gene ID	Description	Location	Aliases	MIM
<input checked="" type="checkbox"/> NDRG1 ID: 10397	N-myc downstream regulated 1 [<i>Homo sapiens</i> (human)]	Chromosome 8, NC_000008.11 (133237175..133297252, complement)	CAP43, CMT4D, DRG-1, DRG1, GC4, HMSNL, NDR1, NMSL, PROXY1, RIT42, RTP, TARG1, TDD5	605262
<input type="checkbox"/> Ndrgr1 ID: 17988	N-myc downstream regulated gene 1 [<i>Mus musculus</i> (house mouse)]	Chromosome 15, NC_000081.6 (66929318..66969641, complement)	CAP43, CMT4D, DRG1, HMSNL, NMSL, Ndr1, Ndr1, PROXY1, RTP, TDD5	
<input type="checkbox"/> Ndrgr1 ID: 299923	N-myc downstream regulated 1 [<i>Rattus norvegicus</i> (Norway rat)]	Chromosome 7, NC_005106.4 (107734326..107775701, complement)	Ndr1	

3. 點進去後會出現許多關於 NDRG1 的資訊，往下拉，找到”mRNA and protein”

NDRG1 N-myc downstream regulated 1 [*Homo sapiens* (human)]

Gene ID: 10397, updated on 1-Aug-2020

Summary

Official Symbol NDRG1 provided by HGNC
Official Full Name N-myc downstream regulated 1 provided by HGNC
Primary source HGNC:HGNC:7679
See related Ensembl:ENSG00000104419 MIM:605262
Gene type protein coding
RefSeq status REVIEWED
Organism [Homo sapiens](#)
Lineage Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo

NCBI Reference Sequences (RefSeq)

☐ RefSeqs maintained independently of Annotated Genomes

These reference sequences exist independently of genome builds. [Explain](#)

Genomic

1. **NG_007943.1 RefSeqGene**

Range	4952..65085
Download	GenBank , FASTA , Sequence Viewer (Graphics) , LRG_258

mRNA and Protein(s)

1. [NM_001135242.2](#) → [NP_001128714.1](#) protein NDRG1 isoform 1

[See identical proteins and their annotated locations for NP_001128714.1](#)

Status: REVIEWED

Source sequence(s)	AF004162 , AF192304 , AK126924 , D87953
Consensus CDS	CCDS34945.1
UniProtKB/Swiss-Prot	Q92597
Related	ENSP00000404854.2 , ENST00000414097.6

Conserved Domains (1) [summary](#)

pfam03096	Ndr; Ndr family
Location:34 → 316	

底下可能會有許多該基因的 isoform(異構物)，選擇他們的 FASTA 格式，再將這些異構物分別丟到 MultAlin 進行比對

4.進入 MultAlin，貼上所有 isoform 的序列進行比對

Sequence data

Cut and paste your sequences here below.

6. 進入 NCBI "primer design tool"，將序列貼上

Primer-BLAST A tool for finding specific primers

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

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

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

ATCTCAGGATGGACCCAAAGCTCTGCCGGACATGGTGGTCCACACCTTTTGGGAAGGAAGA
 AATGCGAGTAACTGGAAAGTGGTCCACACCTACCGCCAGCACATTTGAAATGACATGAACCCGGGCAAC
 CTGCACCTGTTTATCAATGCTACAAACAGCCGGCGGACCTGGAGATTGAGCGACCAATGC CGGGAAACC
 ACACAGTCACCCCTGCAGTGCCTGCTCTGTTGGTGGTGGGGACAGCTCCCTGCAGTGGATGCGCTGGT
 GGAGTGAACCTCAAAATGGACCCAAACAAAGACCACTCTCTCAAGATGGCGGACTGTGGCGGCTCCCG

Range
 Forward primer From To [Clear](#)
 Reverse primer From To

Or, upload FASTA file [選擇檔案](#) 未選擇任何檔案

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 70 Max 1000
 # of primers to return 10

Primer melting temperatures (Tm) Min 57.0 Opt 60.0 Max 63.0 Max Tm difference 3

修改 primer 大小，若為 qPCR primer 通常為 100~250bp

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 100 Max 250
 # of primers to return 10

Primer melting temperatures (Tm) Min 57.0 Opt 60.0 Max 63.0 Max Tm difference 3

選擇 Database 種類。一般 RNA 選用“Refseq mRNA”，如果需要 non-coding RNA 則選用“Refseq RNA”。勾選下方兩格方框，用於避免搜尋到資料庫中未被驗證的序列。完成後送出

Primer Pair Specificity Checking Parameters

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

Search mode Automatic

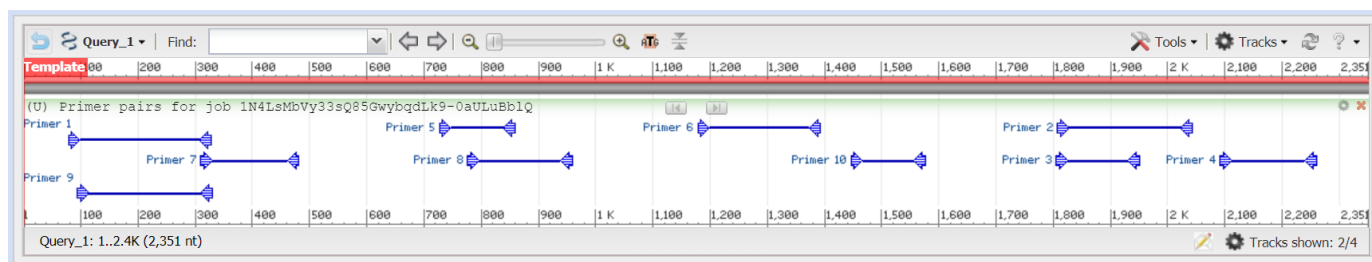
Database Refseq mRNA

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

Organism Homo sapiens

Entrez query (optional)

7. 圖為 primer 的位置



選擇 primer 的原則:

- (1) 兩兩 primer 間 Tm 值差 <1
- (2) Self complementarity <5
- (3) Self 3' complementarity <2

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GAAGTGGTCCACACTACCG	Plus	20	79	98	60.04	60.00	7.00	2.00
Reverse primer	GTCCGCCATCTTGAGGAGAG	Minus	20	327	308	59.90	60.00	4.00	1.00
Product length	249								

Primer pair 2

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CTCTTTGCTCTTGTCGGGGT	Plus	20	1807	1826	59.96	55.00	2.00	0.00
Reverse primer	TCCACGGTGAGCCAAAATGA	Minus	20	2042	2023	59.89	50.00	5.00	1.00
Product length	236								

由結果挑出一個最好的，完成設計 primer

二、primer 訂購

進入「基龍米克斯」，選擇線上訂購



[科技服務線上訂購](#) [聯絡我們](#) [LANGUAGE 繁體中文 / English](#)

[首頁](#) [關於我們](#) [科研服務](#) [次世代定序](#) [生育健康](#) [大眾健康](#) [委託流程](#)

帳號: MNT330501 密碼: 107A13 (實驗室網站有)

使用者登入

📄 登入帳號

MNT330501

🔑 登入密碼

.....

🛒 基米商城
➔ 訂購服務

[👤 申請帳號](#)

選擇”引子訂購”



聯絡電話:23938235

地址:台北市中正區仁愛路一段一號 10 樓 1009 室

備註:台大院內

信箱:填自己的

【訂購者】 國立臺灣大學醫學院—生理學研究所【賴亮全】 【系所/部門】 生理學研究所 【實驗室主持人】 賴亮全

聯繫人：【1】請下拉選擇，或直接輸入 聯絡電話：【2】請下拉選擇，或直接輸入

通知信箱：【3】請下拉選擇，或直接輸入 + 增加通送貨地址（樓、室）【4】請下拉選擇，或直接輸入詳盡地址

備註：

快速型 經濟型 實惠型 EXTRE管式 EXTRE盤式 新增五列 新增十列 複製資料 貼上資料 訂單確認 取消訂單

▲Oligo

	刪除	Name*	Sequence(5' to 3')*	O.D.*	Quantity*	MERS	GC	5' Modification	3' Modification	Internal	留作定序註記
1											
2											
3											
4											
5											

最後分別將 F、R 填入，OD:2，Quantity 選 OPC
之後按訂單確認及完成訂購。