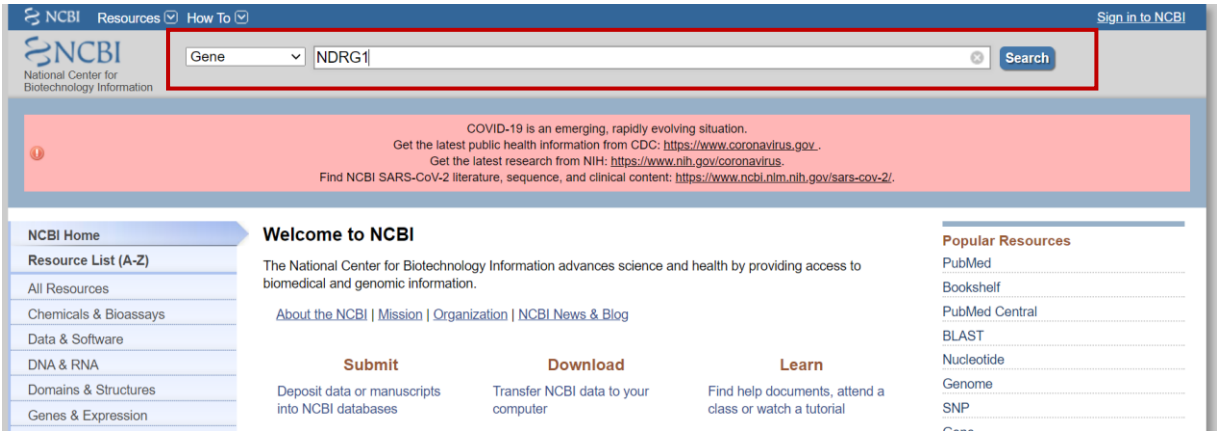
# Primer 的設計及購買流程

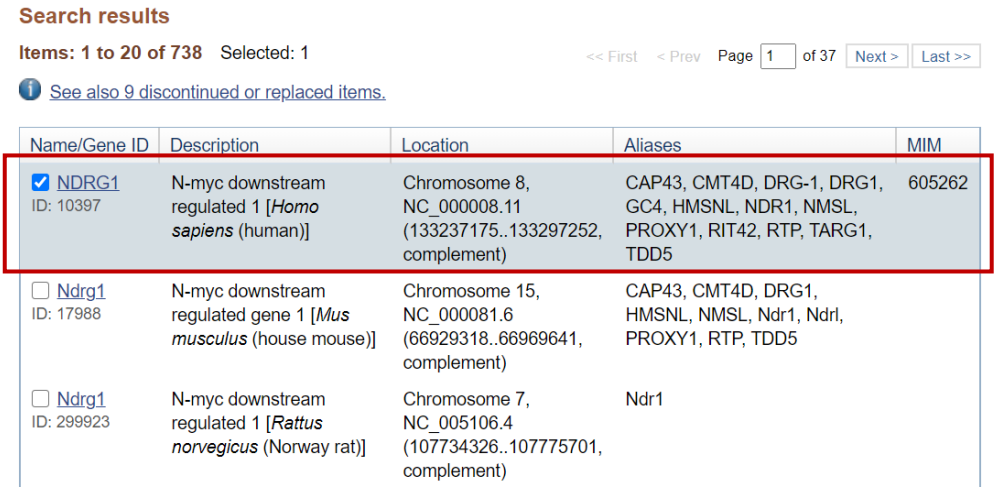
逸安

一、設計 primer

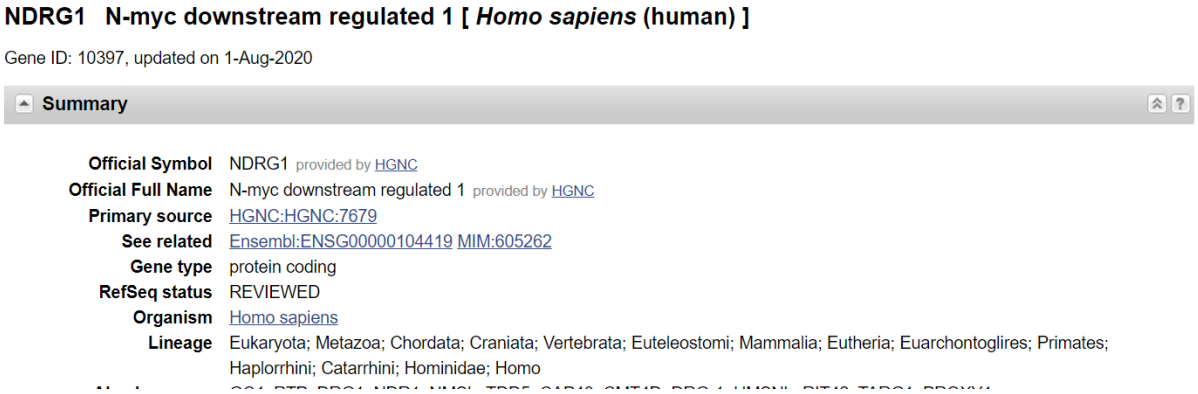
1.進入 NCBI 網站，選擇 Gene，輸入想尋找的基因名稱

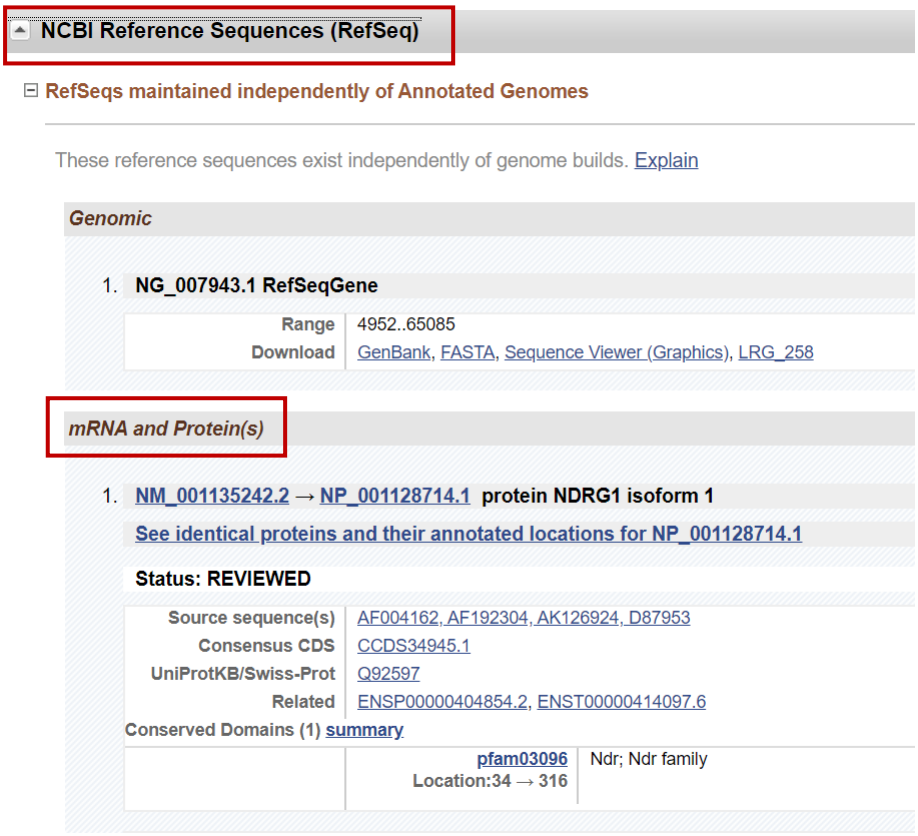



2. 往下拉，選擇物種(實驗室用的 NDRG1 是來自人類的，所以選擇 human)



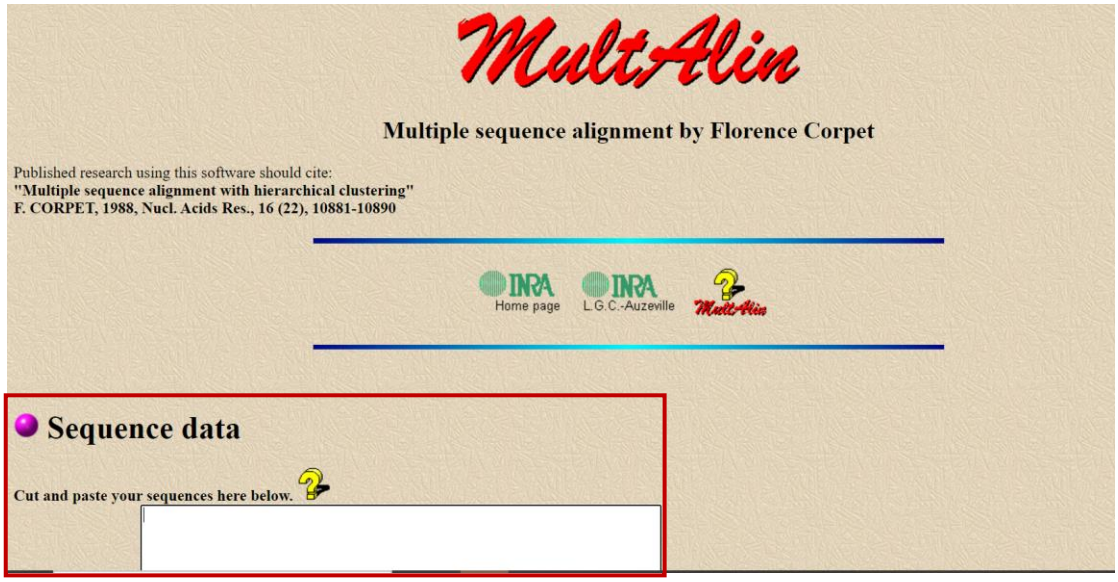

3. 點進去後會出現許多關於 NDRG1 的資訊，往下拉，找到"mRNA and protein"

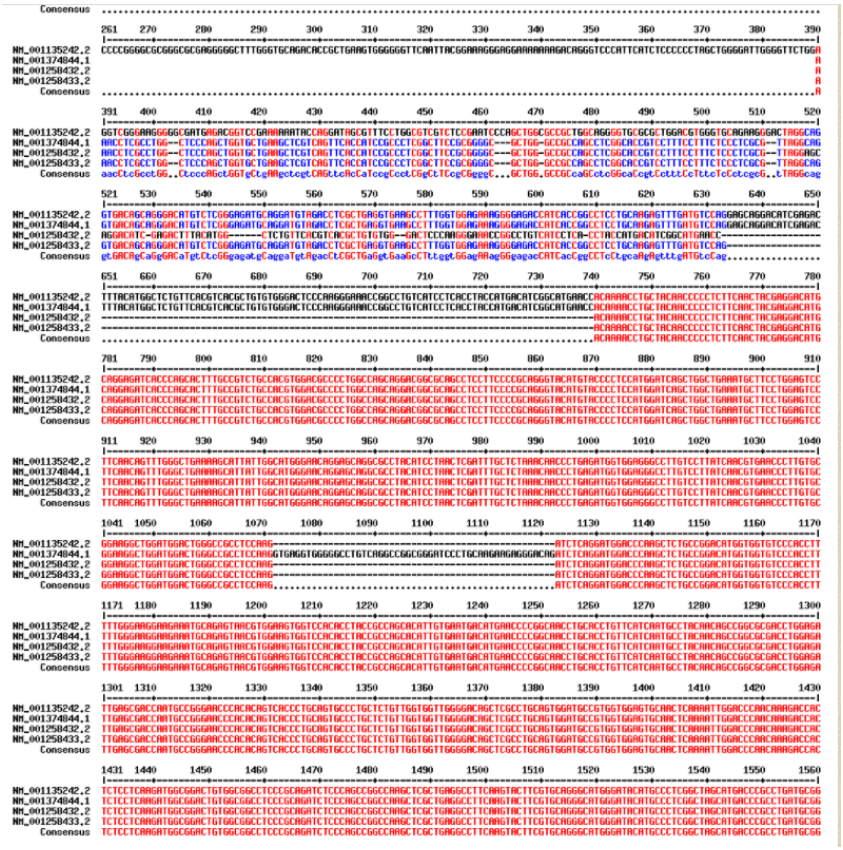





底下可能會有許多該基因的 isoform(異構物)，選擇他們的 FASTA 格式，再將這些異構物分別丟到 MultAlin 進行比對

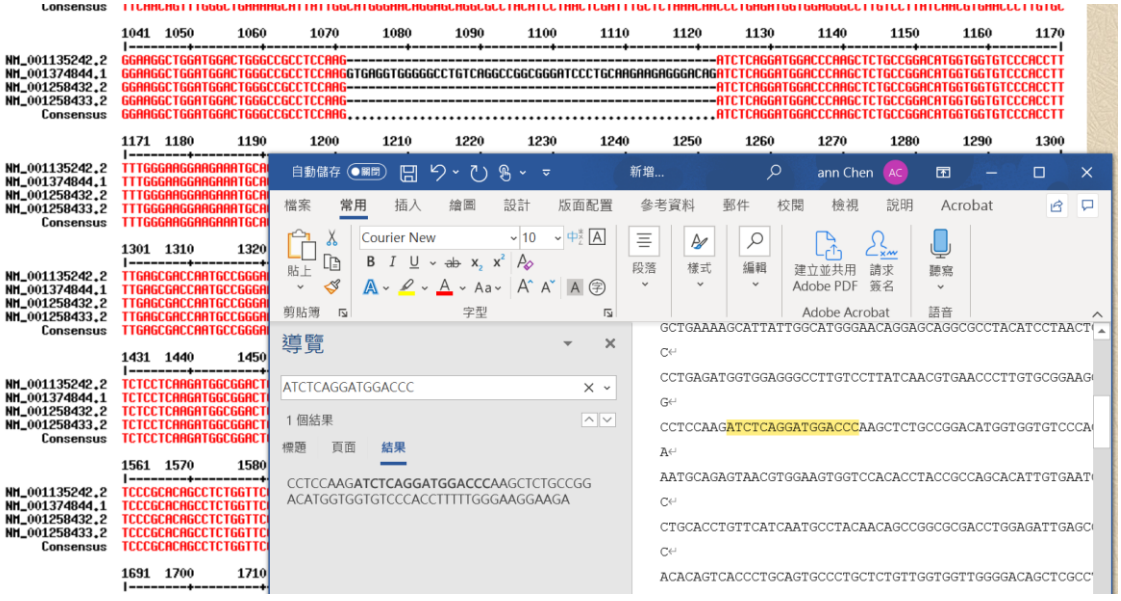
4.進入 MultAlin，貼上所有 isoform 的序列進行比對



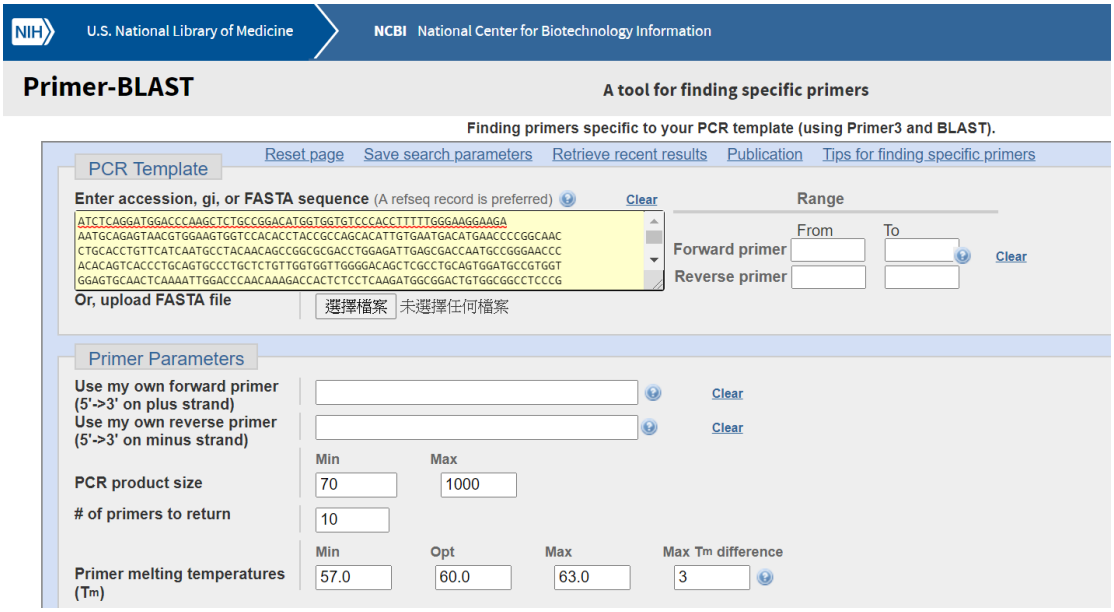


紅字代表四組 isoform 完全相同的區域，代表該區域是 NDRG1 所有 isoform 的重疊區域。因由重疊區域的序列來設計 primer，確保不管是哪個 isoform 皆能以此 primer 夾到。

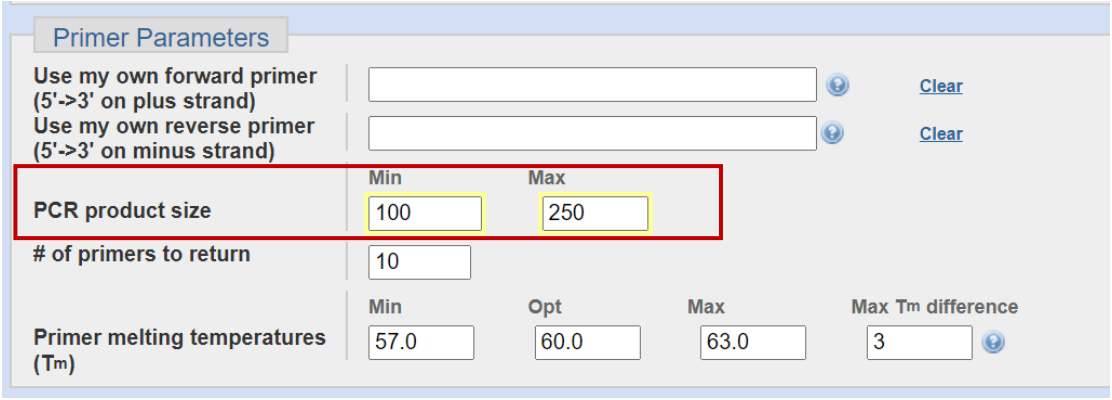
5. 確定重疊的片段後，回到 NCBI，複製其中一個 isoform 的序列並貼到 word，以 word 的尋找功能找到重疊片段，將該序列全部複製。



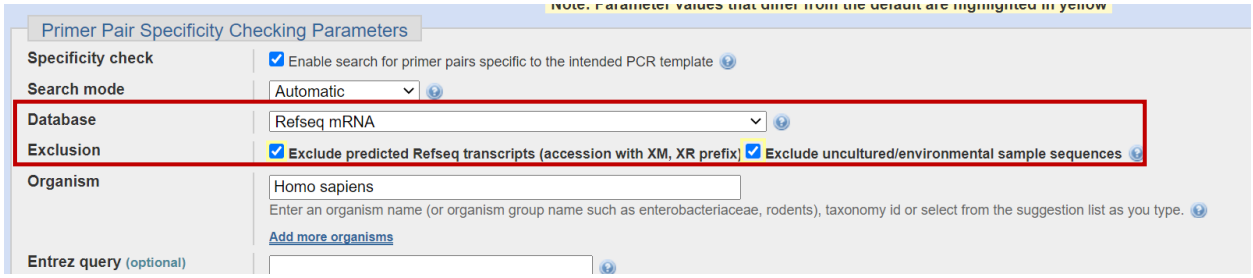
6. 進入 NCBI ”primer design tool”，將序列貼上




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




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



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 | GAAGTGGTCCACACCTACCG | 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

帳號: MNT330501　密碼:107A13（實驗室網站有）

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

最後分別將 F、R 填入，OD:2，Quanlity 選 OPC

之後按訂單確認及完成訂購。