

National Library of Medicine

——引物设计

1. 明确目标

1.1 明确需扩增的DNA序列、扩增长度、是否需要特殊的末端设计



2. 获取目标序列

2.1 进入Pubmed，点击进入National Library of Medicine

2.2 选择Gene数据库，输入目标基因，跳转后选择基因种属

2.3 在mRNA and Protein部分找到NM→NP，点击进入引物设计

2.4 复制ORIGIN部分的序列，在同页面点击Pick Primers

2.5 直接跳转可见PCR Template 部分有ID号，若无则将上述复制的序列号输入

2.6 设置关键参数，点击Get Primers

2.7 确保信息无误时，选择跨外显子引物，导出



3. 特异性检验

3.1 BLAST验证时，要确保数据库与物种选择正确



4. 评估结果

4.1 满足所有核心参数、二聚体倾向低、BLAST验证结果最好、产物大小符合预期、Tm符合要求

常见问题解析

1. PCR产物中出现多条带怎么办？

可能的原因有与解决办法：①引物形成二聚体或出现非特异性扩增：引物中出现重复序列、GC含量过高/过低、退火温度过低，导致引物与非目标序列结合；可应用BLAST验证引物的特异性，提高退火温度；②试剂污染：阴性对照也出现多条条带说明试剂污染，更换试剂并清洁工作台面；③模板纯度不足：重新纯化模板；④Mg²⁺或dNTP浓度过高：优化PCR缓冲体系；⑤循环数过大或模板量过大：减少PCR循环次数(建议20-30次)，或稀释模板浓度重新扩增。

2. 引物与模板或自身形成稳定的二级结构？

①引物3'端或内部存在互补碱基，导致引物间结合；BLAST检测；②试剂污染：阴性对照也出现多条条带说明试剂污染，更换试剂并清洁工作台面；③模板纯度不足：重新纯化模板；④Mg²⁺或dNTP浓度过高：优化PCR缓冲体系；⑤引物自身有连续四个碱基互补，导致引物自身形成发卡状结构：优化引物设计；⑥GC含量过高：重新设计引物，确保GC含量在40%-60%之间。

3. PCR扩增效率低或无产物

①引物长度过长或过短：重新设计引物，确保长度在18-25 bp之间；②GC含量过高或过低：重新设计引物，确保GC含量在40%-60%之间；③模板量不足或过量：优化模板浓度，进行不同梯度的预实验；④引物降解：重新合成引物，-20℃保存，避免反复冻融；⑤引物浓度过低：增加引物浓度；⑥PCR反应条件不适宜：进行梯度实验挑选出最佳反应条件。