

# National Library of Medicine ——BLAST

## 1. 明确目标



1.1 确定待验证序列与BLAST工具

## 2. 打开网址



2.1 进入Pubmed，点击进入National Library of Medicine  
2.2 打开右侧BLAST，选择对应的BLAST程序

## 3. 提交序列



3.1 BLAST验证时，Primers Parameters中输入引物序列  
3.2 选择目标数据库并限定物种，点击Get Primers，等待结果

## 4. 评估结果

4.1 只出现一条结果，说明引物特异性好

# 常见问题解析

## 1. 问题：无显著比对结果

可能原因：序列过短/特殊（如重复序列）；数据库不匹配。

解决方法：尝试更长序列；切换更全面的数据库（如nt/nr）；降低E值阈值。

## 2. 问题：结果过多（thousands+）

可能原因：E值设置过宽；序列为保守区域（如管家基因）。

解决方法：提高E值阈值（如 $1e^{-10}$ ）；限定物种范围；分析高得分结果。

## 3. 问题：格式错误导致程序报错

可能原因：序列含非ATCG/氨基酸字符；FASTA头行格式错误。

解决方法：检查并删除特殊字符；规范FASTA头行（避免空格/符号）。

## 4. 问题：误判同源性（高E值但低一致性）

可能原因：混淆E值与一致性含义；短序列随机匹配。

解决方法：优先关注一致性 $>30\%$ 且E值 $<1e^{-5}$ 的结果；结合多数据库验证。

## 5. 问题：比对类型选择错误

可能原因：如用blastn比对蛋白质序列。

解决方法：根据序列类型选择正确比对类型（如blastp用于蛋白质-蛋白质）。