

Primer Express v3.0

Primers and Probe Design For Real-Time PCR

Primers/Probes Design Guideline

TaqMan Probe	Primer
Probe 與 Primer 的距離愈近愈好, PCR 產物大小建議在 50-150 bp 為最佳	
G/C % 為 30-80 %	
避免有重複序列的出現, 尤其避免 4 個以上 G 的出現	
Tm 值: 68-70 (Quantification assay) 65-67 (Allelic Discrimination assay)	Tm 值: 58-60°C
Probe 長度: 13~25 bases (TaqMan MGB probe) 13~30 bases (TaqMan probe)	Primer 長度: 20 bases (Optimal)
避免連續 6 個 A 的序列出現	3'端的前五個序列裡不能超過 2 個 C+G
5'端第一個序列不能為 G (如果選擇 FAM-dye 在 5'端第二個序列也不能為 G)	
選擇C比G多的strand當作probe ^b	
避免 3'端的前 4 個序列裡含有 3 個或以上 G (GGG-MGB-3' or GGAG-MGB-3') ^a	
避免probe的中間區域含有 2 個或以上的CC di-nucleotides ^a	

a: 針對 TaqMan MGB probe

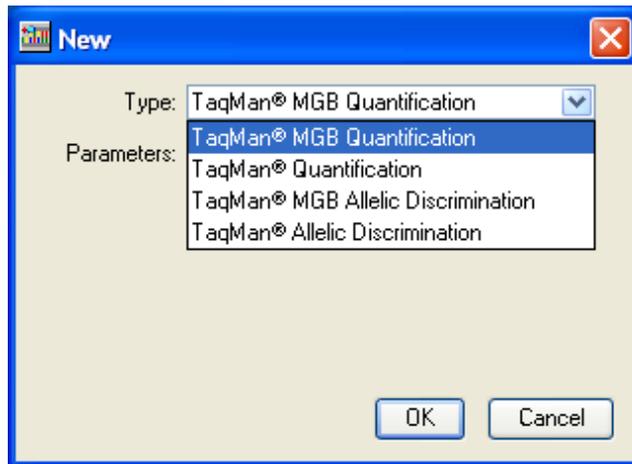
b: 參數可選擇設定

Primers & Probes for Quantification

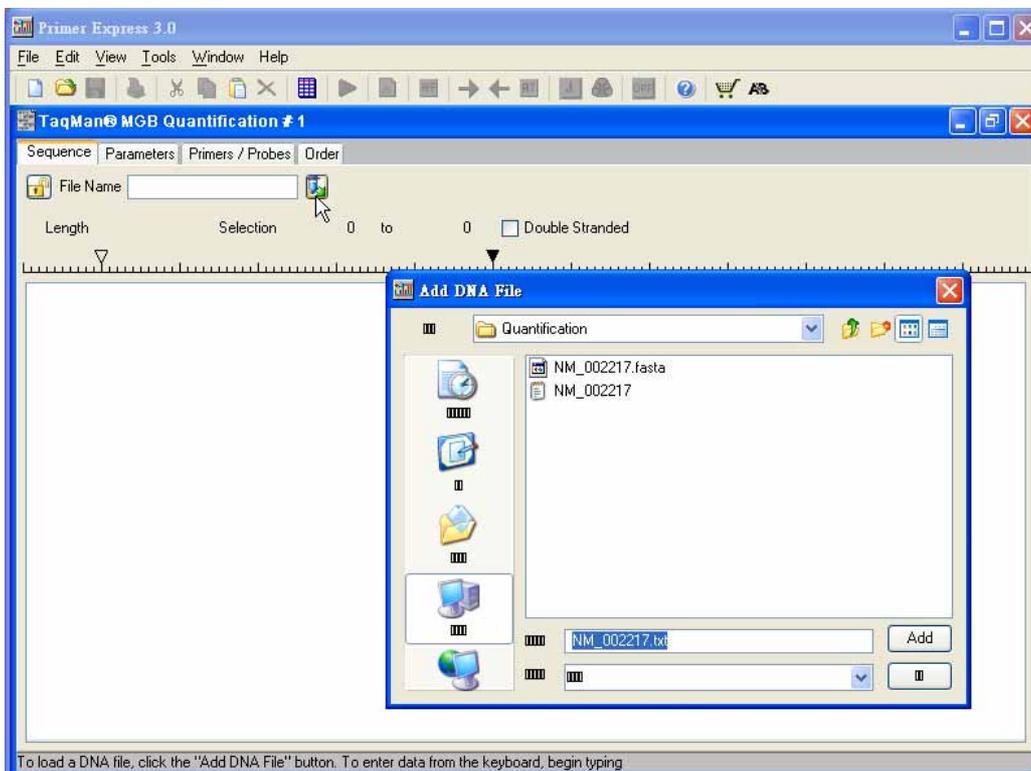
● Automatically Design

進入 Primer Express 3.0 軟體

File → New → 選擇“TaqMan MGB Quantification 或 TaqMan Quantification” → OK

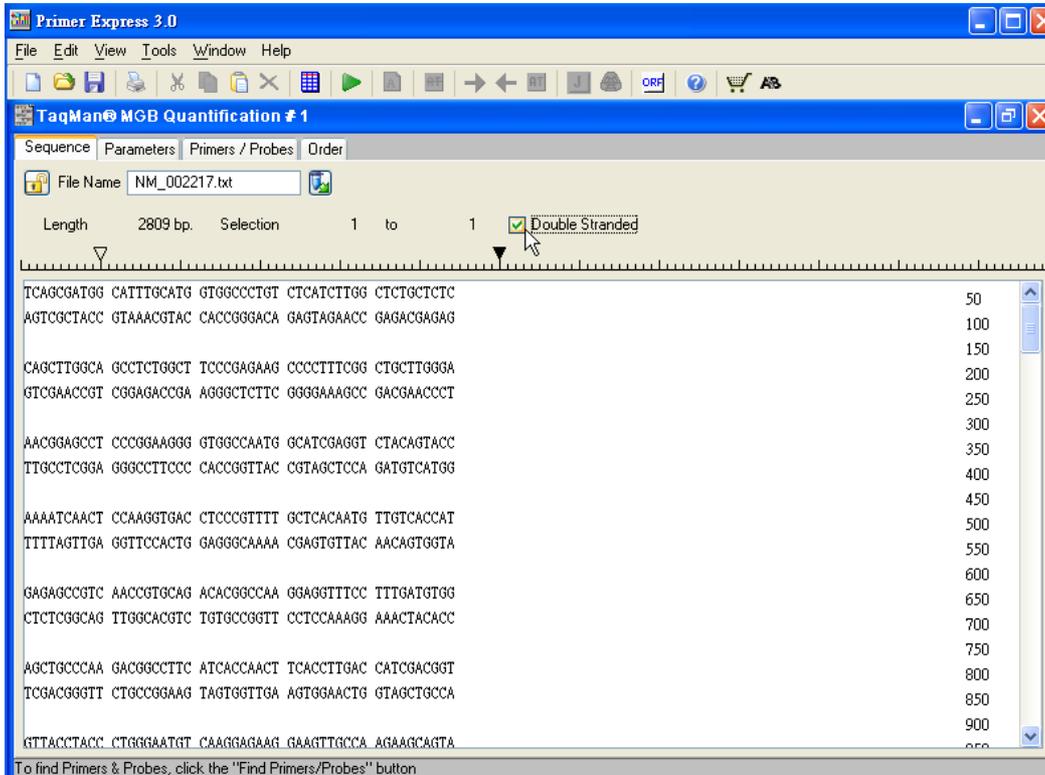


Tools → 按 “Add DNA File” ，尋找序列存取位置，按下”Add”，將序列檔案加入空白文件。亦可在”Sequence” Tab 中使用 Copy & Paste 轉貼或直接輸入序列。



* Primer Express Software 只能接受 .dan, .txt, .ab1, 或 .abi 的檔案格式，請事先將欲分析的序列存成純文字檔即可(若序列是從 database download 下來時，請刪除與序列無關之資料)

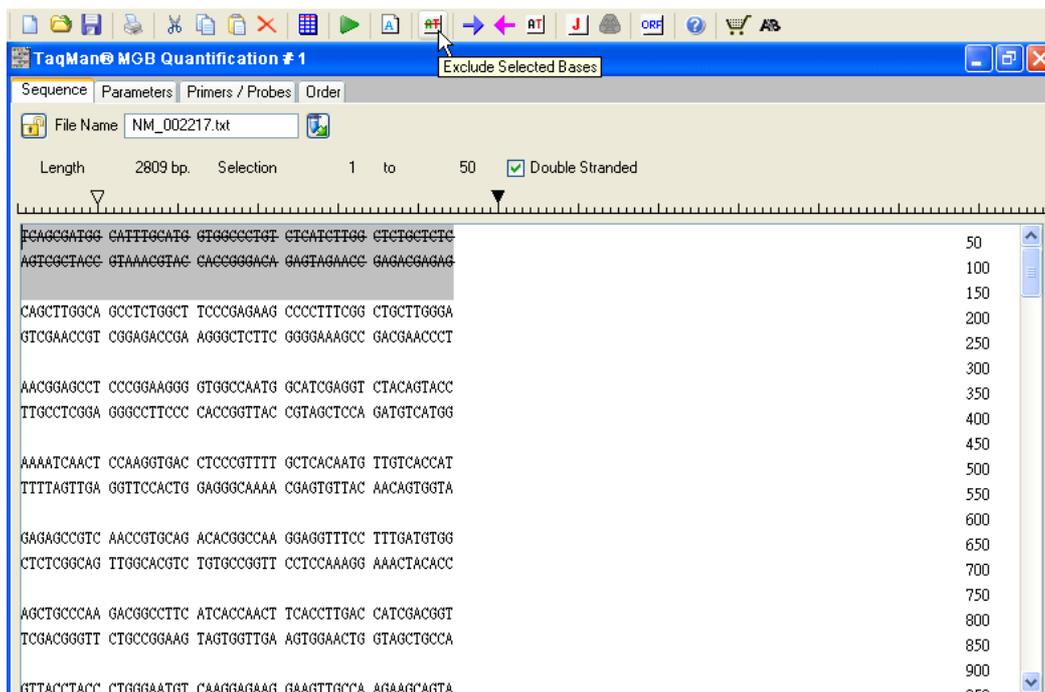
可勾選” Double Strand “，即會顯示 double stranded DNA sequence



Tools 上的選項

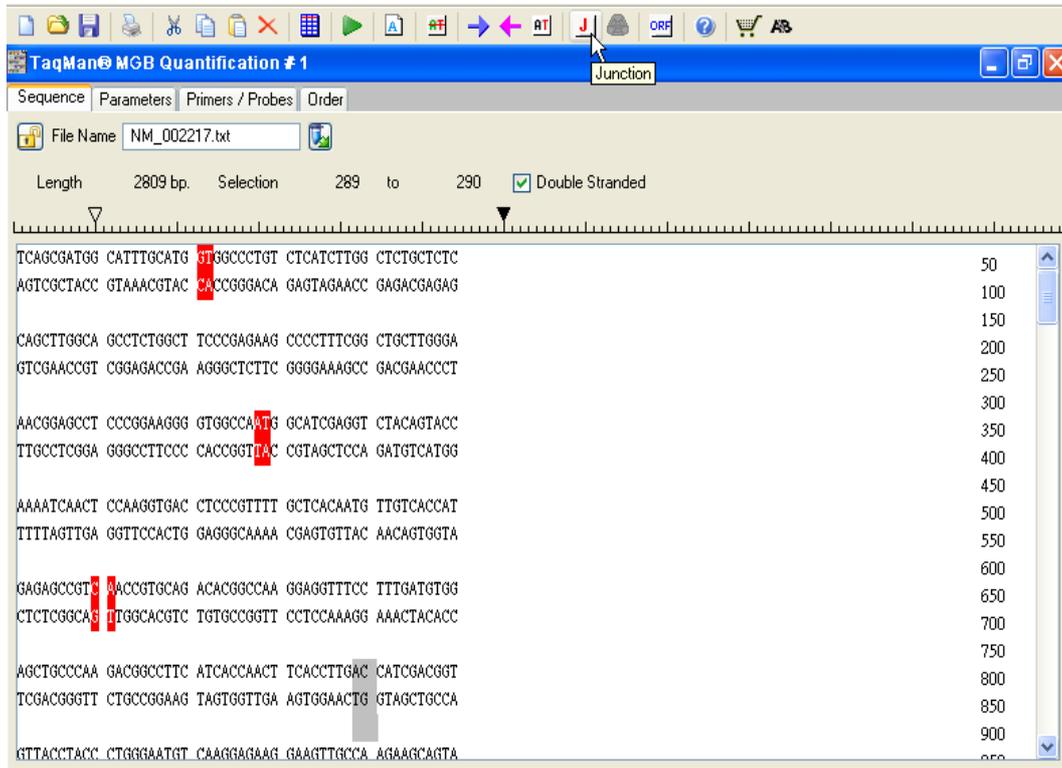
1. Exclude: 不必要的序列可利用”Exclude Selected Bases” 將序列刪掉

- 先選取不要的序列範圍，點選 “Exclude”，即可看見此區域被劃掉



2. **Junction**: 如果已經知道序列上 junction 位置則可利用”Junction”

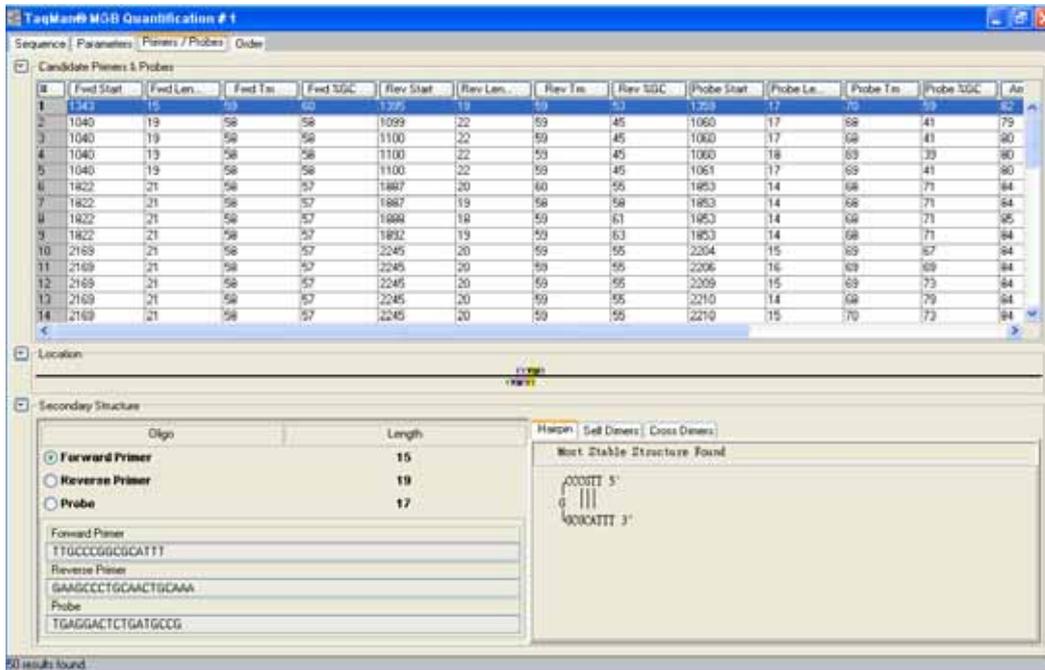
- 框選 junction 的位置(必須含 2 bases), 再點選 “Junction”, 即可看見此區域被紅色標記起來。



3. 在”Parameters” Tab 中可看到 Primer/Probe Tm 值設定及其他 Primers/Probe 設計之規範

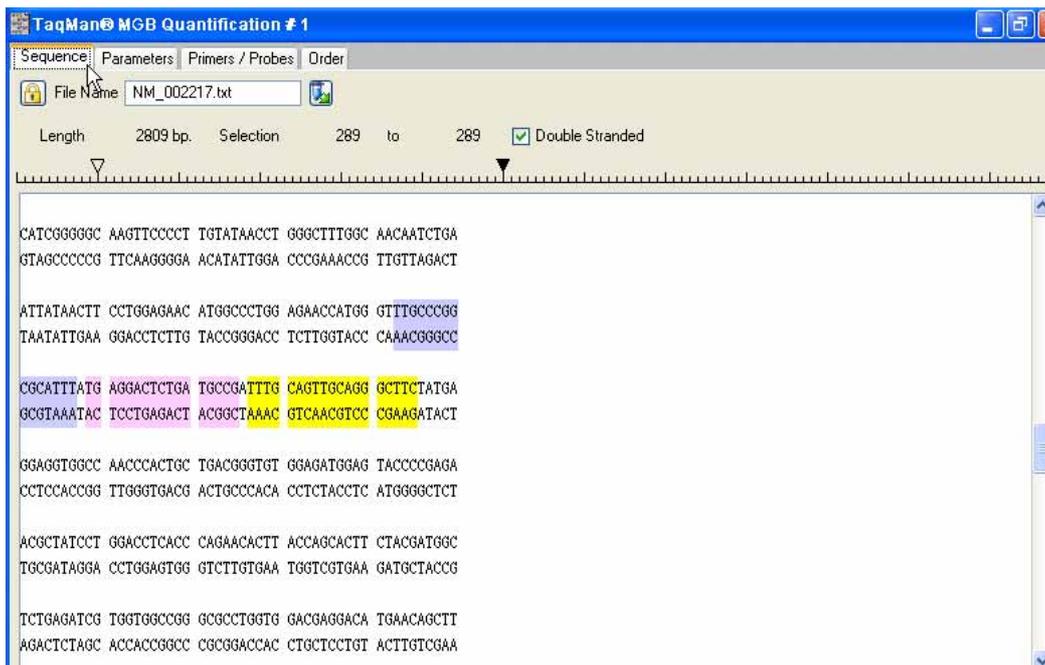
Parameter	Value
<input type="checkbox"/> Primer Tm	
Min Primer Tm	58
Max Primer Tm	60
Max Difference in Tm of Two Primers	2
<input type="checkbox"/> Primer GC Content	
Min Primer %GC Content	30
Max Primer %GC Content	80
Max Primer 3' GC's	2
Primer 3' End Length	5
Primer 3' GC Clamp Residues	0
<input type="checkbox"/> Primer Length	
Min Primer Length	9
Max Primer Length	40
Optimal Primer Length	20
<input type="checkbox"/> Primer Composition	
Max Primer G Repeats	3
Max Num Ambig Residues in Primer	0
<input type="checkbox"/> Primer Secondary Structure	
Max Primer Consec Base Pair	4
Max Primer Total Base Pair	8
<input type="checkbox"/> Primer Site Uniqueness	
Max % Match in Primer	75
Max Consec Match in Primer	9
Max 3' Consec Match in Primer	7

回到 "Sequence" Tab，Tools → Find Primers/Probes ，軟體即開始找尋適當的 Primers/Probe pairs



Primer Express 軟體會找到 Candidate Primers & Probe pairs，一次 search 最多能找到 50 種組合，這些組合列於 "Primers / Probes" Tab 中。中間 "Location" 說明 primers & probes 在序列中的相對位置，在橫線上方的數字代表起始位置，橫線下方則代表終止位置。

"Sequence" Tab 中會顯示出與 "Primers / Probes" Tab 相對應的一對 Primers/Probe: 粉紅色片段是 Probe 的位置，藍色代表 Forward Primer，黃色片段則為 Reverse Primer，如下圖所示。(*但並不表示此為最佳的設計)



在 "Primers / Probes" Tab 中會將每對Primers/Probe的組合列出來，請從中挑選出適當的組合，挑選方式可依據第 2 頁 primer/ probe design guideline。在MGB Probe的篩選中，亦可在"Parameters" Tab 中加選"C"比"G"多的序列作為進一步篩選的參數。

Parameter	Value
Max Primer G Repeats	3
Max Num Ambig Residues in Primer	0
<input type="checkbox"/> Primer Secondary Structure	
Max Primer Consec Base Pair	4
Max Primer Total Base Pair	8
<input type="checkbox"/> Primer Site Uniqueness	
Max % Match in Primer	75
Max Consec Match in Primer	9
Max 3' Consec Match in Primer	7
<input type="checkbox"/> Probe Tm	
Min Probe Tm	68
Max Probe Tm	70
<input type="checkbox"/> Probe GC Content	
Min Probe %GC Content	30
Max Probe %GC Content	80
<input type="checkbox"/> Probe Length	
Min Probe Length	13
Max Probe Length	25
<input type="checkbox"/> Probe Composition	
Max Probe G Repeats	3
Max Num Ambig Residues in Probe	0
No G at 5' End in Probe	<input checked="" type="checkbox"/>
Select Probe with more C's than G's	<input checked="" type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Probe Secondary Structure	
Max Probe Consec Base Pair	4
Max Probe Total Base Pair	8
<input type="checkbox"/> Amplicon	
Min Amplified Region Tm	0
Max Amplified Region Tm	85
Min Amplified Region Length	50
Max Amplified Region Length	150
<input type="checkbox"/> General	
Max Primers / Probes	50

決定 primer/ probe set 之後則可進行存檔，存檔的方式從 File → Save As 存檔。如果想將所選擇的 primer/ probe set 單獨儲存，可利用 Export → Order Info...的方式，或者要儲存 50 個 Primers/Probes 清單，可點選 Export → Primers/Probes List...，以上兩種方式都可存成.txt 檔案，在 Excel 中開啟。

	Sequence...	Fwd %GC	Rev %GC	Rev Len...	Rev Tm	Rev %GC	Probe Start	Probe Le...	Probe Tm	Probe %GC	An		
5	11047	19	58	58	1100	22	59	45	1061	17	69	41	80
6	1822	21	58	57	1887	20	60	55	1853	14	68	71	84
7	1822	21	58	57	1887	19	58	58	1853	14	68	71	84
8	1822	21	58	57	1888	18	59	61	1853	14	68	71	85
9	1822	21	58	57	1892	19	59	63	1853	14	68	71	84
10	2169	21	58	57	2245	20	59	55	2204	15	69	67	84
11	2169	21	58	57	2245	20	59	55	2206	16	69	69	84
12	2169	21	58	57	2245	20	59	55	2209	15	69	73	84
13	2169	21	58	57	2245	20	59	55	2210	14	68	79	84
14	2169	21	58	57	2245	20	59	55	2210	15	70	73	84

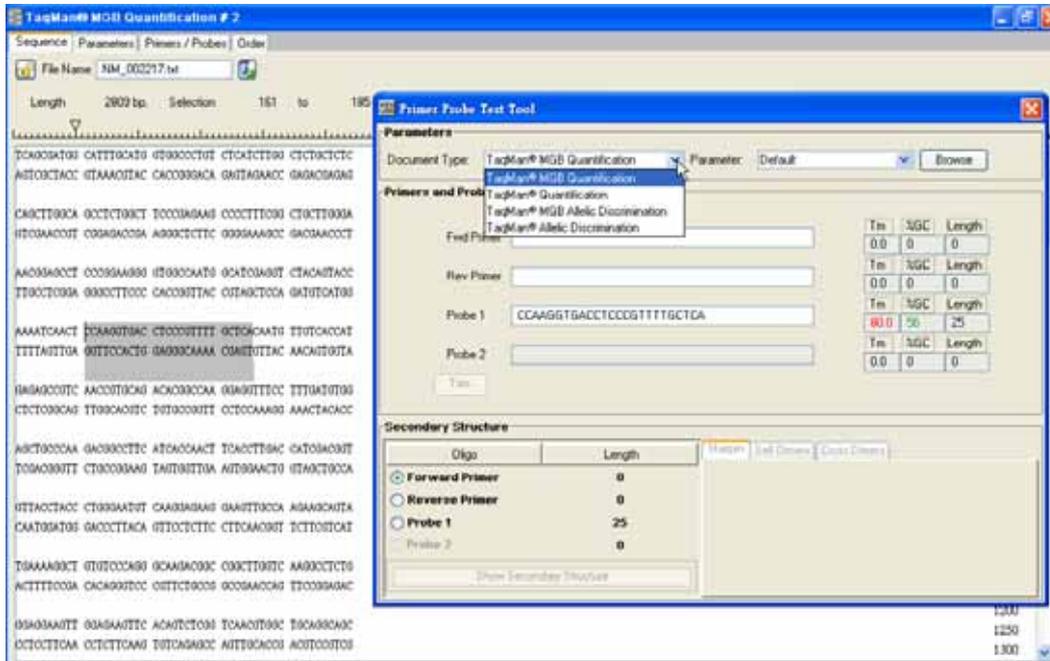
● Manually Design

當軟體無法自動尋找到 Primer/Probe 組合時，先確定 Primer/Probe 想要置放的位置
開啟一個新的 **Quantification Document**，並把欲設計的序列檔案加入 (參照第 3 頁)。

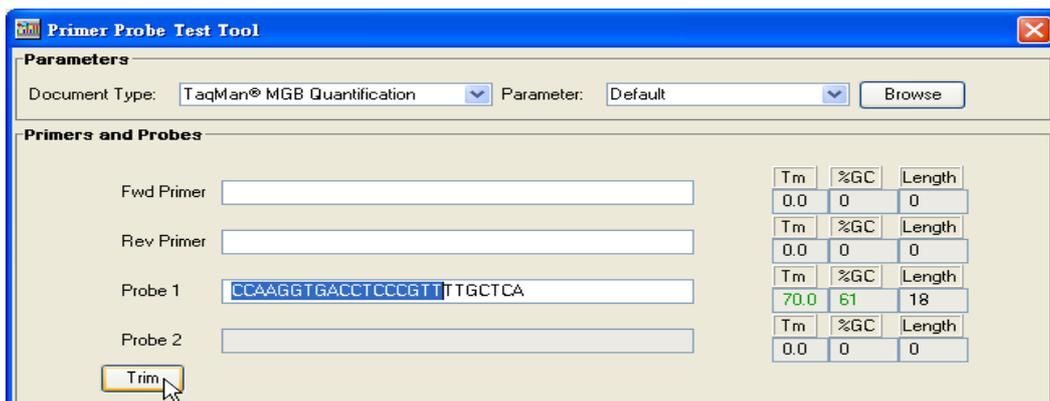
1. Probe 的設計:

在”Sequence” Tab 中將 Probe 之預定序列 highlight 起來 (至少 25 bases 之長度，長度依序列結構而定)後，先利用 Edit 中 Copy (Ctrl+C) 之功能複製序列，再依下圖至 Tools→ Primer Probe Test Tool 中，選擇欲設計的 document type (即“TaqMan MGB Quantification 或 TaqMan Quantification”)，並確認 Parameter 設定為”Default”，再利用 Paste (Ctrl+V) 將序列貼在 Probe 1 欄位，從右邊即可觀察測試序列之 Tm, %GC 和長度是否合適。

註: probe 第一個序列不能為 G，且序列裡面 C 的數目要比 G 還要多

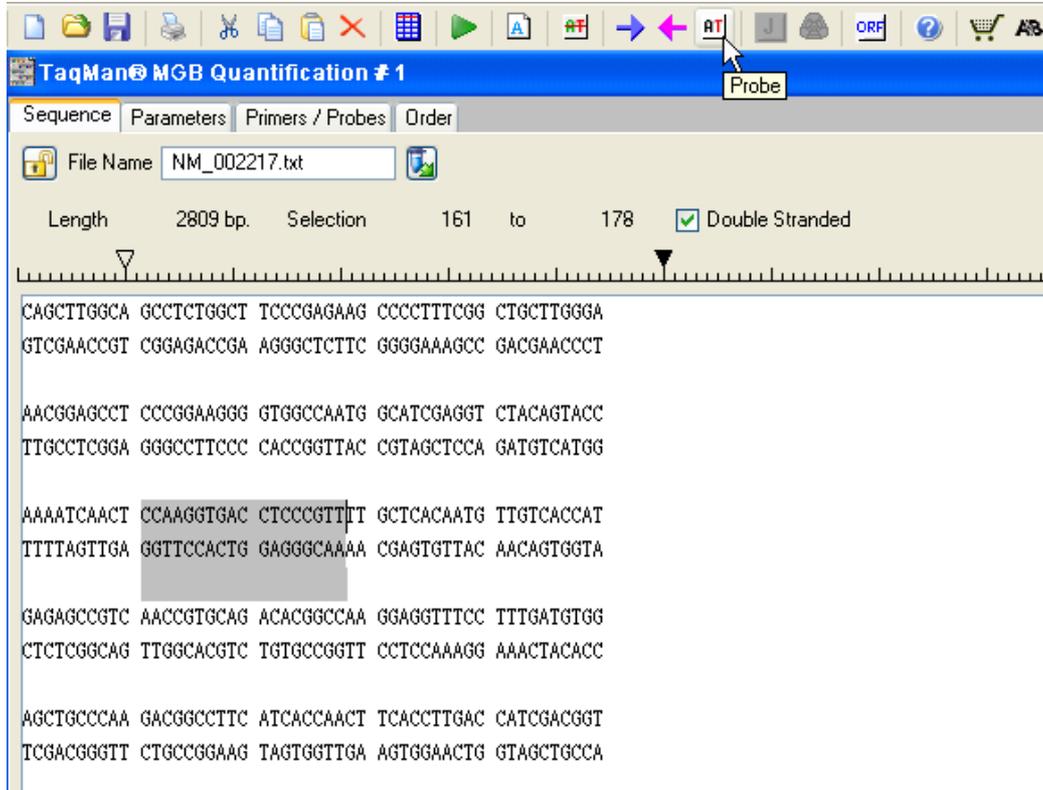


此時若 Tm 超過設定值(68°C to 70°C)，可直接在 Probe 1 欄位中框選不同的序列片段，並觀察右邊對應的 Tm, %GC 和長度，以找出最適當的 Probe (請參照 primer/probe design guideline)，若框選到適合的片段，點一下”Trim”，就可以將未框選的序列直接刪除，而留下需要的 Probe 序列。



當 Probe 序列確定之後，回到”Sequence” Tab 中將 Probe 之確定序列 highlight 起來並利用 Edit →

Annotate → ”Probe”  將 probe 序列固定起來，此時 probe 的位置會被標定成綠色。

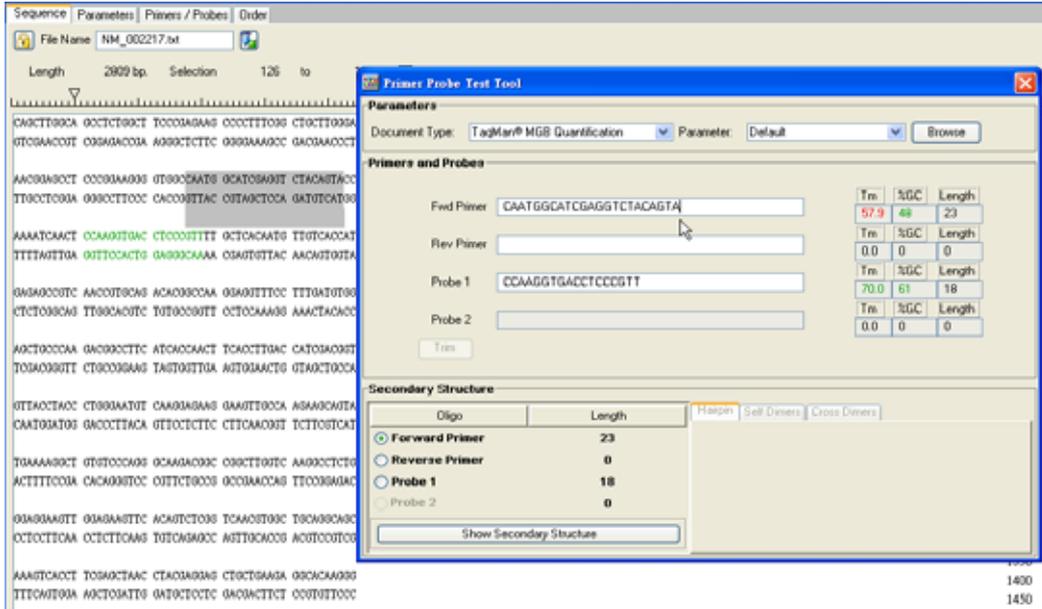


之後，可利用 Tools → Find Primers/Probes ，找出與設定之 Probe 配對的 **Forward / Reverse**

Primers。若自動搜尋無法找到配對的 Primers 可依以下步驟進行 **Forward / Reverse Primers** 的設計。

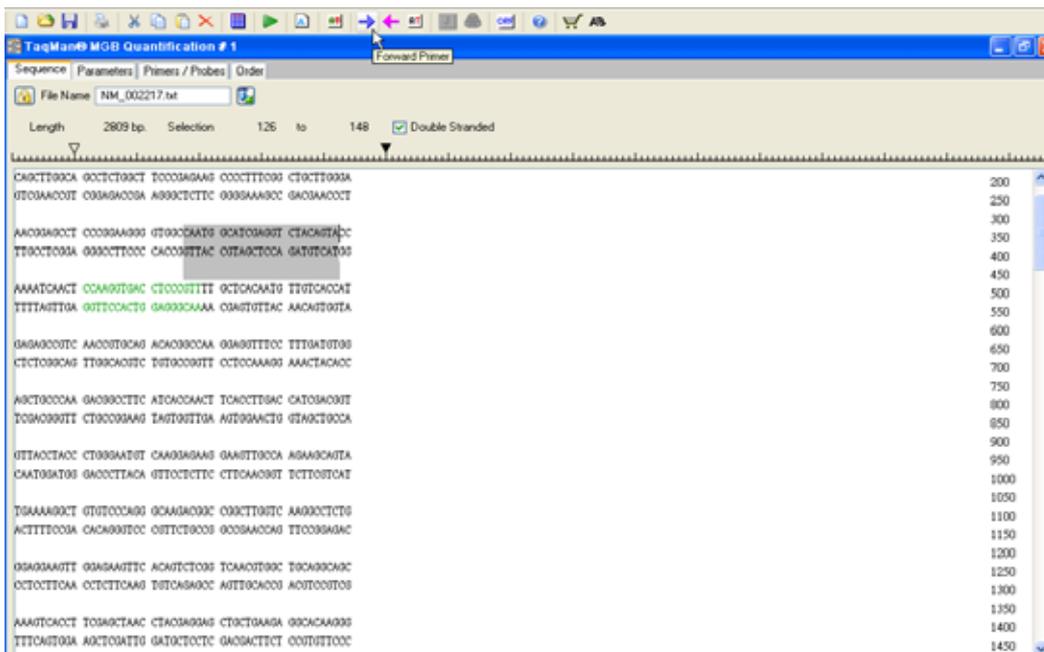
2. Forward Primer 設計:

在"Sequence" Tab 中將預定 Primer 序列 highlight 起來(至少 25 bases 之長度, 切勿與 Probe 序列重疊)後, 先利用 Edit 中 Copy (Ctrl+C)之功能複製序列, 再依下圖至 Tools → Primer Probe Test Tool 中, 利用 Paste (Ctrl+V) 將序列貼在 Fwd Primer 欄位, 從右邊即可觀察測試序列之 Tm, %GC 和長度是否合適。



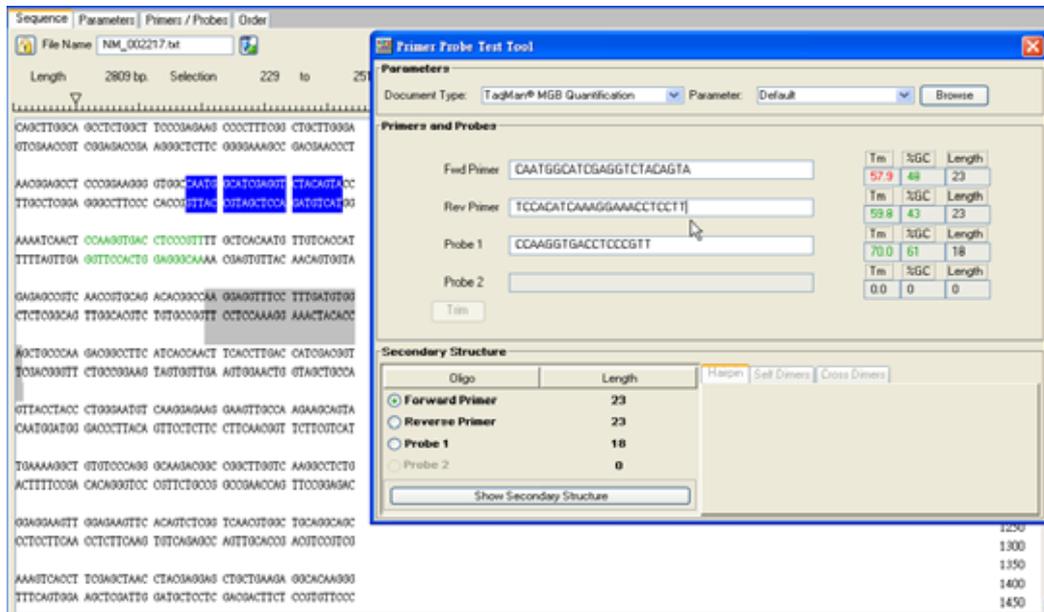
確認 Forward Primer 的 Tm 值在 58-60°C, 如果 Tm 值不符合, 可直接在 Fwd Primer 中框選不同的序列片段, 並觀察右邊對應的 Tm, %GC 和長度, 以找出最適當的 Primer (請參照 primer/ probe design guideline), 若框選到適合的片段, 點一下"Trim", 就可以將未框選的序列直接刪除, 只留下需要的序列。

當 Fwd Primer 序列確定之後, 回到"Sequence" Tab 中將確定序列 highlight 起來, 再利用 "Forward Primer" 固定起來, 此時的 Fwd Primer 位置會被標定成藍色。



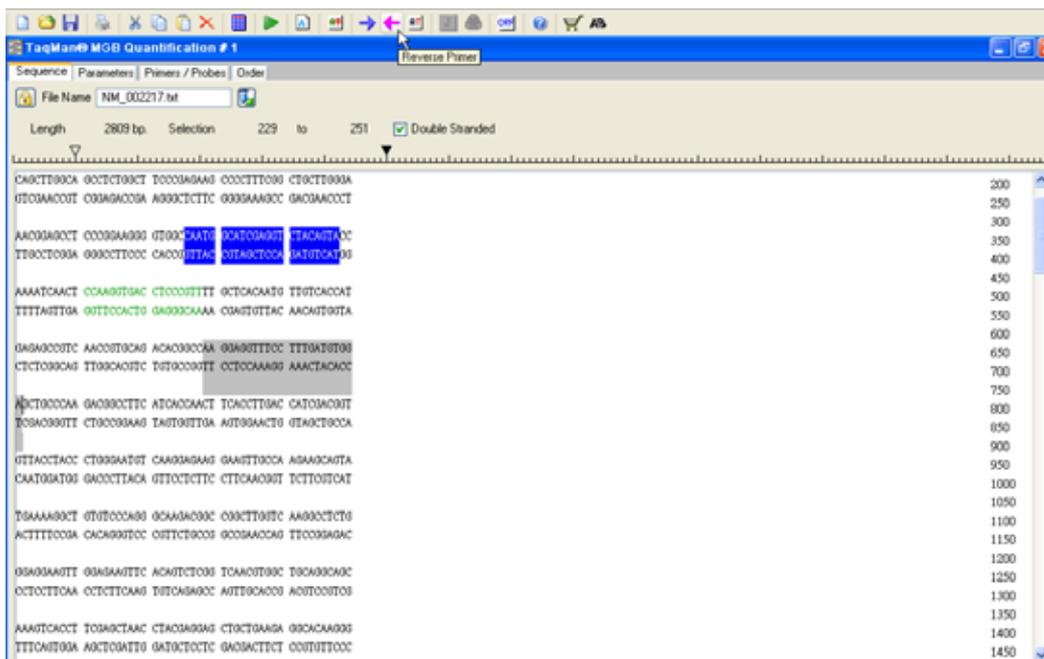
3. Reverse Primer 設計：

在”Sequence” Tab 中將預定的 Reverse 序列 highlight 起來(至少 25 bases 之長度，切勿與 Probe 序列重疊)後，然後利用 Edit →”Copy Complement”將序列貼到 Tools → Primer Probe Test Tool 中的 Rev Primer 欄位。

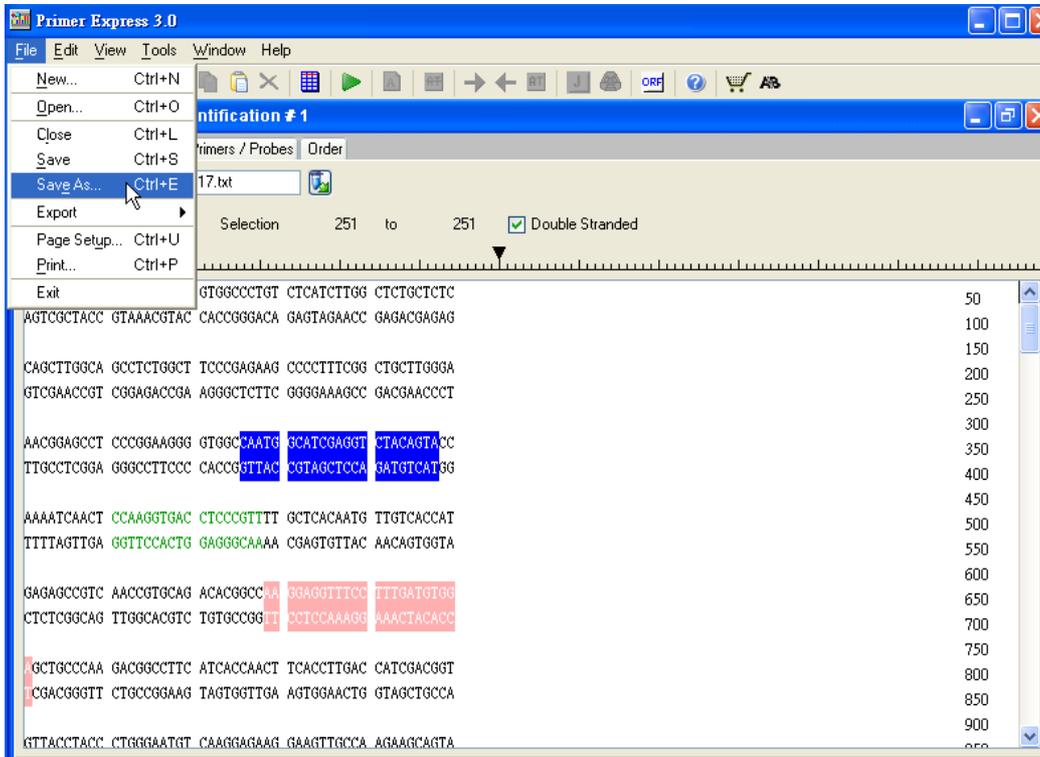


確認 Reverse Primer 的 Tm 值也能符合在 58-60°C，如果 Tm 值不符合，可直接在 Rev Primer 中框選不同的序列片段，並觀察右邊對應的 Tm, %GC 和長度，以找出最適當的 Primer (請參照 primer/probe design guideline)，若框選到適合的片段，點一下”Trim”，就可以將未框選的序列直接刪除，只留下需要的序列。

當 Rev Primer 序列確定之後，回到”Sequence” Tab 中將確定序列 highlight 起來，再利用 ”Reverse Primer” 固定起來，此時的 Rev Primer 位置會被標定成粉色。



決定 primer/ probe set 後可利用 Copy & Paste 功能轉貼到一個新的 text 檔，並 save 起來做為未來參考資料。另外，也可以把此次設計 document 進行存檔，存檔的方式從 File → Save As 存檔。

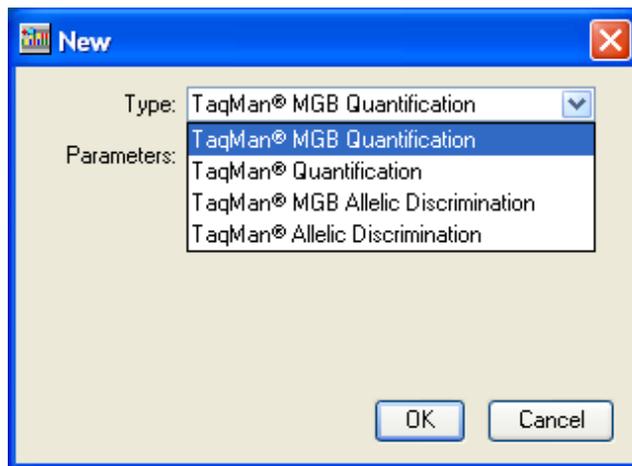


SYBR Green I Primer for Quantification

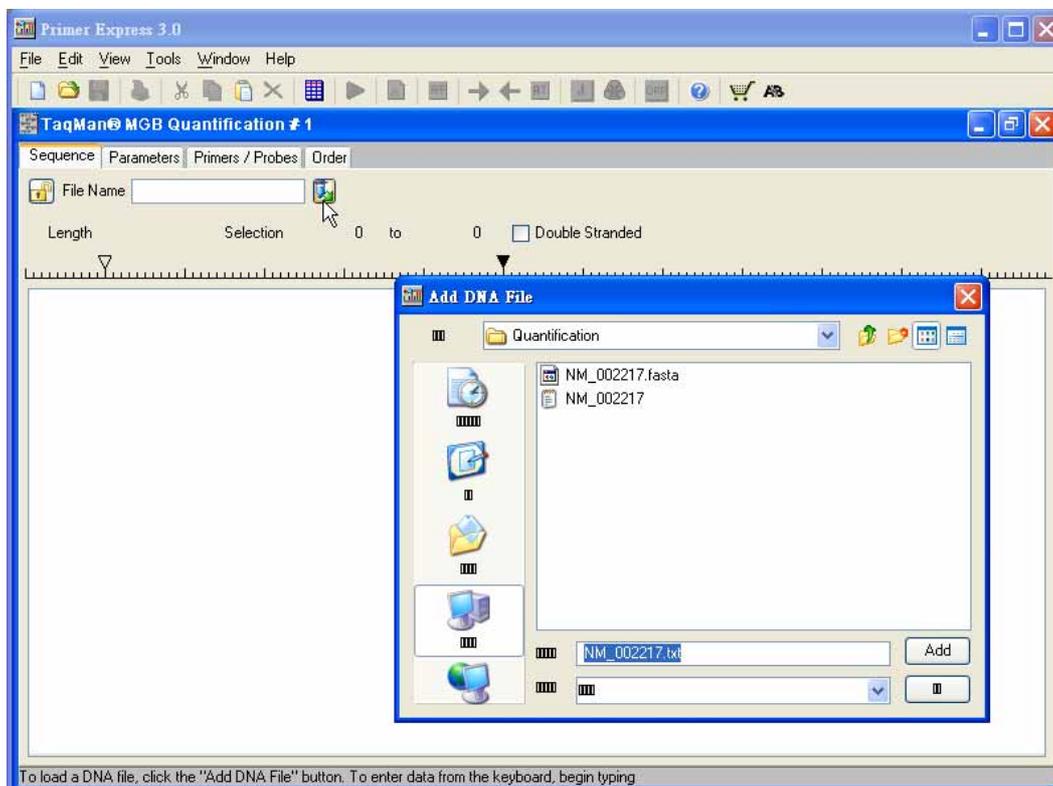
● Automatically Design

進入 Primer Express 3.0 軟體

File → New → 選擇“TaqMan MGB Quantification 或 TaqMan Quantification” → OK

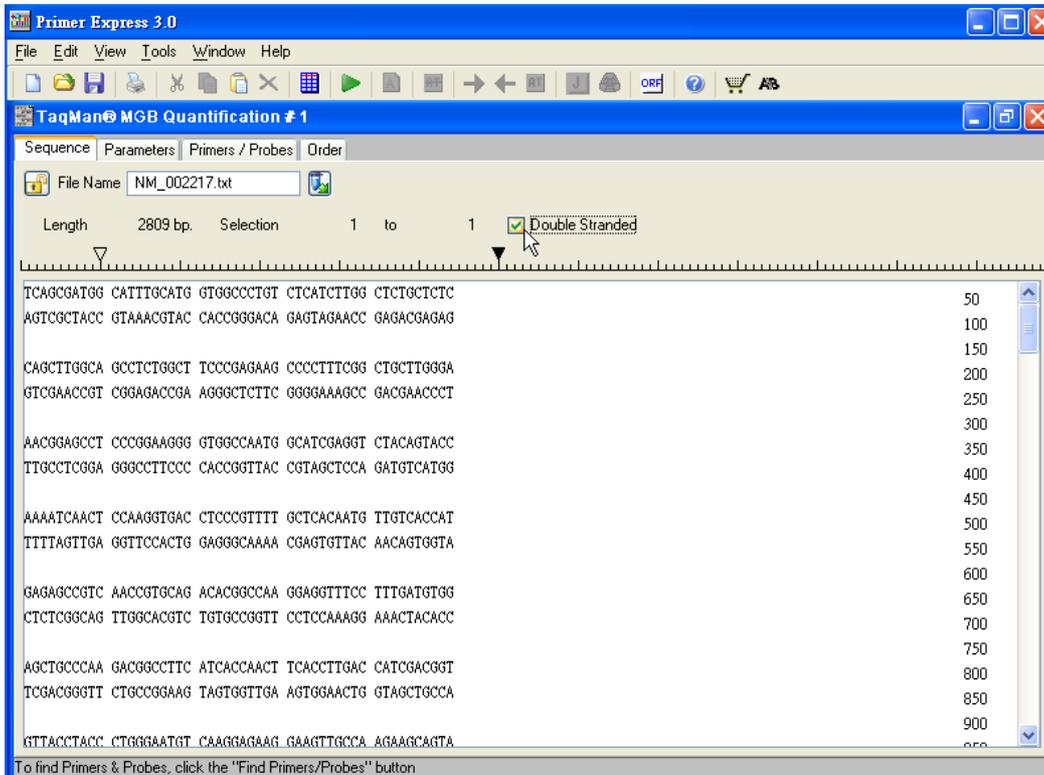


Tools → 按 “Add DNA File” ，尋找序列存取位置，按下”Add”，將序列檔案加入空白文件。亦可在”Sequence” Tab 中使用 Copy & Paste 轉貼或直接輸入序列。



* Primer Express Software 只能接受 .dan, .txt, .ab1, 或 .abi 的檔案格式，請事先將欲分析的序列存成純文字檔即可 (若序列是從 database download 下來時，請刪除與序列無關之資料)

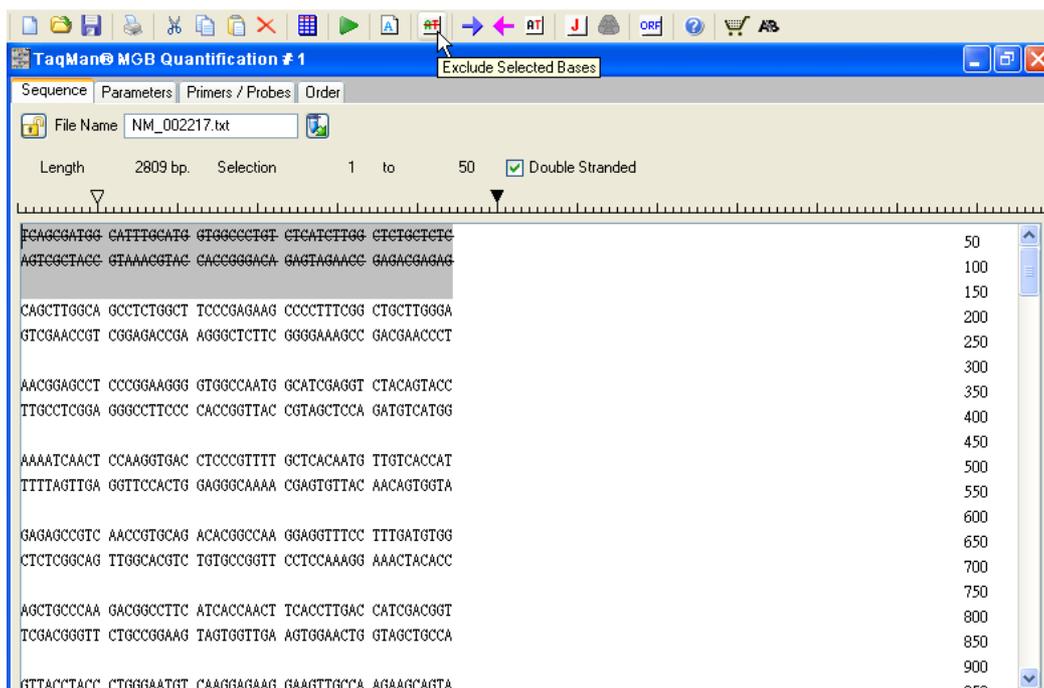
可勾選” Double Strand “，即會顯示 double stranded DNA sequence



Tools 上的選項

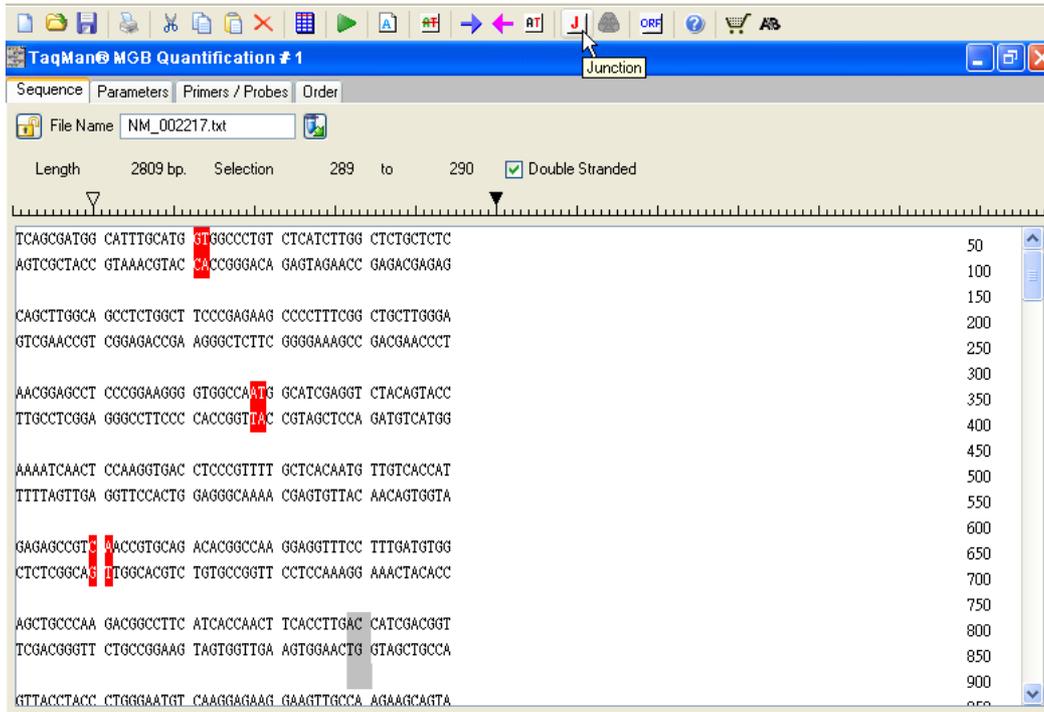
1. Exclude: 不必要的序列可利用”Exclude Selected Bases” 將序列刪掉

- 先選取不要的序列範圍，點選 “Exclude”，即可看見此區域被劃掉



2. **Junction:** 如果已經知道序列上 junction 位置則可利用”Junction” 

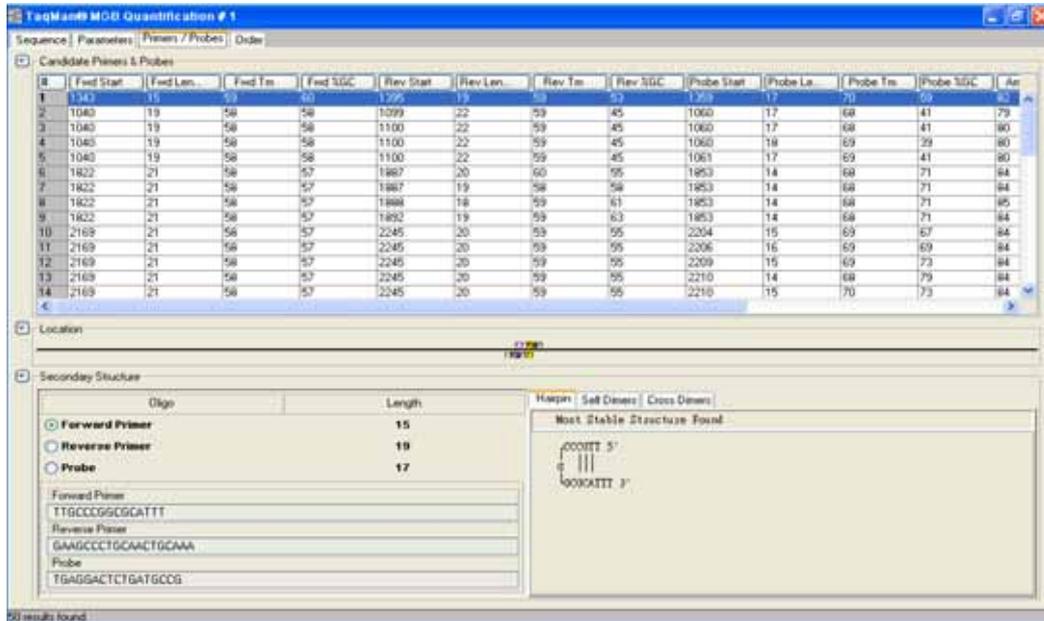
- 框選 junction 的位置(必須含 2 bases), 再點選 “Junction”, 即可看見此區域被紅色標記起來。



3. 在”Parameters” Tab 中可看到 Primer Tm 值設定及其他 Primers 設計之規範

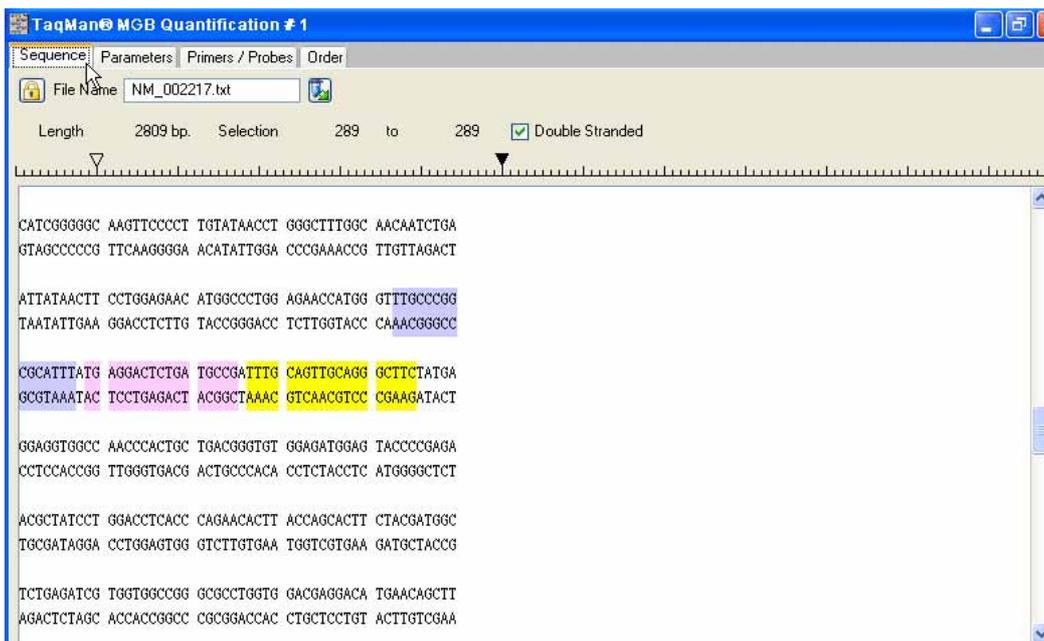
Parameter	Value
<input type="checkbox"/> Primer Tm	
Min Primer Tm	58
Max Primer Tm	60
Max Difference in Tm of Two Primers	2
<input type="checkbox"/> Primer GC Content	
Min Primer %GC Content	30
Max Primer %GC Content	80
Max Primer 3' GC's	2
Primer 3' End Length	5
Primer 3' GC Clamp Residues	0
<input type="checkbox"/> Primer Length	
Min Primer Length	9
Max Primer Length	40
Optimal Primer Length	20
<input type="checkbox"/> Primer Composition	
Max Primer G Repeats	3
Max Num Ambig Residues in Primer	0
<input type="checkbox"/> Primer Secondary Structure	
Max Primer Consec Base Pair	4
Max Primer Total Base Pair	8
<input type="checkbox"/> Primer Site Uniqueness	
Max % Match in Primer	75
Max Consec Match in Primer	9
Max 3' Consec Match in Primer	7

回到 "Sequence" Tab, Tools → Find Primers/Probes , 軟體即開始找尋適當的 Primers/Probe pairs



Primer Express 軟體會找到 Candidate Primers & Probe pairs, 一次 search 最多能找到 50 種組合, 這些組合列於 "Primers / Probes" Tab 中, **請注意若是進行 SYBR Green primer 設計, 不需看 probe 序列, 只需參考 primer 序列組合**。中間 "Location" 說明 primers & probes 在序列中的相對位置, 在橫線上方的數字代表起始位置, 橫線下方則代表終止位置。

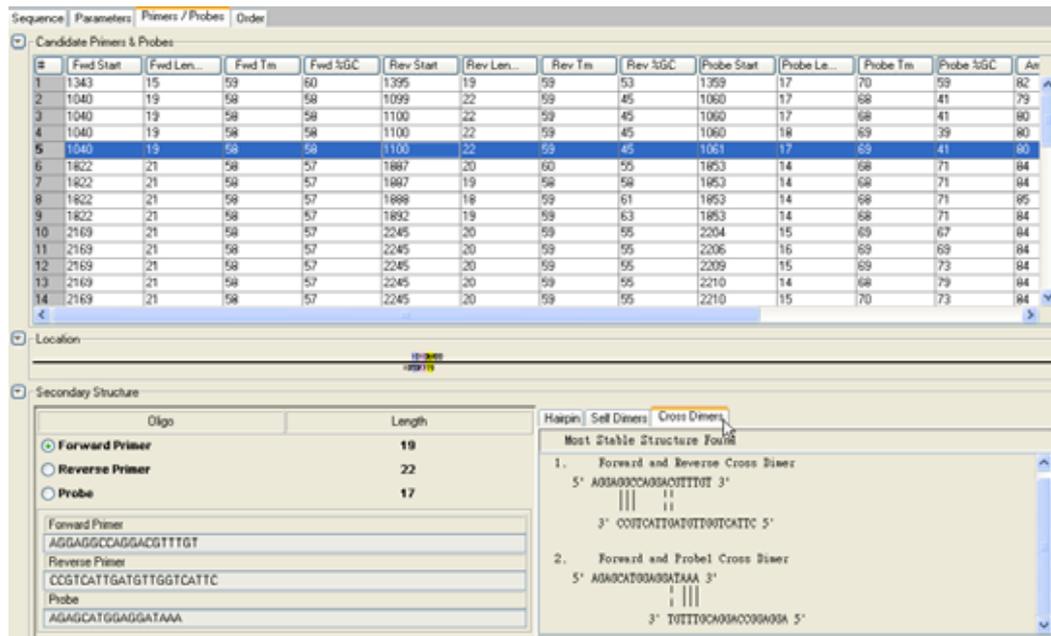
"Sequence" Tab 中會顯示出與 "Primers / Probes" Tab 相對應的一對 Primers/Probe: 粉紅色片段是 Probe 的位置, 藍色代表 Forward Primer, 黃色片段則為 Reverse Primer, 如下圖所示。(*但並不表示此為最佳的設計)



在 "Primers / Probes" Tab 中會將每對 Primers/Probe 的組合列出來，請從中挑選出適當的組合，挑選方式可依據第 2 頁 primer/ probe design guideline。

* SYBR Green primer 設計必須要注意避免有 primer dimer 的產生

-在 "Primers / Probes" Tab 中任選一組 primer set，從右下方來觀察 Primer Secondary Structure，則可得之 Hairpin, Self Dimers 及 Cross Dimers 的情況，選擇鍵結數越少越好的組合，其中又以 GC 的鍵結比例越少越好。



The screenshot shows the 'Candidate Primers & Probes' table with the following columns: #, Fwd Start, Fwd Len., Fwd Tm, Fwd %GC, Rev Start, Rev Len., Rev Tm, Rev %GC, Probe Start, Probe Len., Probe Tm, Probe %GC, and An. Row 5 is highlighted.

#	Fwd Start	Fwd Len.	Fwd Tm	Fwd %GC	Rev Start	Rev Len.	Rev Tm	Rev %GC	Probe Start	Probe Len.	Probe Tm	Probe %GC	An
1	1343	15	59	60	1395	19	59	53	1359	17	70	59	82
2	1040	19	58	58	1099	22	59	45	1060	17	68	41	79
3	1040	19	58	58	1100	22	59	45	1060	17	68	41	80
4	1040	19	58	58	1100	22	59	45	1060	18	69	39	80
5	1040	19	58	58	1100	22	59	45	1061	17	69	41	80
6	1822	21	58	57	1887	20	60	55	1853	14	68	71	84
7	1822	21	58	57	1887	19	58	58	1853	14	68	71	84
8	1822	21	58	57	1888	18	59	61	1853	14	68	71	85
9	1822	21	58	57	1892	19	59	63	1853	14	68	71	84
10	2169	21	58	57	2245	20	59	55	2204	15	69	67	84
11	2169	21	58	57	2245	20	59	55	2206	16	69	69	84
12	2169	21	58	57	2245	20	59	55	2209	15	69	73	84
13	2169	21	58	57	2245	20	59	55	2210	14	68	79	84
14	2169	21	58	57	2245	20	59	55	2210	15	70	73	84

The 'Secondary Structure' section shows the following oligo lengths: Forward Primer (19), Reverse Primer (22), and Probe (17). The 'Cross Dimers' tab is selected, showing the 'Most Stable Structure Found' as a Forward and Reverse Cross Dimer:

```

1. Forward and Reverse Cross Dimer
5' AGGAGGCCAGGACGTTTGT 3'
   |||
3' CCGTCATTGATGTTGGTCATTC 5'
  
```

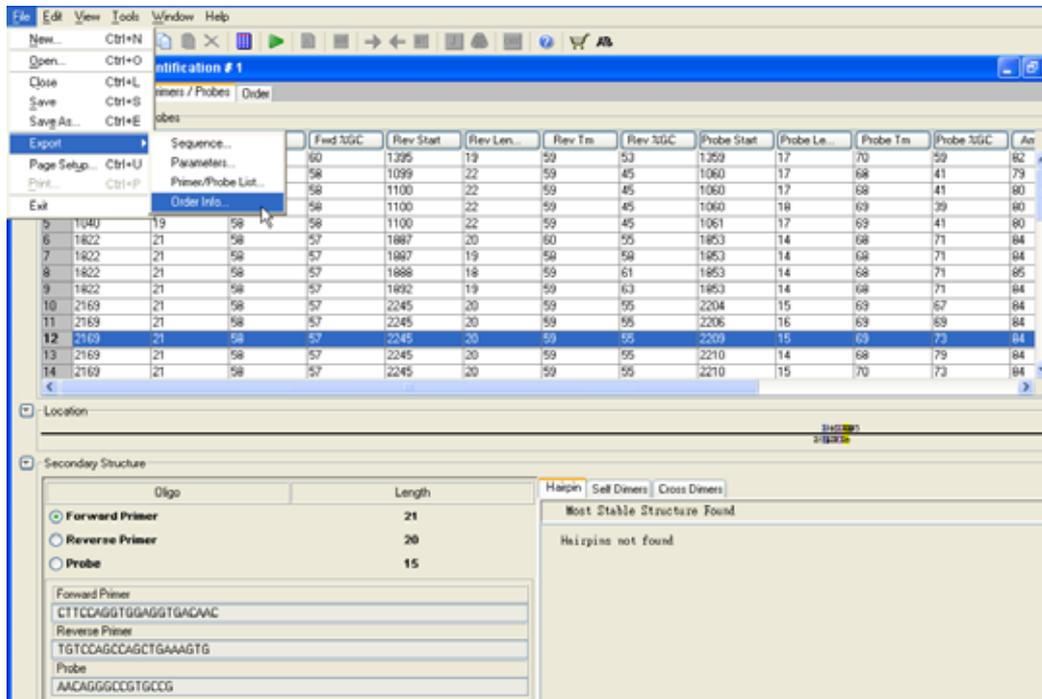
Another structure shown is a Forward and Probe Cross Dimer:

```

2. Forward and Probe Cross Dimer
5' AGGAGGCCAGGACGTTTGT 3'
   |||
3' TTTTCCAGGACGTTTGT 5'
  
```

決定 primers set 之後則可進行存檔，存檔的方式從 File → Save As 存檔。

如果想將所選擇的 primers set 單獨儲存，可利用 Export → Order Info...的方式，或者要儲存 50 個 Primers/Probes 清單，可點選 Export → Primers/Probes List...，以上兩種方式都可存成.txt 檔案，在 Excel 中開啟。



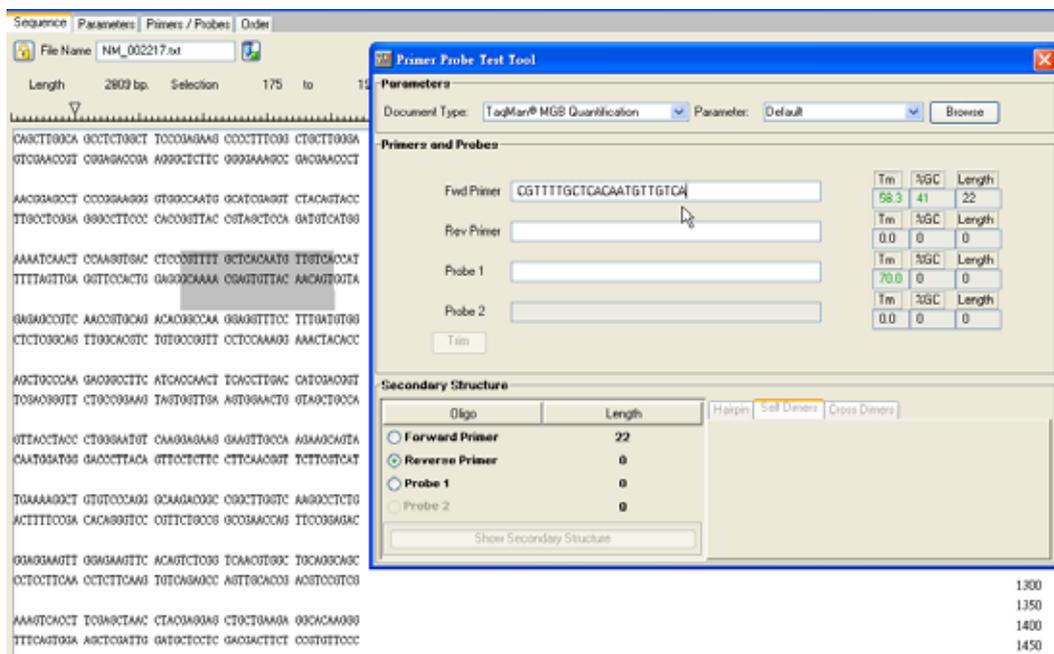
● Manually Design

當軟體無法自動尋找到 Primer 組合時，先確定 Primer 想要置放的位置

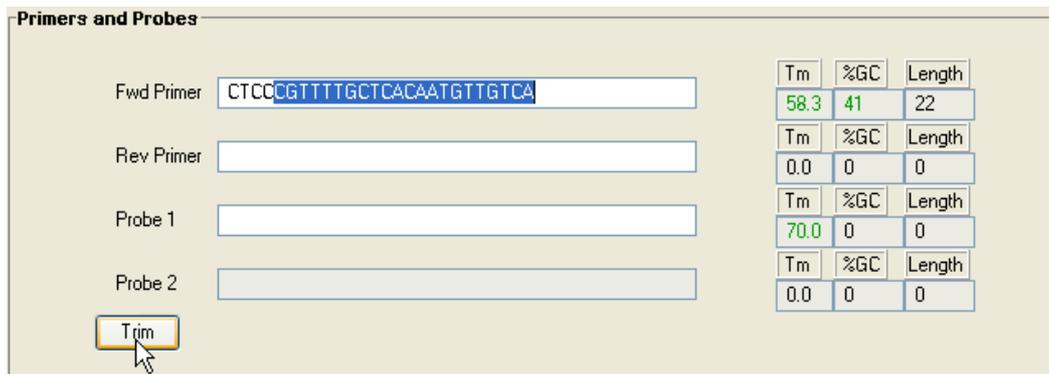
開啟一個新的 **Quantification** Document，並把欲設計的序列檔案加入（參照第 13 頁）。

1. Forward Primer 設計：

在”Sequence” Tab 中將預定 Primer 序列 highlight 起來(至少 25 bases 之長度，長度依序列結構而定)後，先利用 Edit 中 Copy (Ctrl+C)之功能複製序列，再依下圖至 Tools → Primer Probe Test Tool 中，選擇欲設計的 document type (即”TaqMan MGB Quantification 或 TaqMan Quantification”)，並確認 Parameter 設定為”Default”，利用 Paste (Ctrl+V) 將序列貼在 Fwd Primer 欄位，從右邊即可觀察測試序列之 Tm, %GC 和長度是否合適。

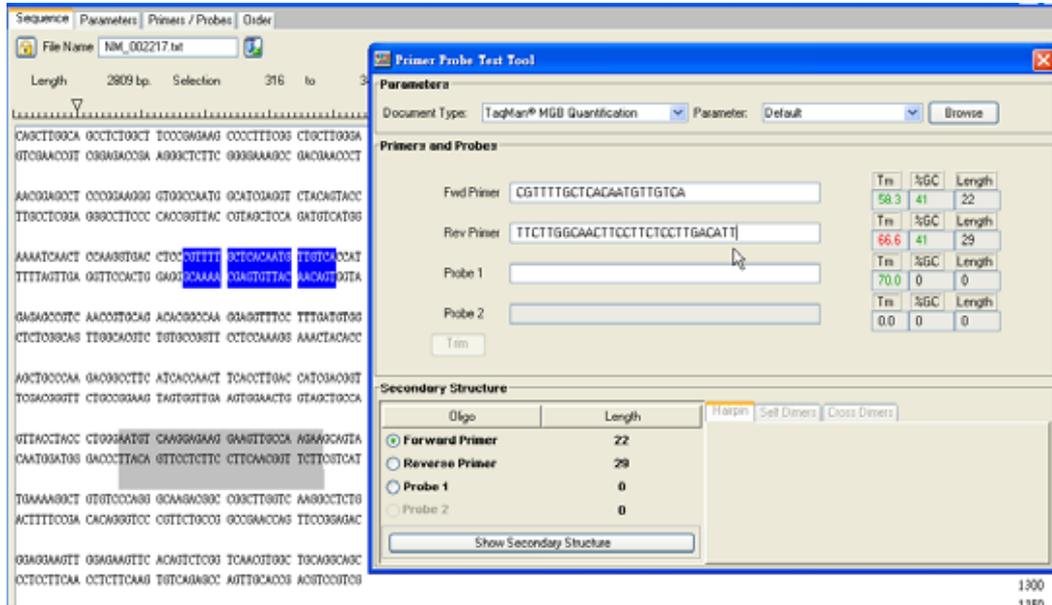


確認 Forward Primer 的 Tm 值在 58-60°C，如果 Tm 值不符合，可直接在 Fwd Primer 中框選不同的序列片段，並觀察右邊對應的 Tm, %GC 和長度，以找出最適當的 Primer (請參照 primer/ probe design guideline)，若框選到適合的片段，點一下”Trim”，就可以將未框選的序列直接刪除，只留下需要的序列。

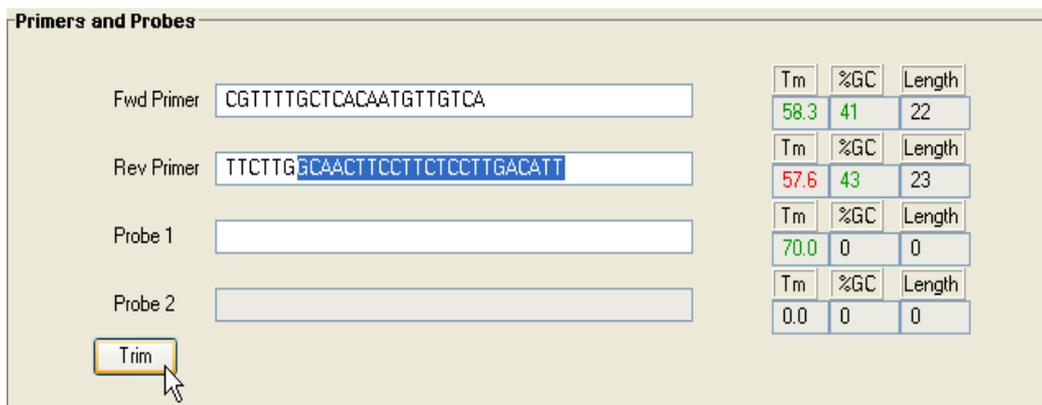


2. Reverse Primer 設計:

在"Sequence" Tab 中將預定的 Reverse 序列 highlight 起來(至少 25 bases 之長度,長度依序列結構而定)後,然後利用 Edit →"Copy Complement"將序列貼到 Tools → Primer Probe Test Tool 中的 Rev Primer 欄位。

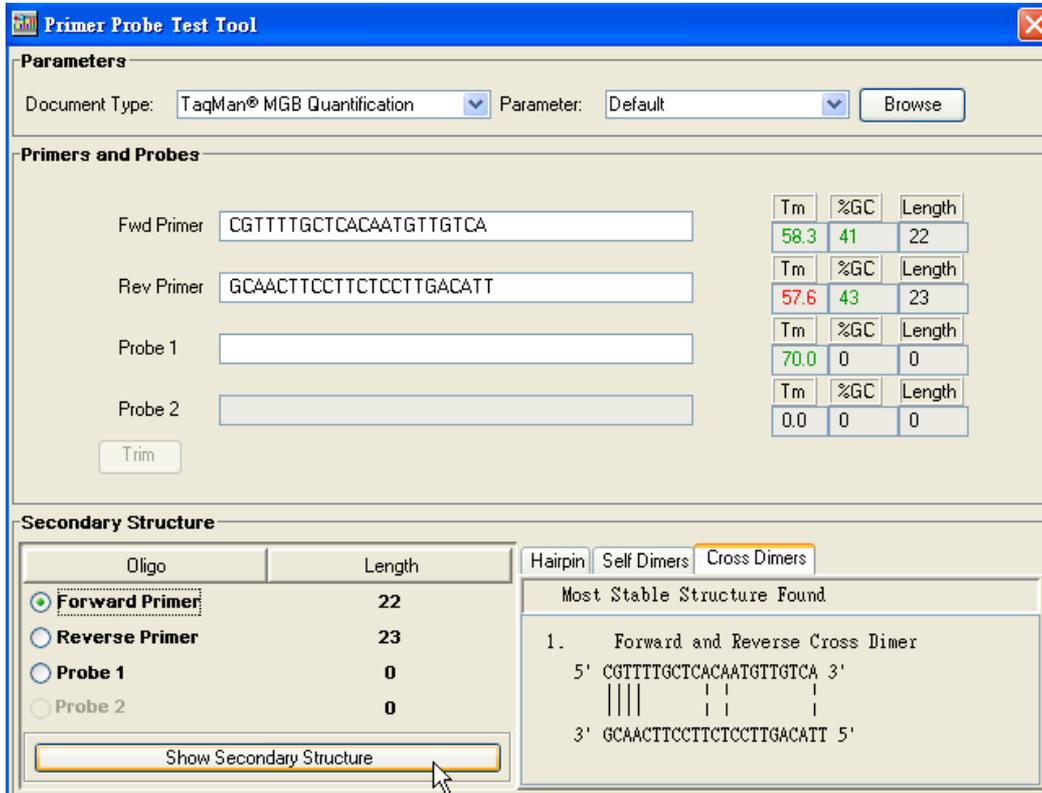


確認 Reverse Primer 的 Tm 值也能符合在 58-60°C, 如果 Tm 值不符合, 可直接在 Rev Primer 中框選不同的序列片段, 並觀察右邊對應的 Tm, %GC 和長度, 以找出最適當的 Primer (請參照 primer/probe design guideline), 若框選到適合的片段, 點一下"Trim", 就可以將未框選的序列直接刪除, 只留下需要的序列。



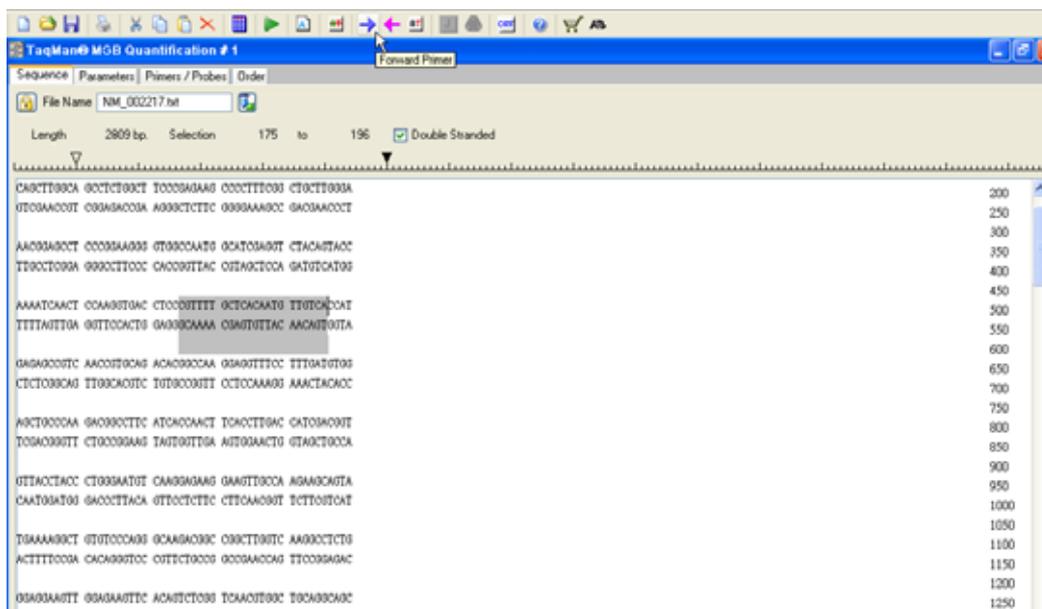
3. 在 SYBR Green primer 設計中必須要注意避免有 primer dimer 的產生

-在 Primer Probe Test Tool 中選定 primer set 後，點選 "Show Secondary Structure"，即可從右下方來觀察此組 Primers 的二級結構，如 Hairpin, Self Dimers 及 Cross Dimers 的情況，避免鍵結數太多，其中又以 GC 的鍵結比例越少越好，如果此組 primer 二級結構嚴重，請重新尋找適當位點。

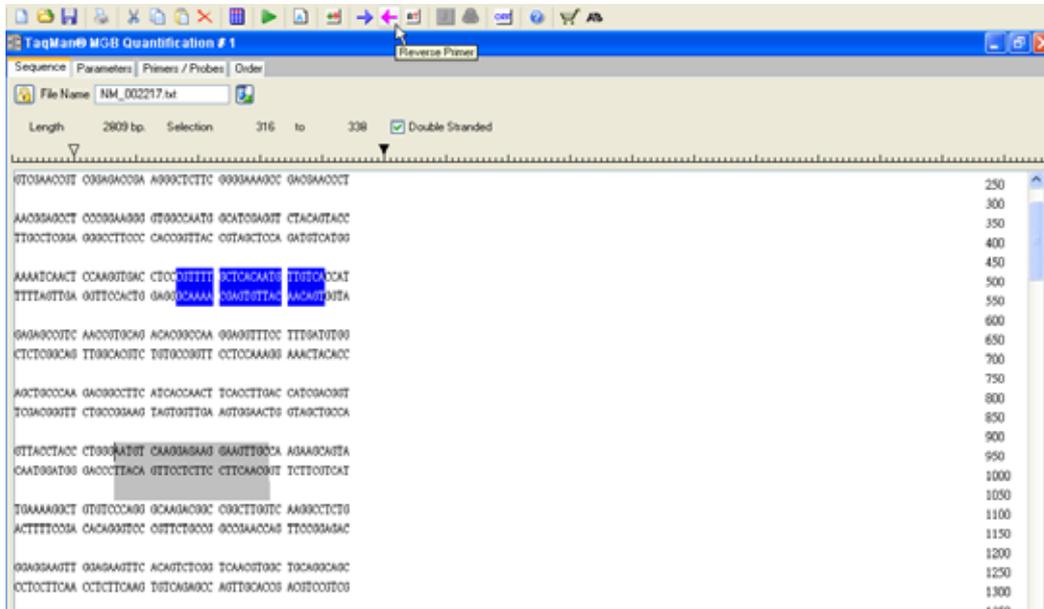


當 Fwd Primer 序列確定之後，回到 "Sequence" Tab 中將確定序列 highlight 起來，再利用 "Forward

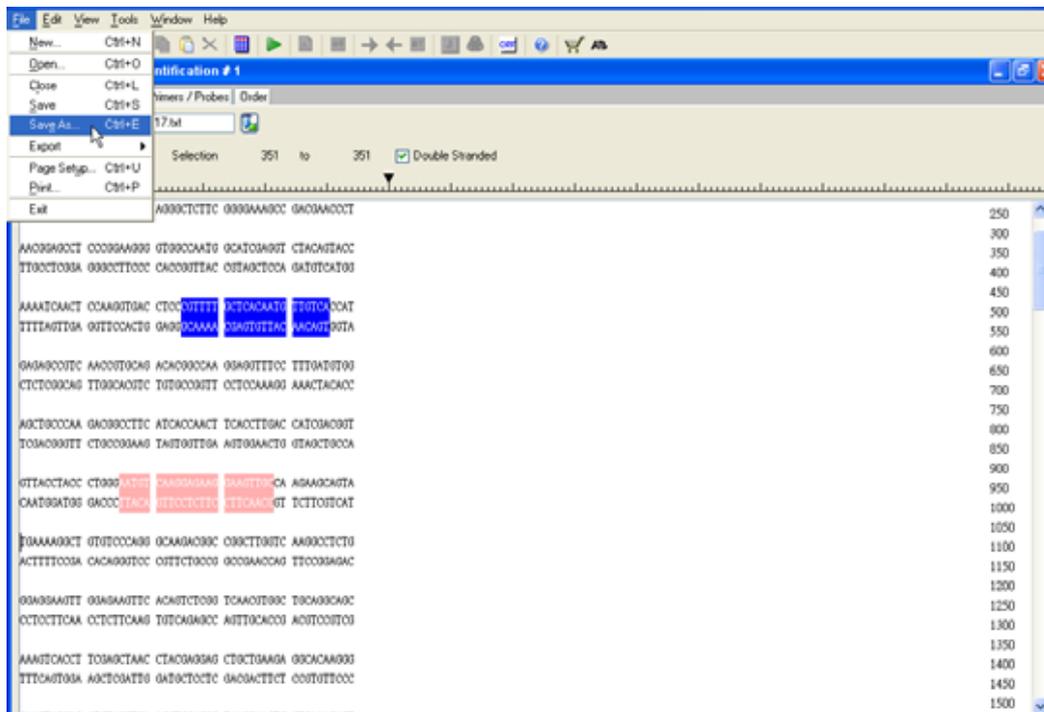
Primer" 固定起來，此時的 Fwd Primer 位置會被標定成藍色。



當 Rev Primer 序列確定之後，回到”Sequence” Tab 中將確定序列 highlight 起來，再利用 ”Reverse Primer”  固定起來，此時的 Rev Primer 位置會被標定成粉色。



決定 primer/ probe set 後可利用 Copy & Paste 功能轉貼到一個新的 text 檔，並 save 起來做為未來參考資料。另外，也可以把此次設計 document 進行存檔，存檔的方式從 File → Save As 存檔。



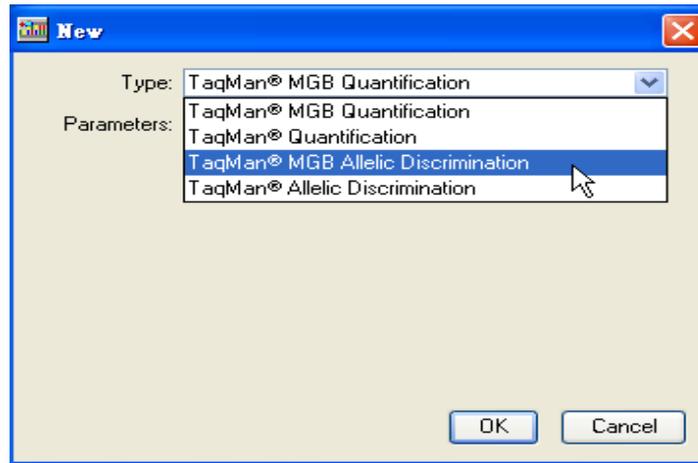
Primers & Probes for Allelic Discrimination

● Automatically Design

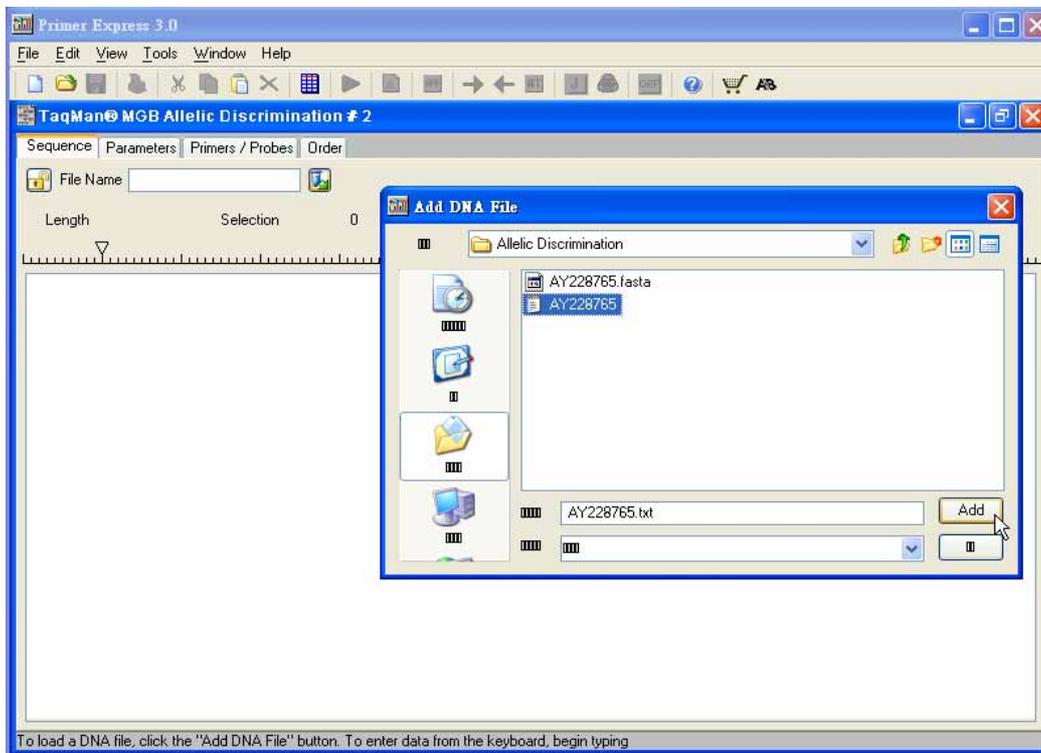
進入 Primer Express 3.0 軟體

File → New → 選擇“**TaqMan MGB Allelic Discrimination** 或 **TaqMan Allelic Discrimination**” → OK。

建議使用 **TaqMan MGB probe** 設計，以達到更佳效果。



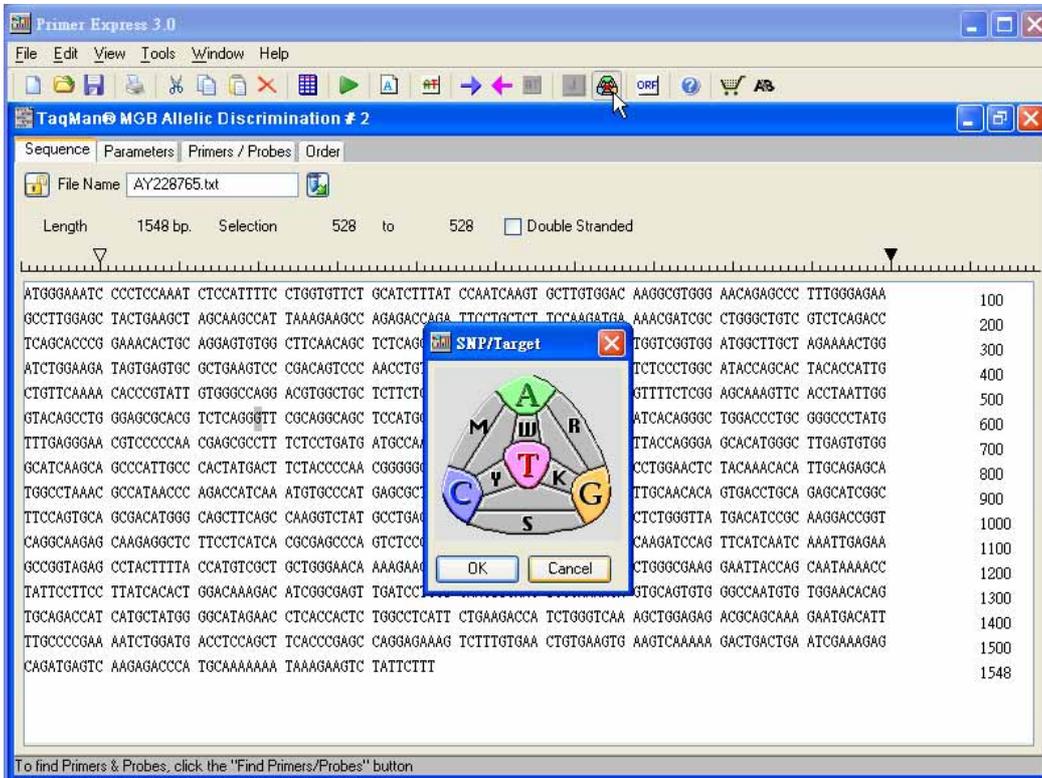
Tools → 按 “Add DNA File” ，尋找序列存取位置，按下”Add”，將序列檔案加入空白文件。亦可在”Sequence” Tab 中使用 Copy & Paste 轉貼或直接輸入序列。



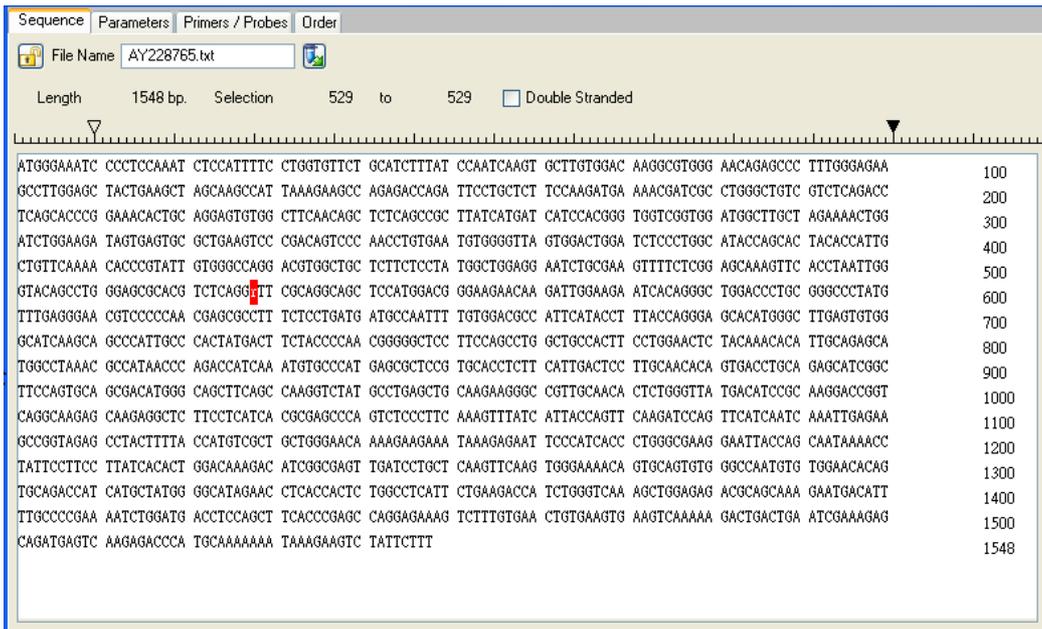
* Primer Express Software 只能接受 .dan, .txt, .ab1, 或 .abi 的檔案格式，請事先將欲分析的序列存成純文字檔即可 (若序列是從 database download 下來時，請刪除與序列無關之資料)

標定 SNP 位點

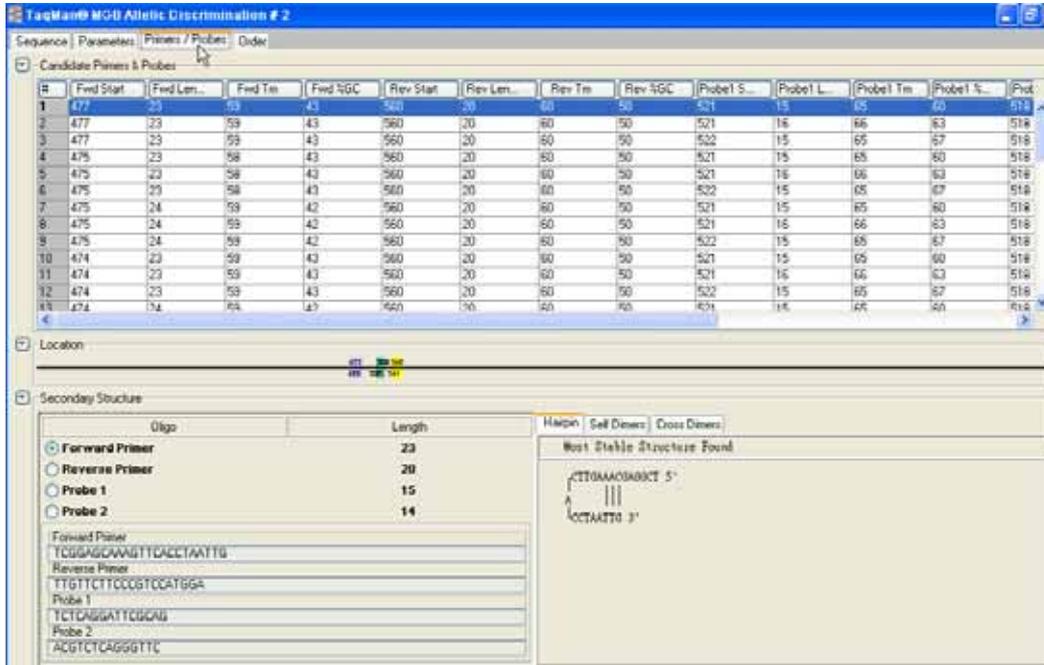
將 SNP 位點 highlight，Edit → Annotate → “SNP Target” ，選擇此 SNP 位點的變異型(variant)。



例如：在 528 位置是 G/A 的 SNP，點選 G 和 A 之間的”R”，然後按下 OK，SNP 位點即被標定成紅色小寫的 r。

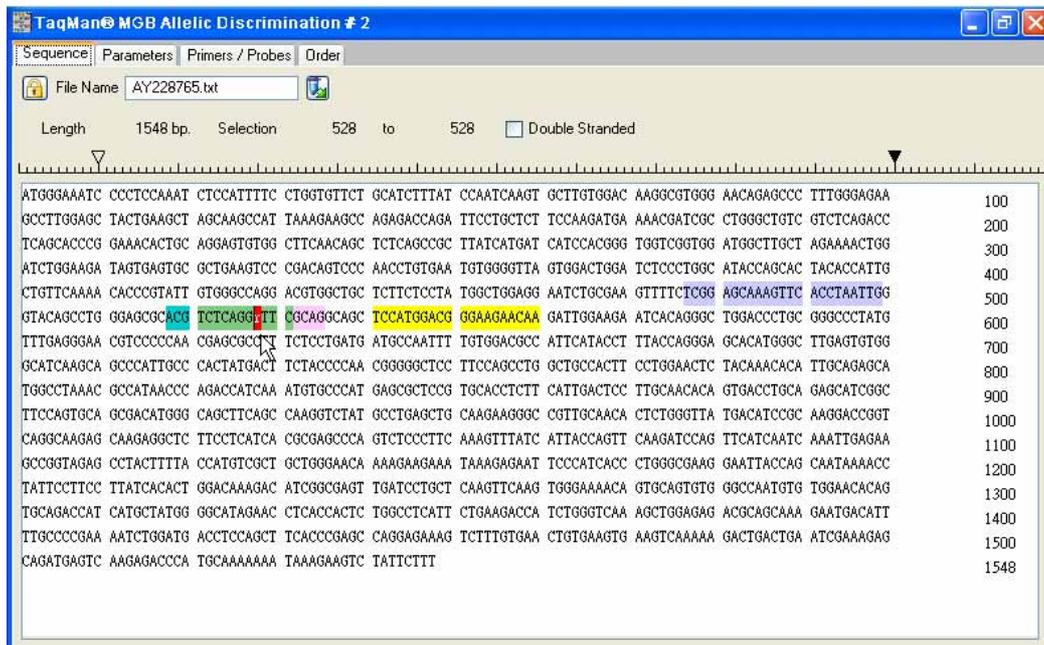


Tools → Find Primers/Probes ，軟體即開始找尋適當的 Primers/Probes pairs



Primer Express 軟體會找到 Candidate Primers & Probes pairs，一次 search 最多能找到 50 種組合，這些組合列於”Primers / Probes” Tab 中。中間”Location”說明 primers & probes 在序列中的相對位置，在橫線上方的數字代表起始位置，橫線下方則代表終止位置。

”Sequence” Tab 中會顯示出與”Primers / Probes” Tab 相對應的一對 Primers/Probes: 粉紅色片段是 Probe 1 的位置，綠色片段則代表 Probe 2 的位置(2 個 Probe 重疊的序列會呈現綠色)，藍色代表 Forward Primer，黃色片段則為 Reverse Primer，如下圖所示。(*但並不表示此為最佳的設計)

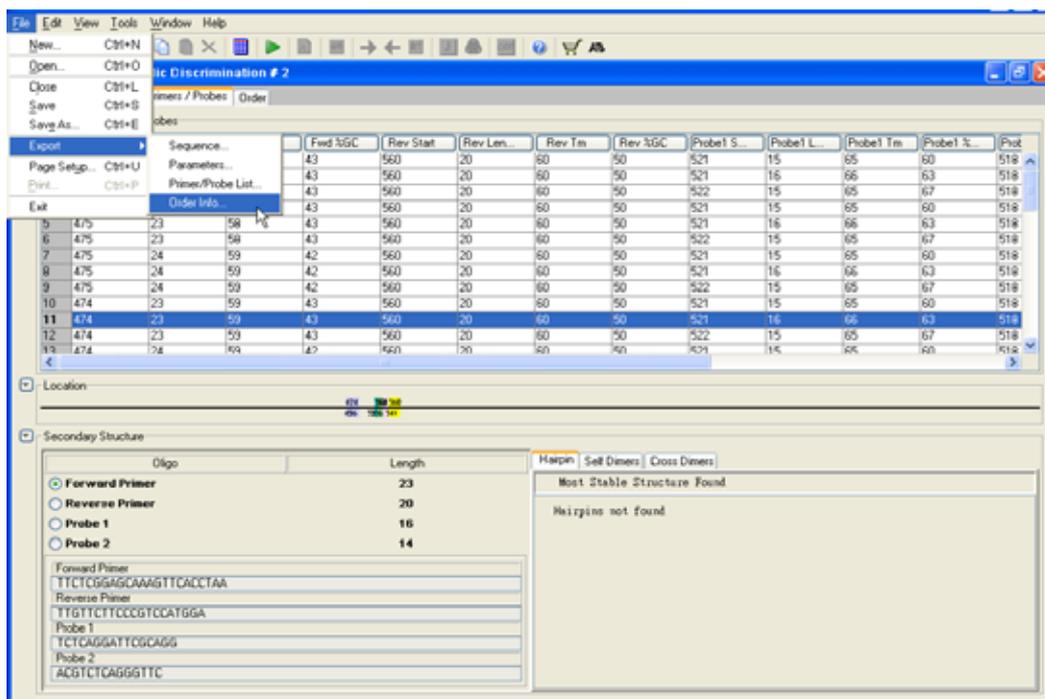


在 "Primers / Probes" Tab 中會將每對Primers/Probe的組合列出來，請從中挑選出適當的組合，挑選方式可依據第 2 頁 primer/ probe design guideline。在MGB Probe的篩選中，亦可在"Parameters" Tab 中加選"C"比"G"多的序列作為進一步篩選的參數。

Parameter	Value
Max Primer G Repeats	3
Max Num Ambig Residues in Primer	0
<input type="checkbox"/> Primer Secondary Structure	
Max Primer Consec Base Pair	4
Max Primer Total Base Pair	8
<input type="checkbox"/> Primer Site Uniqueness	
Max % Match in Primer	75
Max Consec Match in Primer	9
Max 3' Consec Match in Primer	7
<input type="checkbox"/> Probe Tm	
Min Probe Tm	68
Max Probe Tm	70
<input type="checkbox"/> Probe GC Content	
Min Probe %GC Content	30
Max Probe %GC Content	80
<input type="checkbox"/> Probe Length	
Min Probe Length	13
Max Probe Length	25
<input type="checkbox"/> Probe Composition	
Max Probe G Repeats	3
Max Num Ambig Residues in Probe	0
No G at 5' End in Probe	<input checked="" type="checkbox"/>
Select Probe with more C's than G's	<input checked="" type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Probe Secondary Structure	
Max Probe Consec Base Pair	4
Max Probe Total Base Pair	8
<input type="checkbox"/> Amplicon	
Min Amplified Region Tm	0
Max Amplified Region Tm	85
Min Amplified Region Length	50
Max Amplified Region Length	150
<input type="checkbox"/> General	
Max Primers / Probes	50

決定 primer/ probe set 之後則可進行存檔，存檔的方式從 File → Save As 存檔。

如果想將所選擇的 primer/ probe set 單獨儲存，可利用 Export → Order Info...的方式，或者要儲存 50 個 Primers/Probes 清單，可點選 Export →Primers/Probes List...，以上兩種方式都可存成.txt 檔案，在 Excel 中開啟。



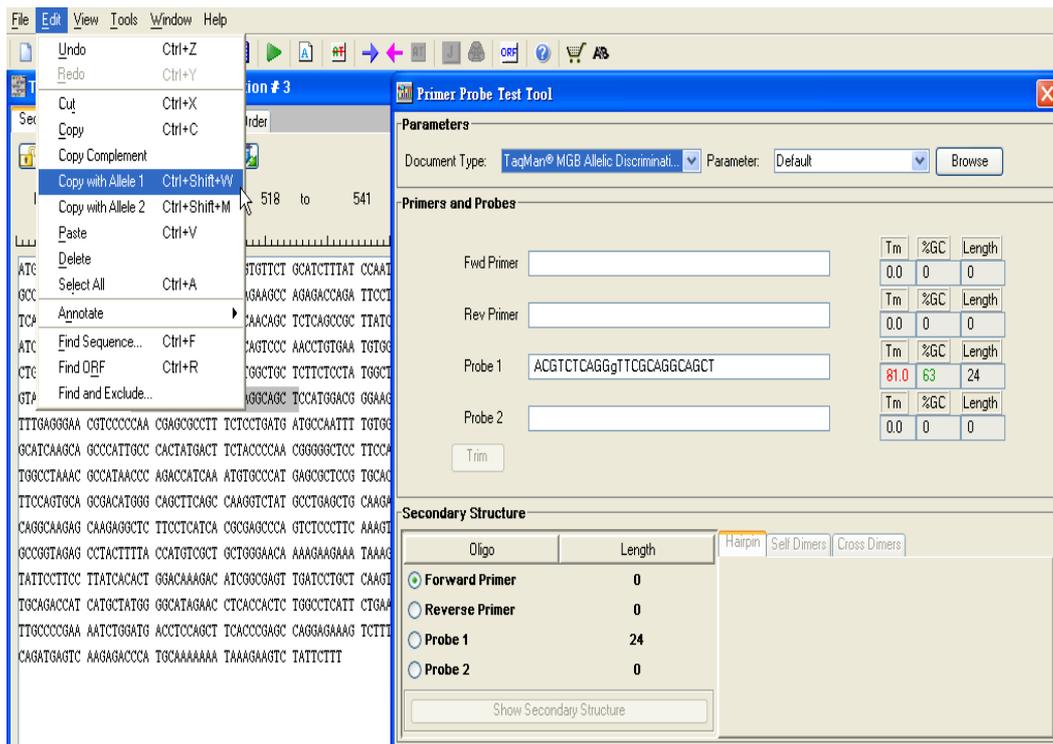
● Manually Design

當軟體無法自動尋找到 Primer/Probe 組合時，先確定 Primer/Probe 想要置放的位置
開啟一個新的 Allelic Discrimination Document，並把欲設計的序列檔案加入(參照第 23 頁)。

1. 設計 Probe for Allele 1:

在"Sequence" Tab 中，將 SNP 位點 highlight 起來，Edit → Annotate → 按 "SNP Target" ，然後選擇此 SNP 位點的變異型(請參照第 24 頁)。將 Probe1 之預定序列 highlight 起來(大約 13~25 bases 之長度)後，先利用 Edit 中 Copy with Allele 1 (Ctrl+Shift+W) 之功能複製序列，再至 Tools→Primer Probe Test Tool 中，選擇欲設計的 document type (即"TaQMan MGB Allelic Discrimination 或 TaQMan Allelic Discrimination")，並確認 Parameter 設定為"Default"，再利用 Paste (Ctrl+V) 將序列貼在 Probe1 欄位，此時 Allele 1 variant base 變成小寫的字體 (此例變成"q")，從右邊即可觀察測試序列之 Tm, %GC 和長度是否合適。

註: probe 第一個序列不能為 G，且序列裡面 C 的數目要比 G 還要多



The screenshot shows the 'Primer Probe Test Tool' window. In the 'Parameters' section, 'Document Type' is set to 'TaqMan® MGB Allelic Discrimination' and 'Parameter' is 'Default'. Under 'Primers and Probes', the 'Probe 1' field contains the sequence 'ACGTCTCAGGgTTTCGAGGCAGCT'. To the right of this field is a table with columns 'Tm', '%GC', and 'Length'. The values for 'Probe 1' are Tm: 81.0, %GC: 63, and Length: 24. Below this, the 'Secondary Structure' section has a table with columns 'Oligo' and 'Length'. It lists 'Forward Primer' (Length: 0), 'Reverse Primer' (Length: 0), 'Probe 1' (Length: 24), and 'Probe 2' (Length: 0). A 'Show Secondary Structure' button is at the bottom of this section.

此時若 Tm 超過設定值(65°C to 67°C)，可直接在 Probe 1 欄位中框選不同的序列片段，並觀察右邊對應的 Tm, %GC 和長度，以找出最適當的 Probe (請參照 primer/ probe design guideline)。若框選到適合的片段，點一下”Trim”，就可以將未框選的序列直接刪除，而留下需要的 Probe 序列。

Parameters

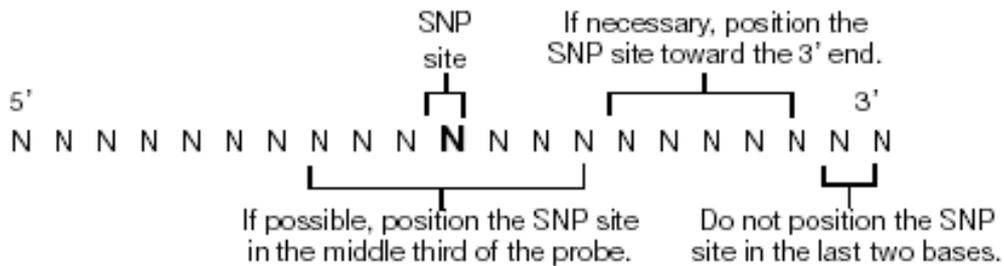
Document Type: Parameter:

Primers and Probes

	Tm	%GC	Length
Fwd Primer <input type="text"/>	0.0	0	0
Rev Primer <input type="text"/>	0.0	0	0
Probe 1 <input type="text" value="ACGTCTCAGGgTTCGAGGCAGCT"/>	67.0	57	14
Probe 2 <input type="text"/>	0.0	0	0

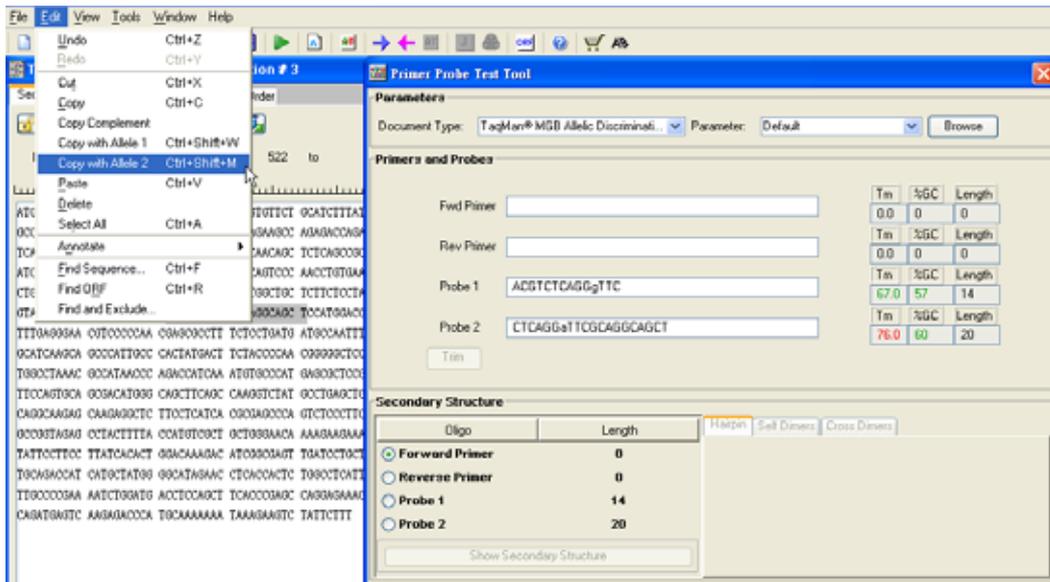
SNP 位點置放

請將 SNP 位點置於 Probe 序列 **中間三分之一** 的區域或從 **中間到 3'端最後 2 個 base 之前** 的區域，不能置放在最後兩個 base，如下圖：

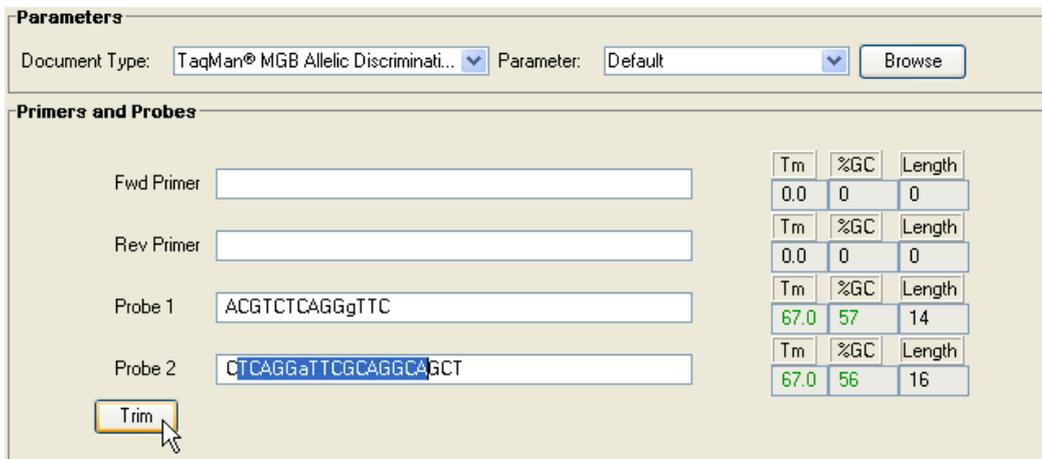


2. 設計 Probe for Allele 2:

在"Sequence" Tab 中，將 Probe2 之預定序列 highlight 起來(大約 13~25 bases 之長度)後，先利用 Edit 中 **Copy with Allele 2** (Ctrl+Shift+M) 之功能複製序列，再至 Tools→ Primer Probe Test Tool 中，利用 Paste (Ctrl+V) 將序列貼在 Probe2 欄位，此時 Allele 2 variant base 變成小寫的字體 (此例變成"a")，從右邊即可觀察測試序列之 Tm, %GC 和長度是否合適。

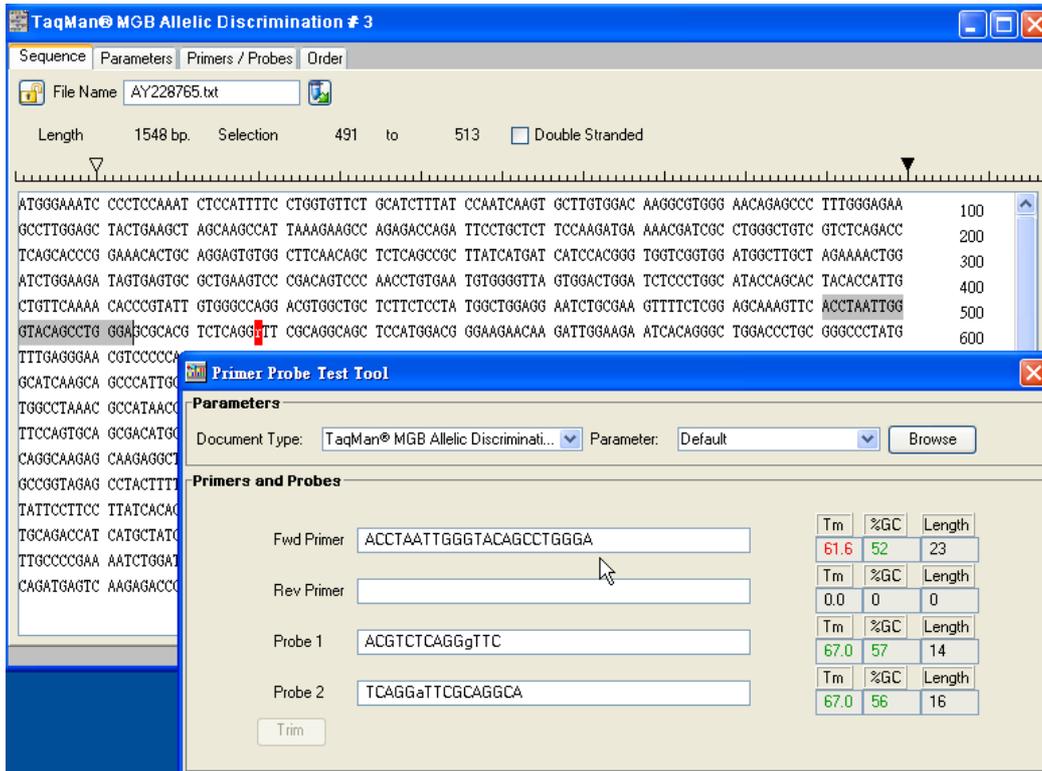


此時若 Tm 超過設定值(65°C to 67°C)，可直接在 Probe 1 欄位中框選不同的序列片段，並觀察右邊對應的 Tm, %GC 和長度，以找出最適當的 Probe (請參照 primer/probe design guideline)。若框選到適合的片段，點一下"Trim"，就可以將未框選的序列直接刪除，而留下需要的 Probe 序列。**注意 probe1 和 probe2 之間的 Tm 值差異不能超過 1°C 以上。**

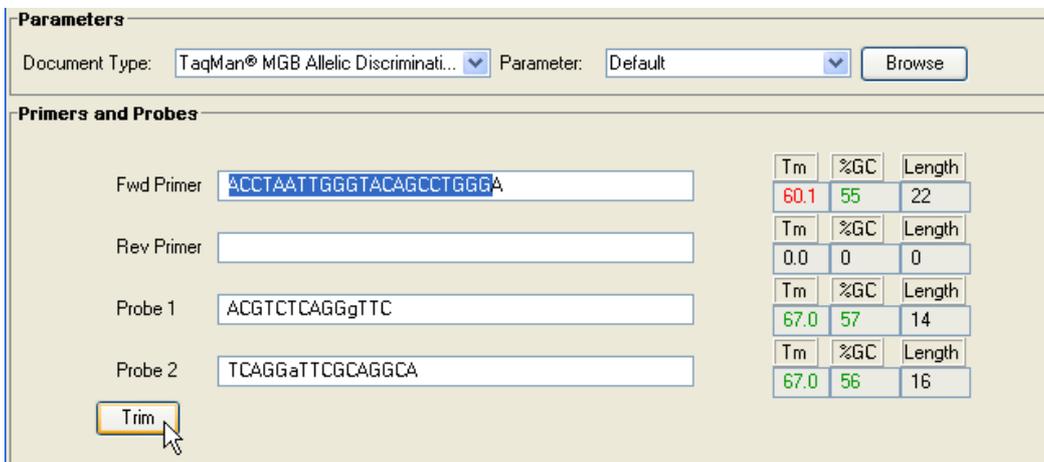


3. Forward Primer 設計:

在”Sequence” Tab 中將預定 Primer 序列 highlight 起來(至少 25 bases 之長度，切勿與 Probe 序列重疊)後，先利用 Edit 中 Copy (Ctrl+C)之功能複製序列，再依下圖至 Tools → Primer Probe Test Tool 中，利用 Paste (Ctrl+V) 將序列貼在 Fwd Primer 欄位，從右邊即可觀察測試序列之 Tm, %GC 和長度是否合適。

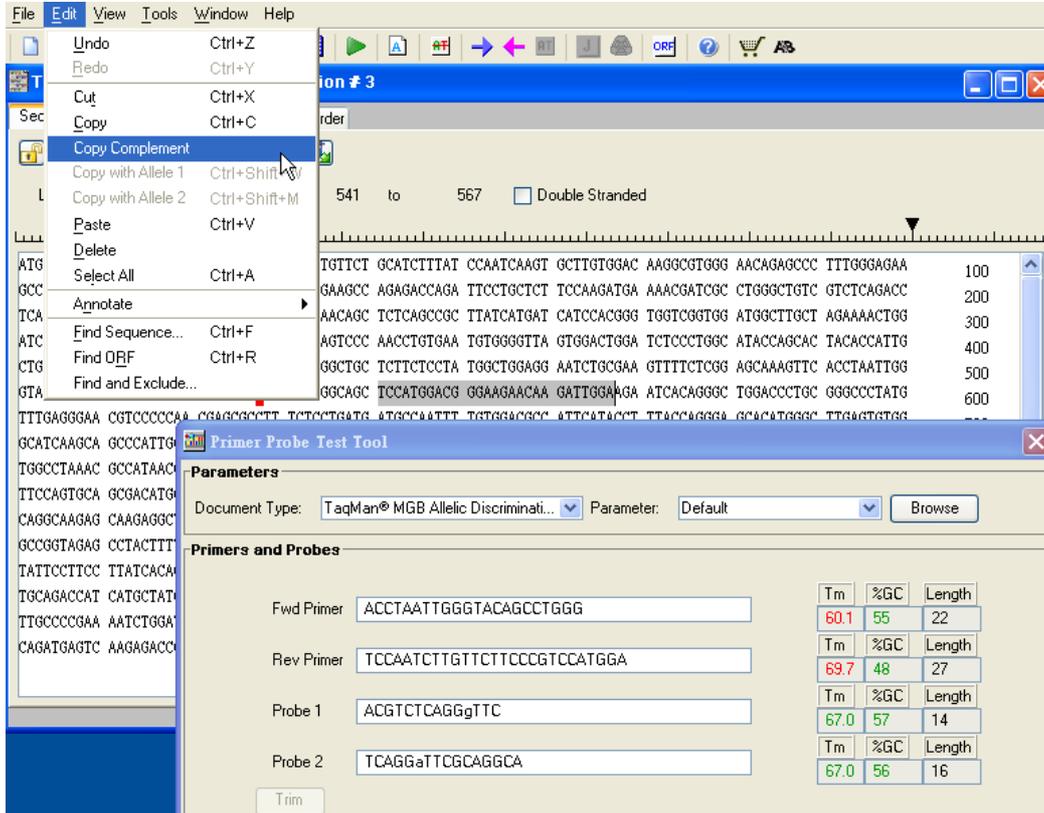


確認 Forward Primer 的 Tm 值在 58-60°C，如果 Tm 值不符合，可直接在 Fwd Primer 中框選不同的序列片段，並觀察右邊對應的 Tm, %GC 和長度，以找出最適當的 Primer (請參照 primer/ probe design guideline)，若框選到適合的片段，點一下”Trim”，就可以將未框選的序列直接刪除，只留下需要的序列。



4. Reverse Primer 設計:

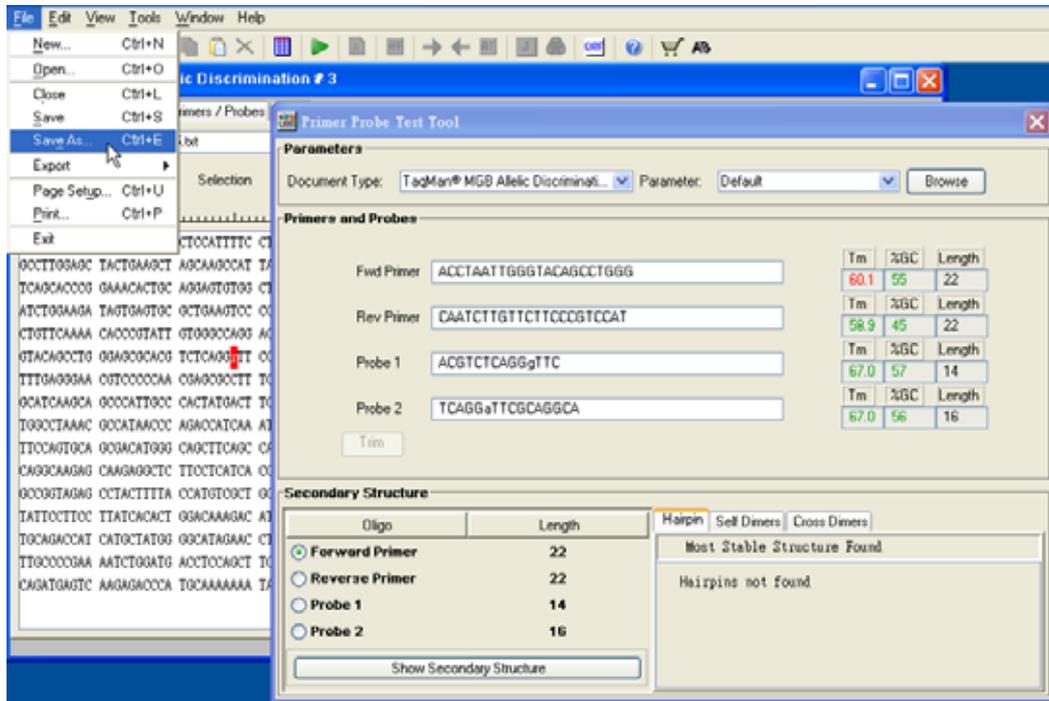
在”Sequence” Tab 中將預定的 Reverse 序列 highlight 起來(至少 25 bases 之長度, 切勿與 Probe 序列重疊)後, 然後利用 Edit →”Copy Complement”將序列貼到 Tools → Primer Probe Test Tool 中的 Rev Primer 欄位。



確認 Reverse Primer 的 Tm 值也能符合在 58-60°C, 如果 Tm 值不符合, 可直接在 Rev Primer 中框選不同的序列片段, 並觀察右邊對應的 Tm, %GC 和長度, 以找出最適當的 Primer (請參照 primer/probe design guideline), 若框選到適合的片段, 點一下”Trim”, 就可以將未框選的序列直接刪除, 只留下需要的序列。



決定 primer/ probe set 後可利用 Copy & Paste 功能轉貼到一個新的 text 檔，並 save 起來做為未來參考資料。另外，也可以把此次設計 document 進行存檔，存檔的方式從 File → Save As 存檔。



技術支援請電洽: 0800251326

或 e-mail 至 TWSupport@appliedbiosystems.com

<http://www.appliedbiosystems.com.tw>