Applied Biosystems

Primer Express® Software
for Real-Time PCR

Version 3.0

Primer Express v3.0

Primers and Probe Design For Real-Time PCR

Primers/Probes Design Guideline

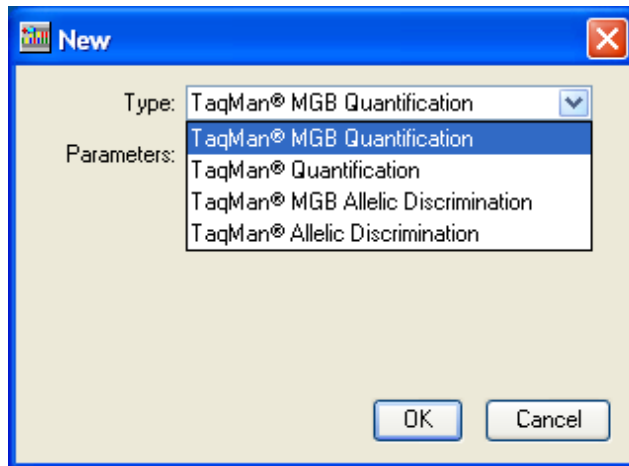| TaqMan Probe	Primer
Probe 與 Primer 的距離愈近愈好, PCR 產物大小建議在 50-150 bp 為最佳	
G/C %　為 30-80 %	
避免有重複序列的出現，尤其避免 4 個以上 G 的出現	
Tm 值: 68-70　　(Quantification assay) 65-67　　(Allelic Discrimination assay)	Tm 值: 58-60℃
Probe　長度: 13~25 bases (TaqMan MGB probe) 13~30 bases (TaqMan probe)	Primer　長度: 20 bases (Optimal)
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

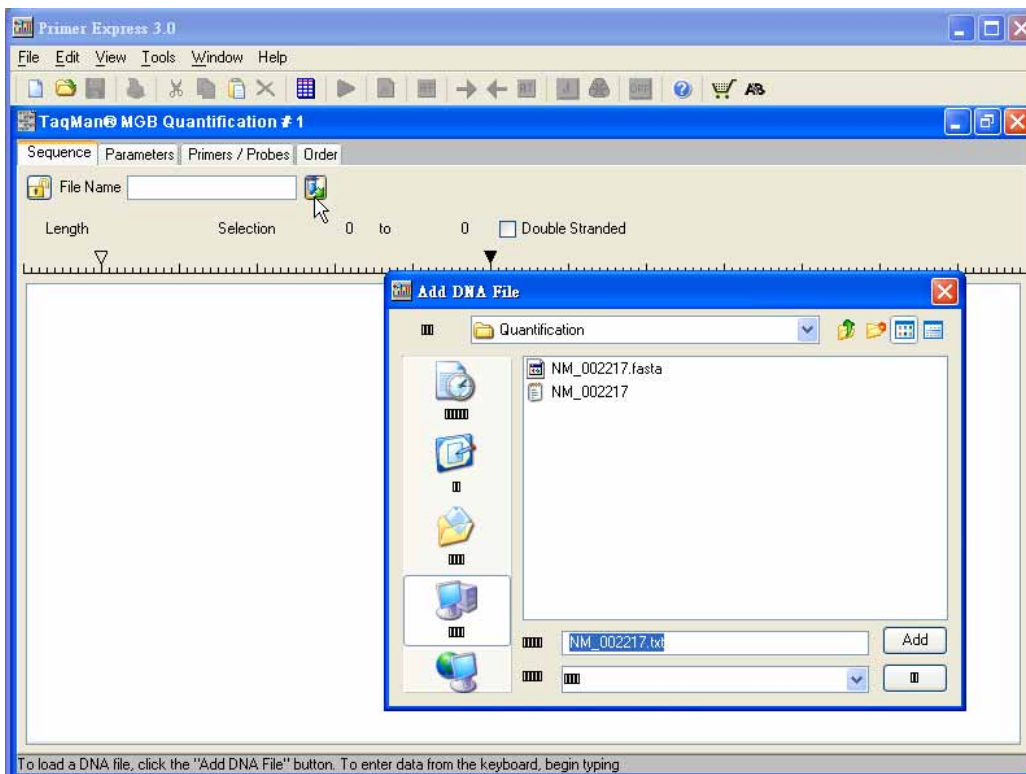# Primers & Probes for Quantification

🔵 Automatically Design

進入 Primer Express 3.0 軟體

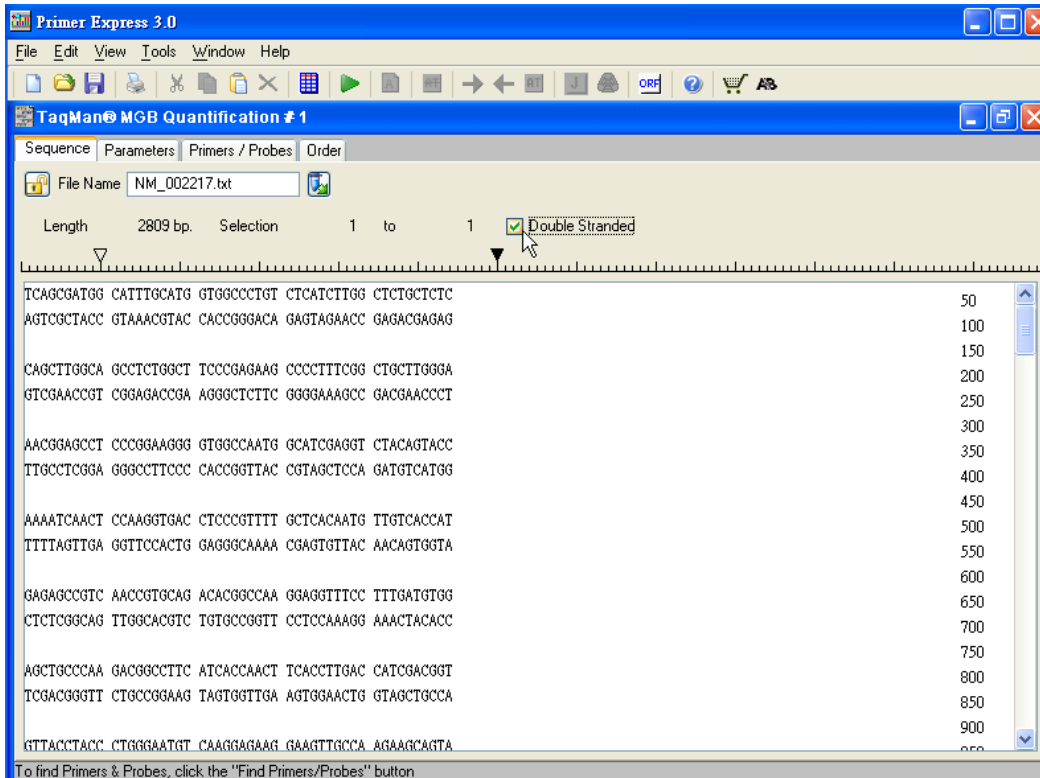File→ New→選擇"**TaqMan MGB Quantification** 或 **TaqMan Quantification**"→ OK

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
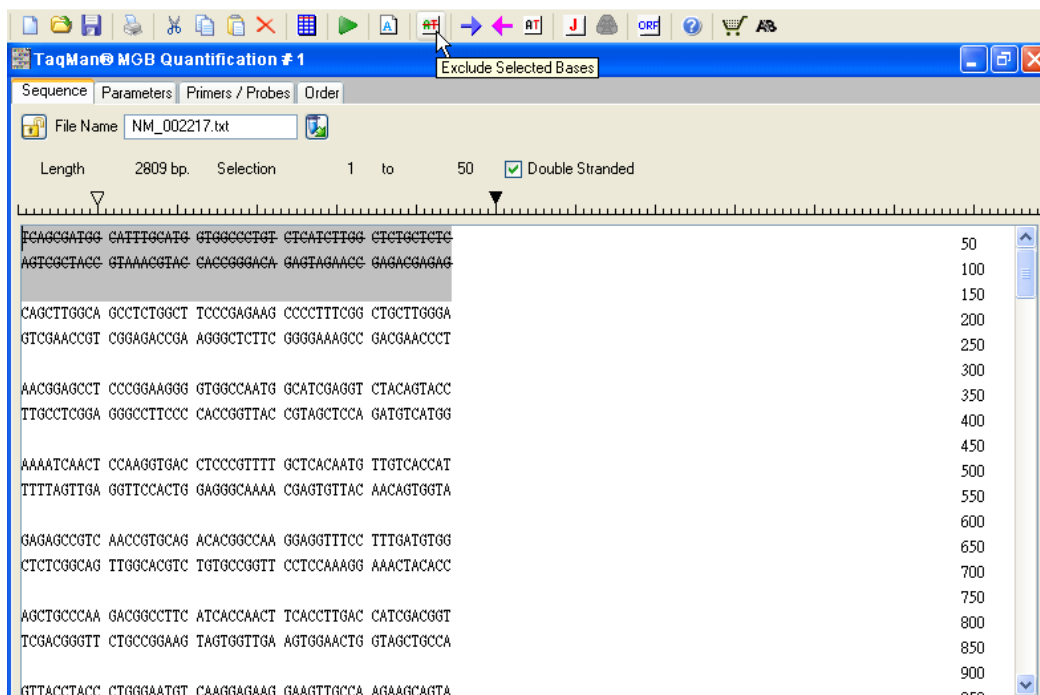
可(若序列是從 database download 下來時,請刪除與序列無關之資料)

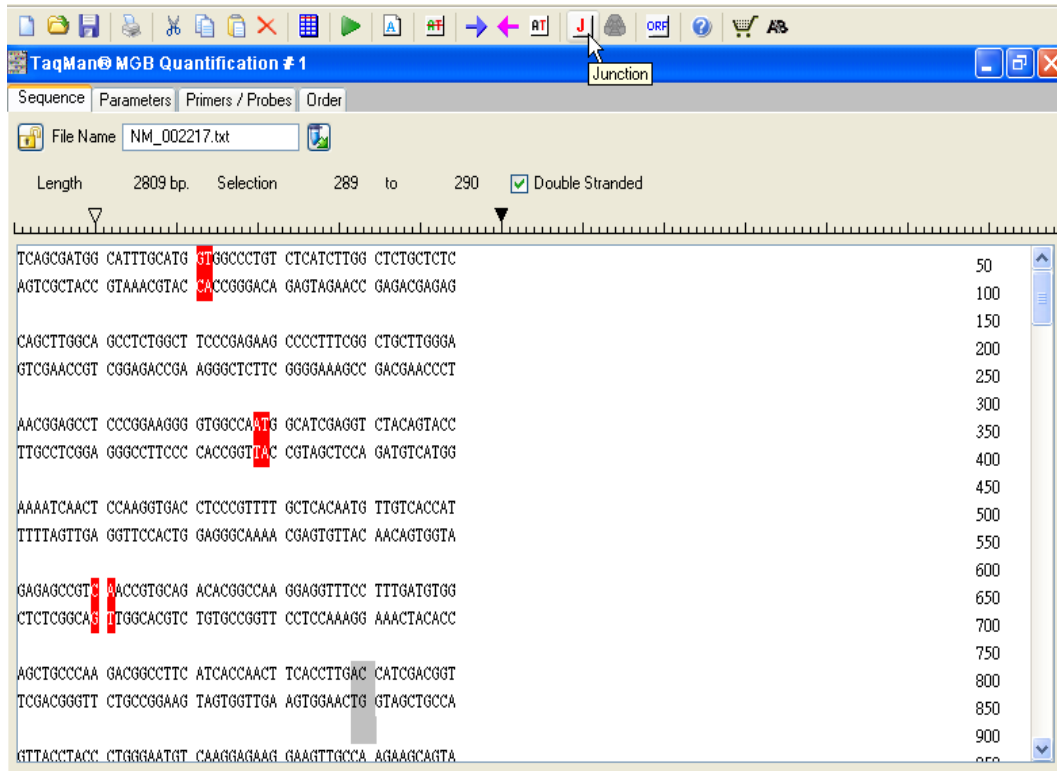可勾選" Double Strand ", 即會顯示 double stranded DNA sequence

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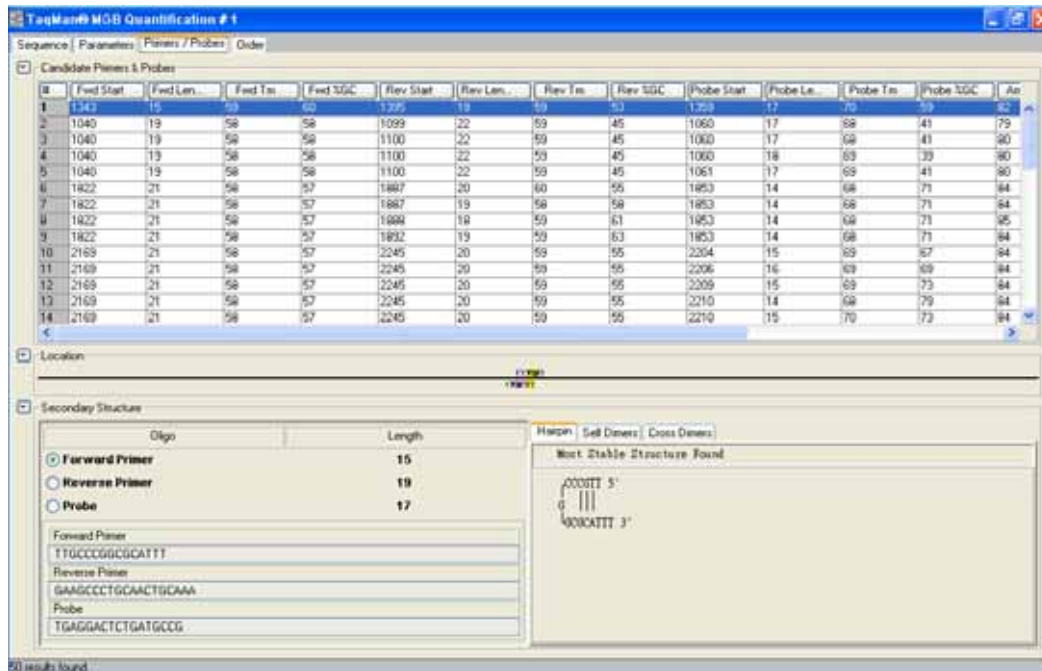
2. Junction: 如果已經知道序列上 junction 位置則可利用"Junction"

    - 框選 juction 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。

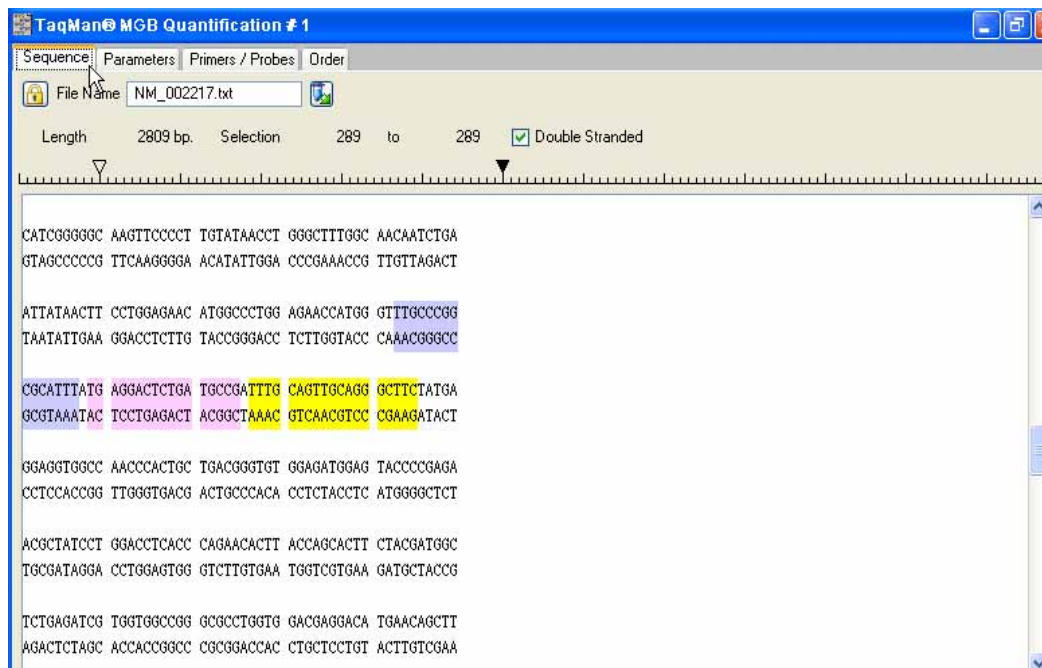3. 在"**Parameters**" Tab 中可看到 Primer/Probe Tm 值設定及其他 Primers/Probe 設計之規範

Parameter	Value
Primer Tm	
Min Primer Tm	58
Max Primer Tm	60
Max Difference in Tm of Two Primers	2
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
Primer Length	
Min Primer Length	9
Max Primer Length	40
Optimal Primer Length	20
Primer Composition	
Max Primer G Repeats	3
Max Num Ambig Residues in Primer	0
Primer Secondary Structure	
Max Primer Consec Base Pair	4
Max Primer Total Base Pair	8
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。

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。
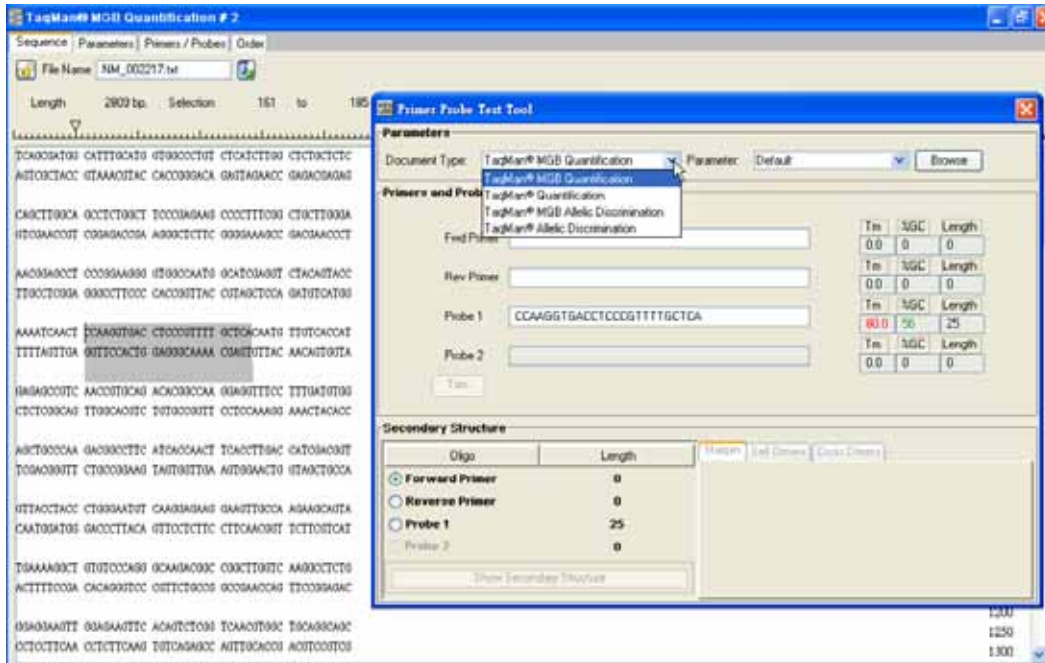
● Manually Design

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
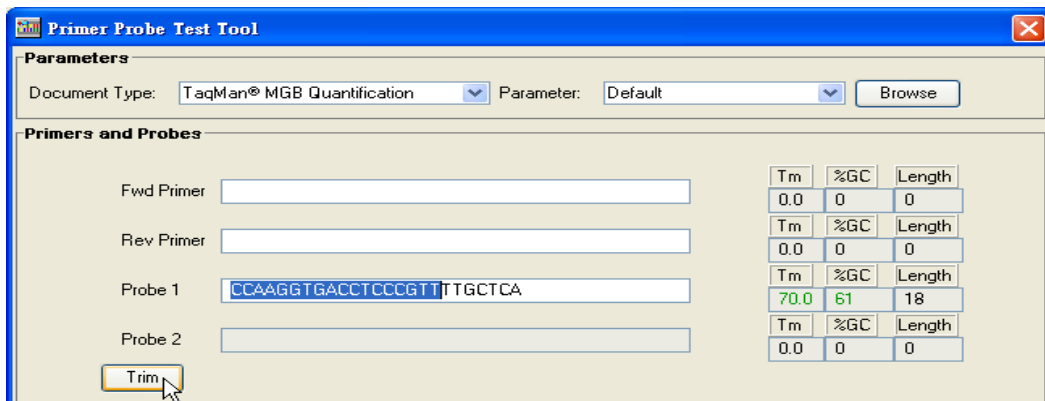開啟一個新的 **Quantification** Document，並把欲設計的序列檔案加入 (參照第 3 頁)。

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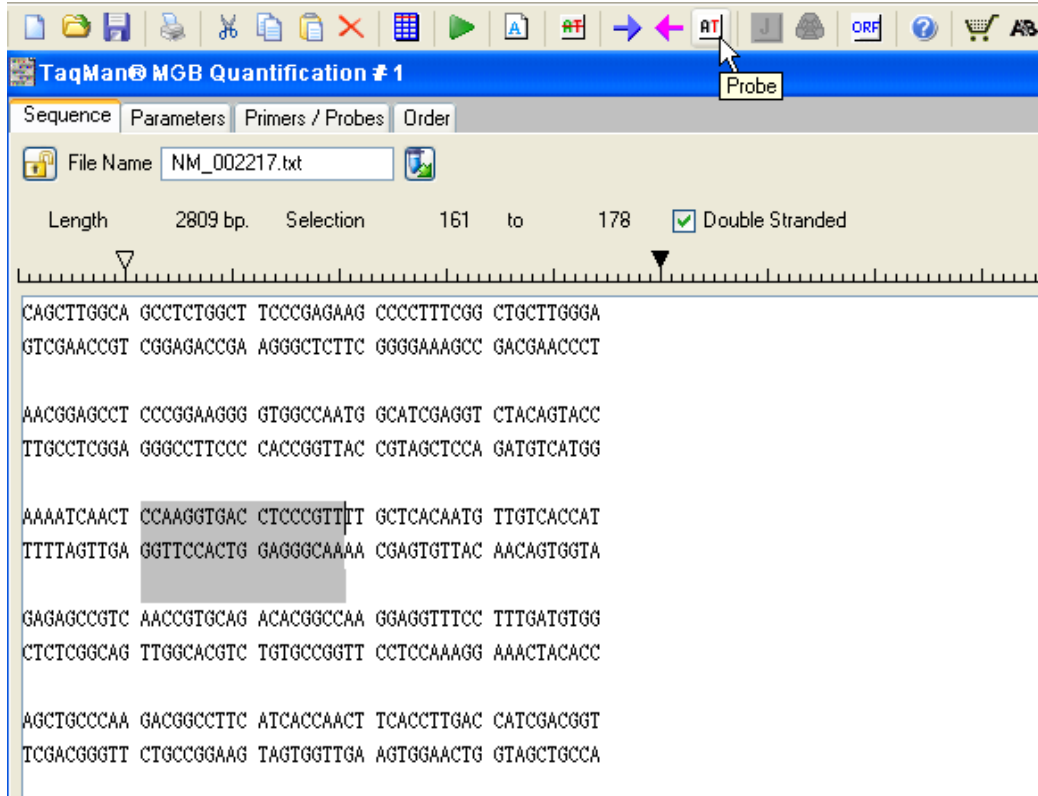
註: probe 第一個序列不能為 G，且序列裡面 C 的數目要比 G 還要多

此時若 Tm 超過設定值(68℃ to 70℃)，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 →

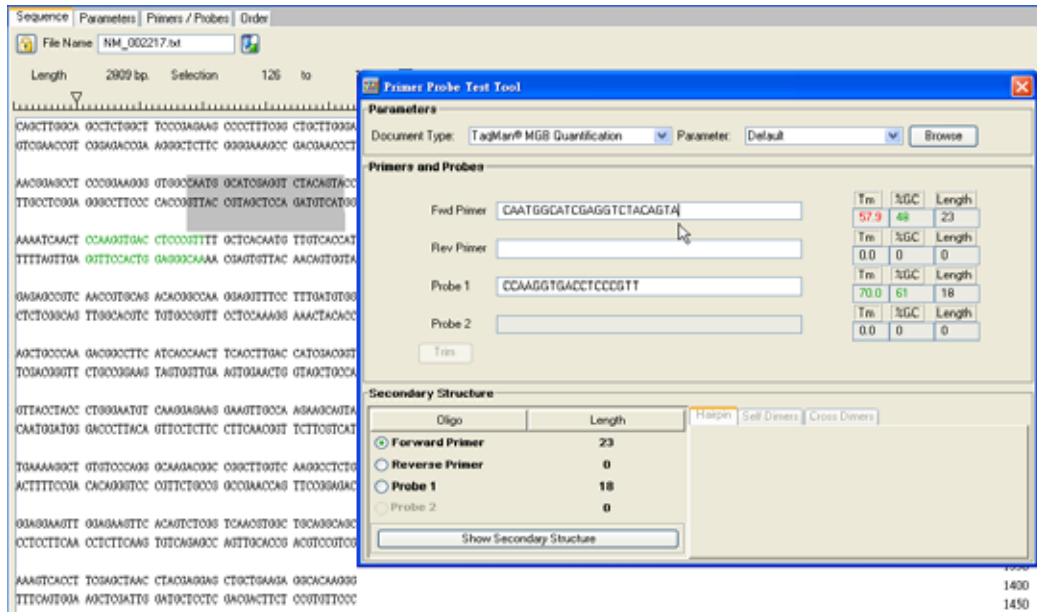Annotate → " Probe" ⊞ 將 probe 序列固定起來，此時 probe 的位置會被標定成綠色。

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
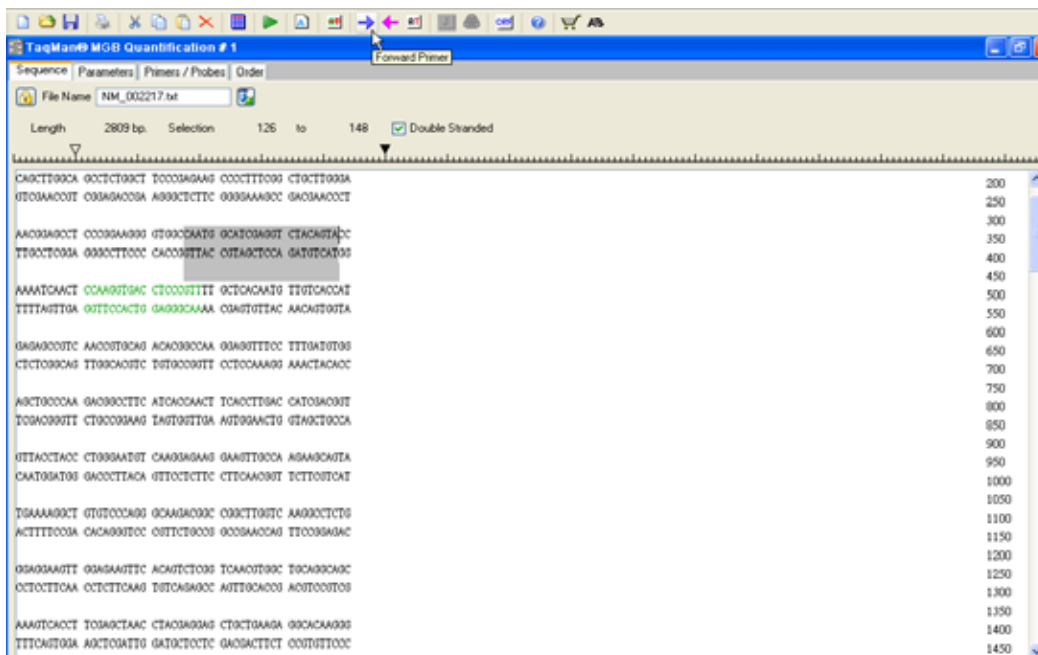
計。

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。
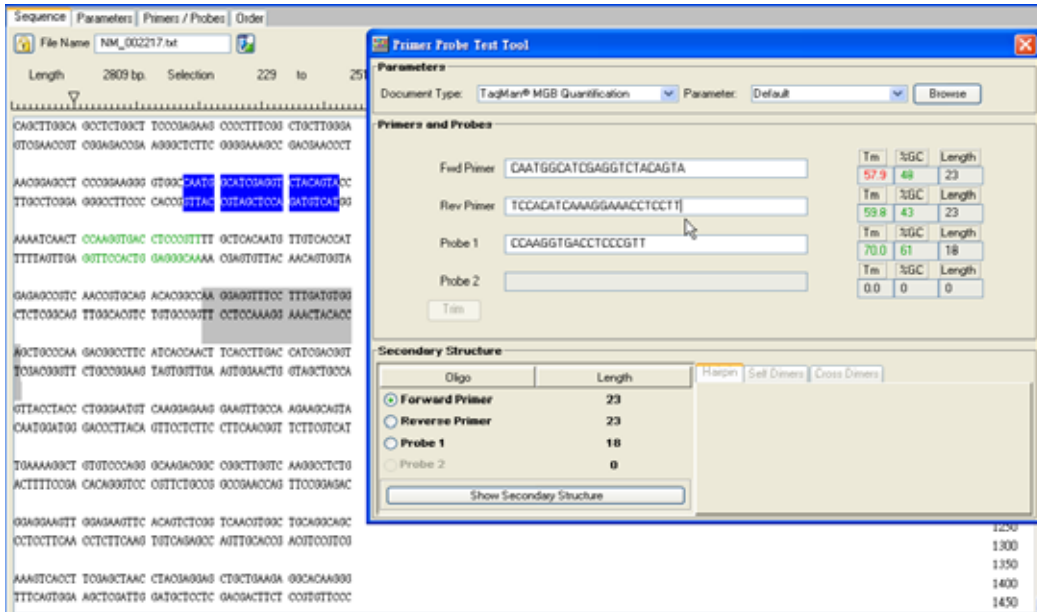

確認 Forward Primer 的 Tm 值在 58-60℃,如果 Tm 值不符合,可直接在 Fwd Primer 中框選不同的序列片段,並觀察右邊對應的 Tm, %GC 和長度,以找出最適當的 Primer (請參照 primer/ probe design guideline),若框選到適合的片段,點一下"**Trim**",就可以將未框選的序列直接刪除,只留下需要的序列。

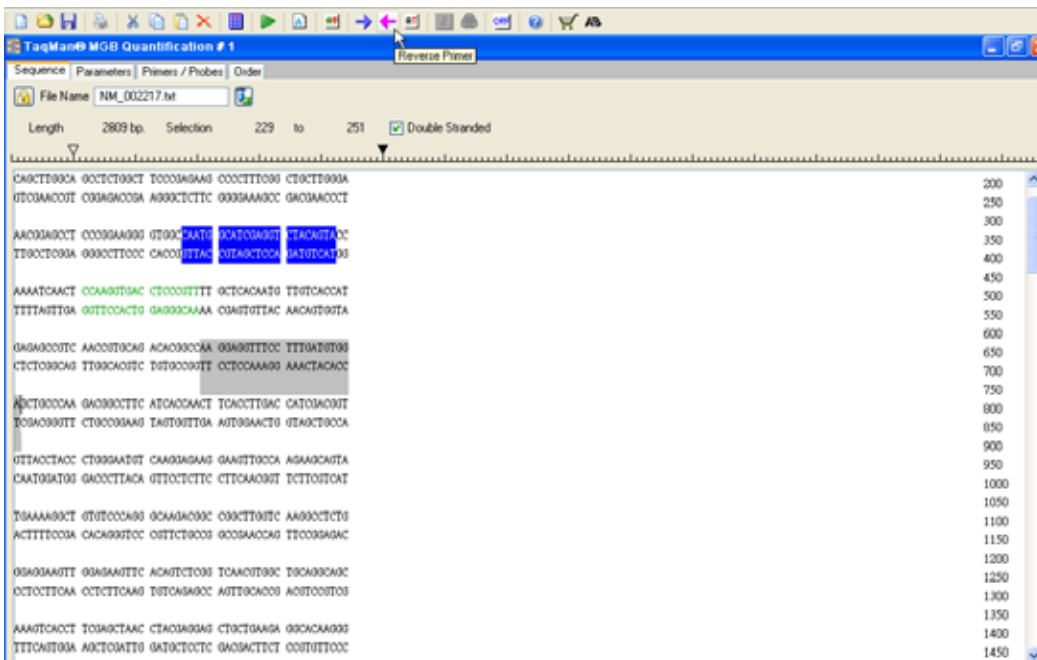當 Fwd Primer 序列確定之後,回到"**Sequence**" Tab 中將確定序列 highlight 起來,再利用 " Forward Primer" ➡ 固定起來,此時的 Fwd Primer 位置會被標定成藍色。

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。
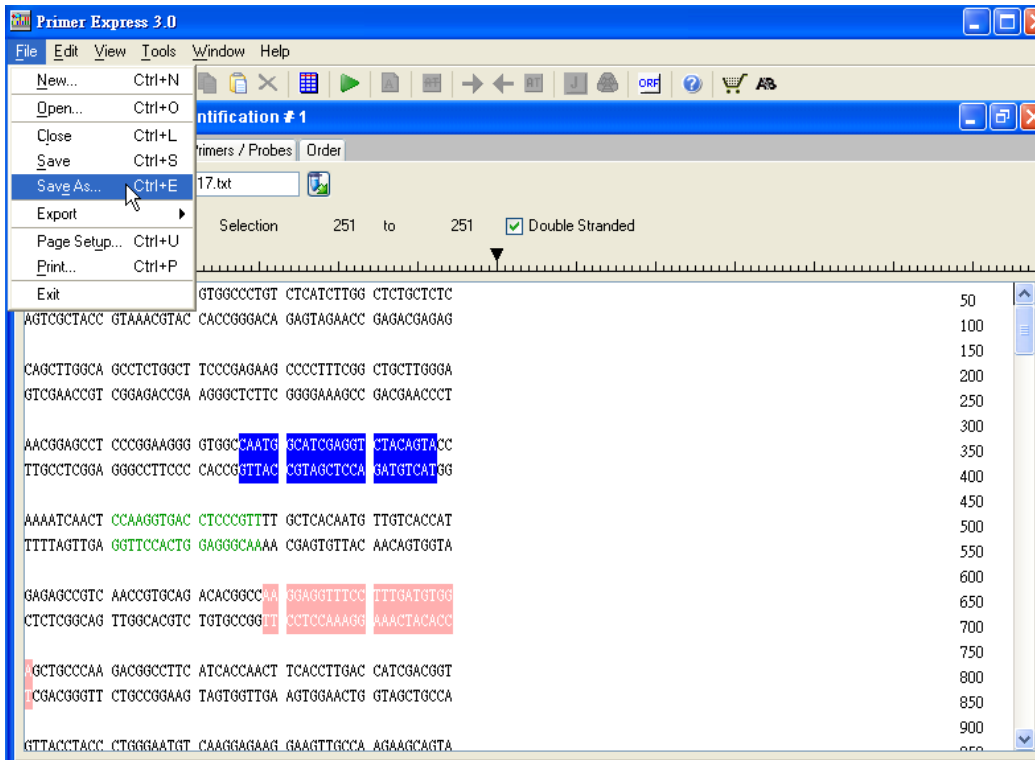

確認 Reverse Primer 的 Tm 值也能符合在 58-60℃,如果 Tm 值不符合,可直接在 Rev Primer 中框選不同的序列片段,並觀察右邊對應的 Tm, %GC 和長度,以找出最適當的 Primer (請參照 primer/ probe design guideline),若框選到適合的片段,點一下"**Trim**",就可以將未框選的序列直接刪除,只留下需要的序列。

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
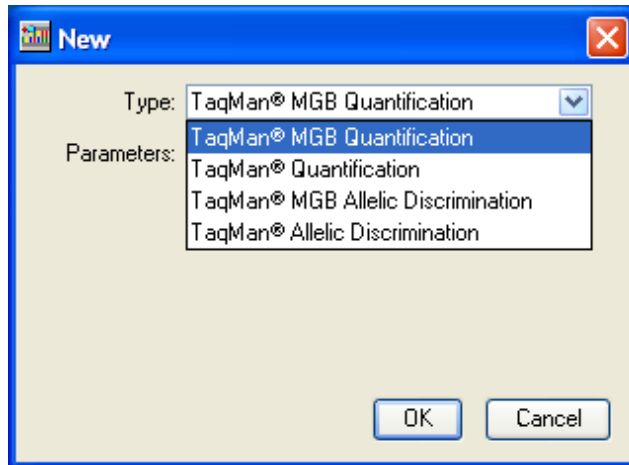考資料。另外，也可以把此次設計 document 進行存檔，存檔的方式從 File → Save As 存檔。
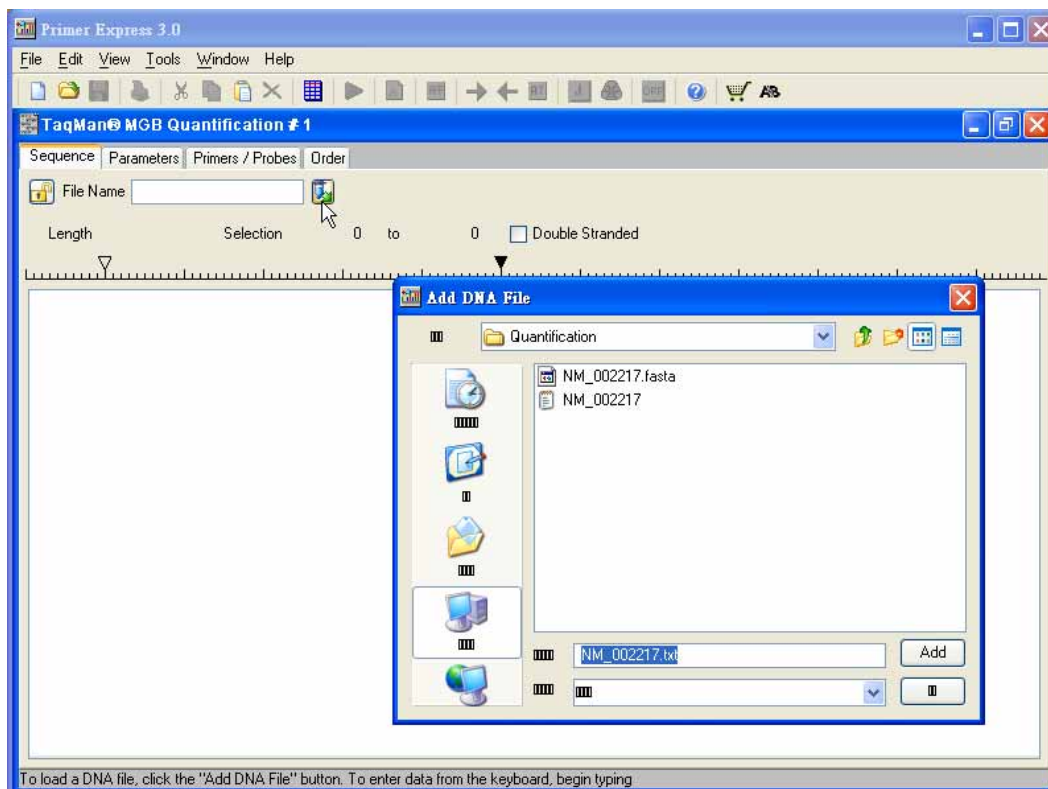
SYBR Green I Primer for Quantification

● Automatically Design

進入 Primer Express 3.0 軟體

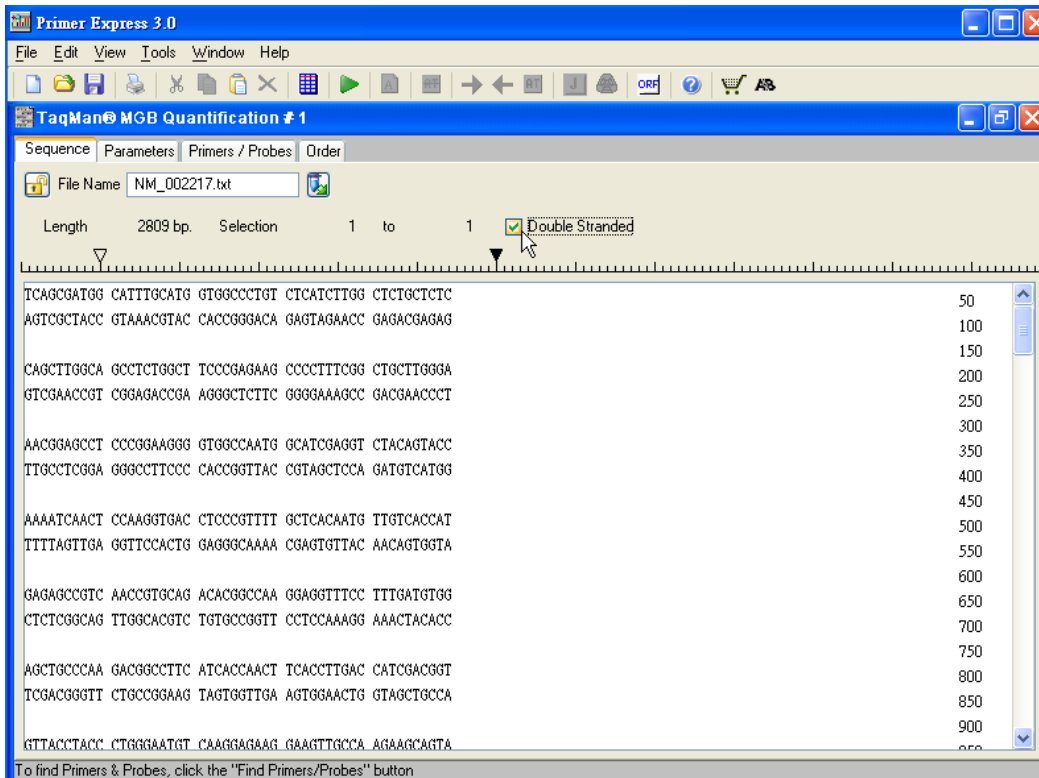File→ New→選擇"**TaqMan MGB Quantification** 或 **TaqMan Quantification**"→ OK

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
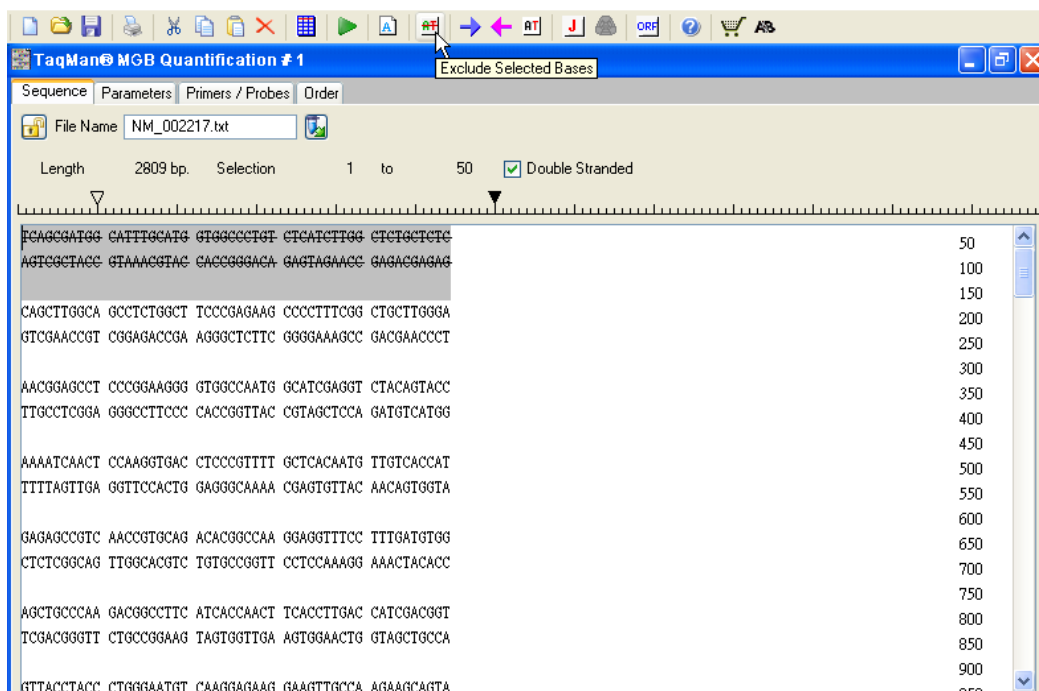
　(若序列是從 database download 下來時,請刪除與序列無關之資料)

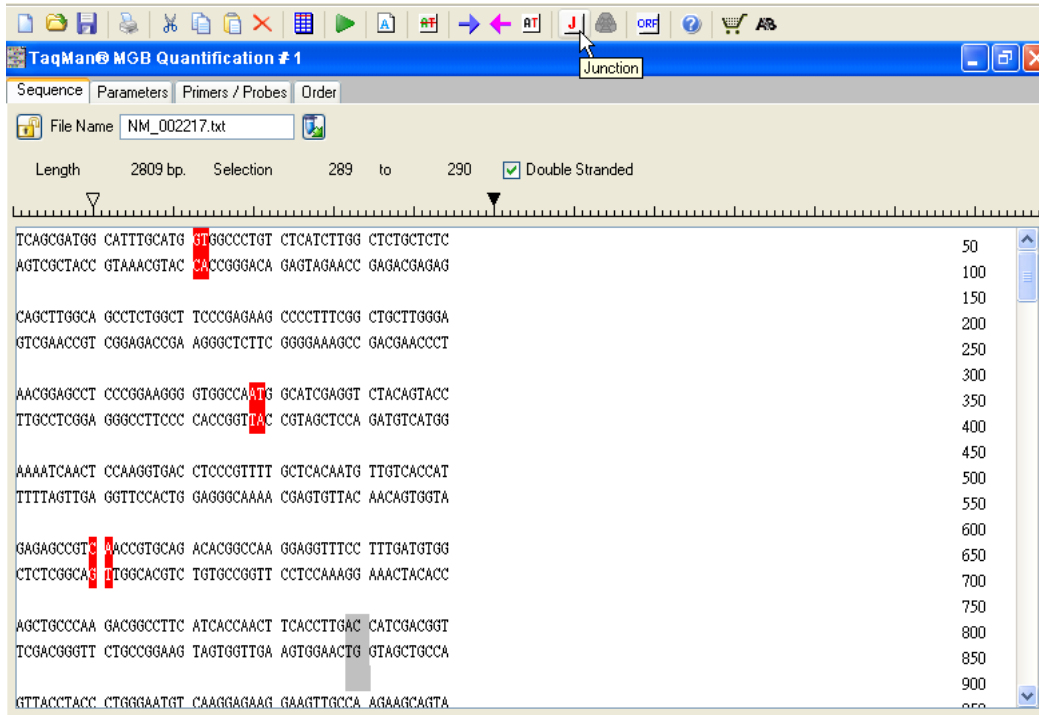可勾選" Double Strand ", 即會顯示 double stranded DNA sequence

Tools 上的選項

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

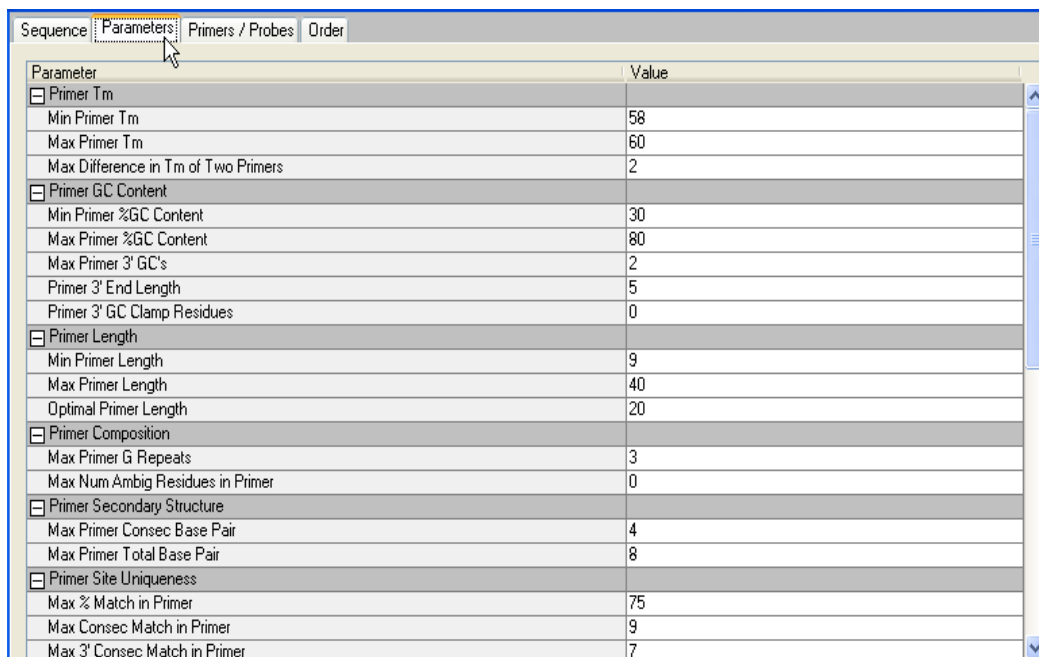- 先選取不要的序列範圍，點選 "Exclude"，即可看見此區域被劃掉
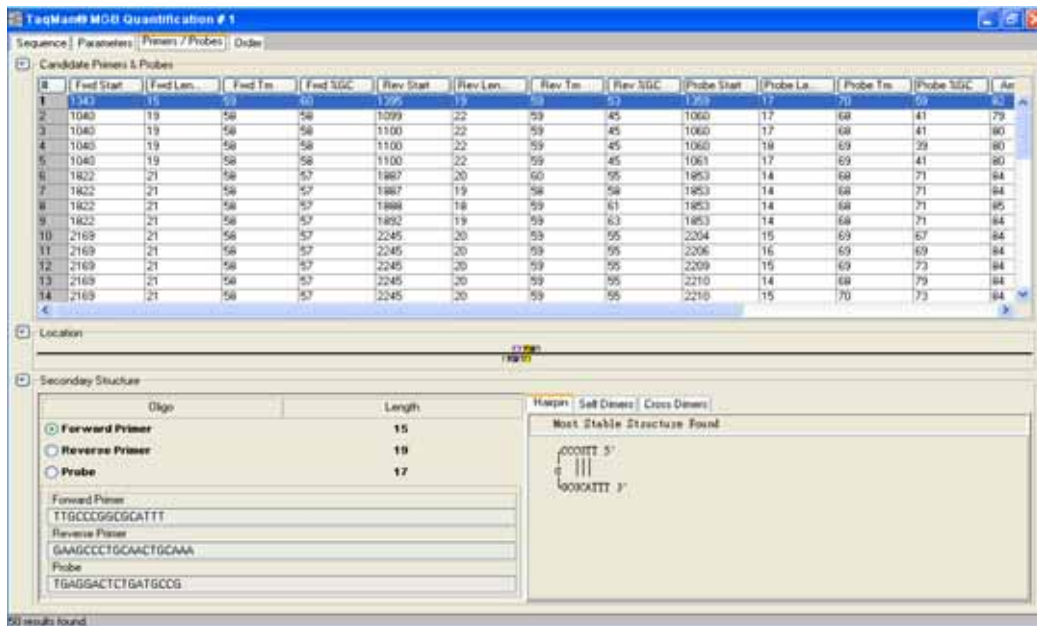

14

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

　　　　- 框選 juction 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。

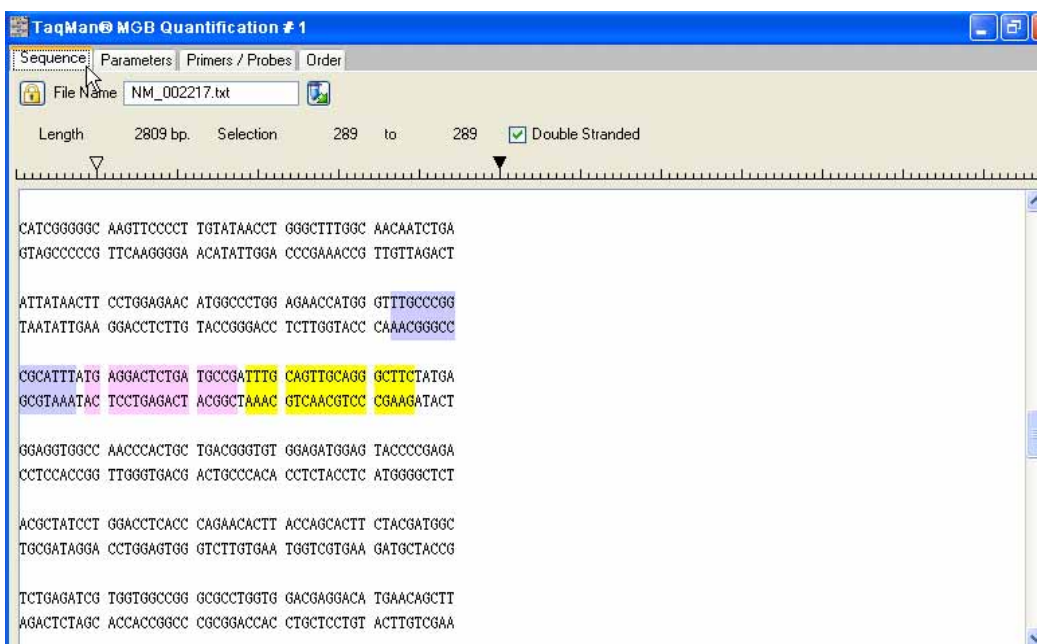3. 在"**Parameters**" Tab 中可看到 Primer Tm 值設定及其他 Primers 設計之規範

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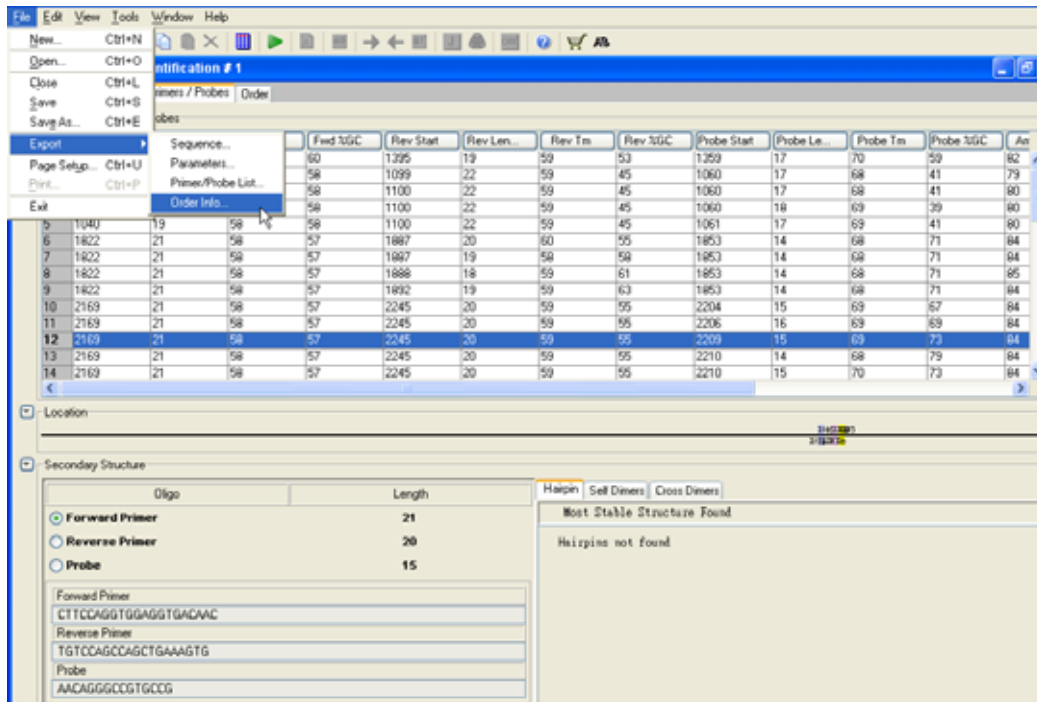
決定 primers set 之後則可進行存檔，存檔的方式從 File → Save As 存檔。

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。
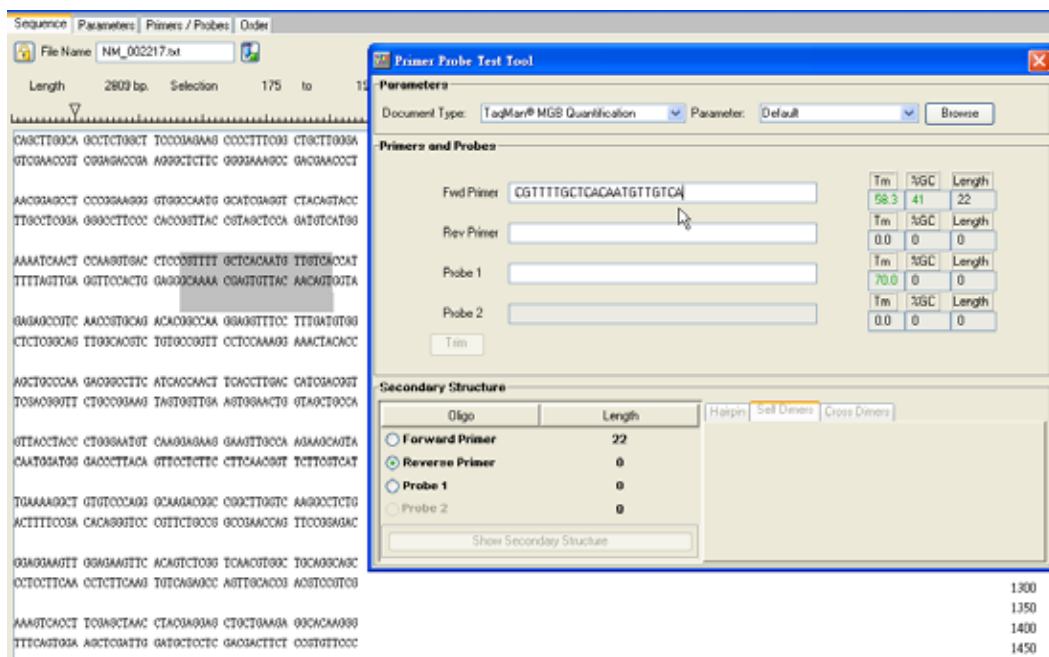

enabled

Applied Biosystems

🔴 Manually Design

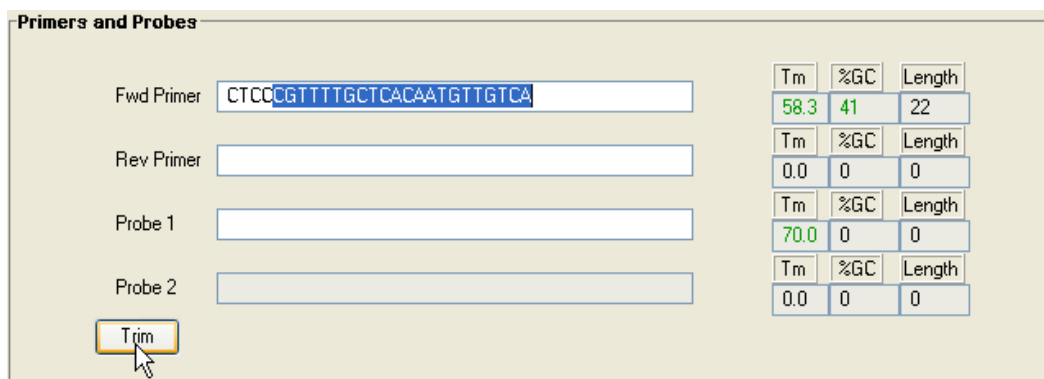當軟體無法自動尋找到 Primer 組合時，先確定 Primer 想要置放的位置

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。
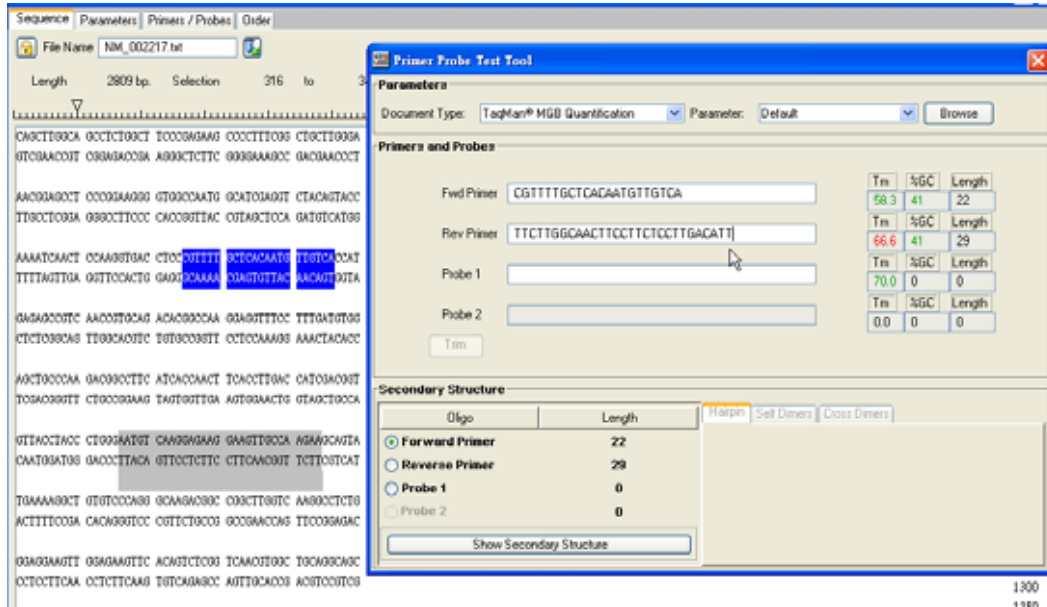

確認 Forward Primer 的 Tm 值在 58-60℃，如果 Tm 值不符合，可直接在 Fwd Primer 中框選不同的序列片段，並觀察右邊對應的 Tm, %GC 和長度，以找出最適當的 Primer (請參照 primer/ probe design guideline)，若框選到適合的片段，點一下"**Trim**"，就可以將未框選的序列直接刪除，只留下需要的序列。

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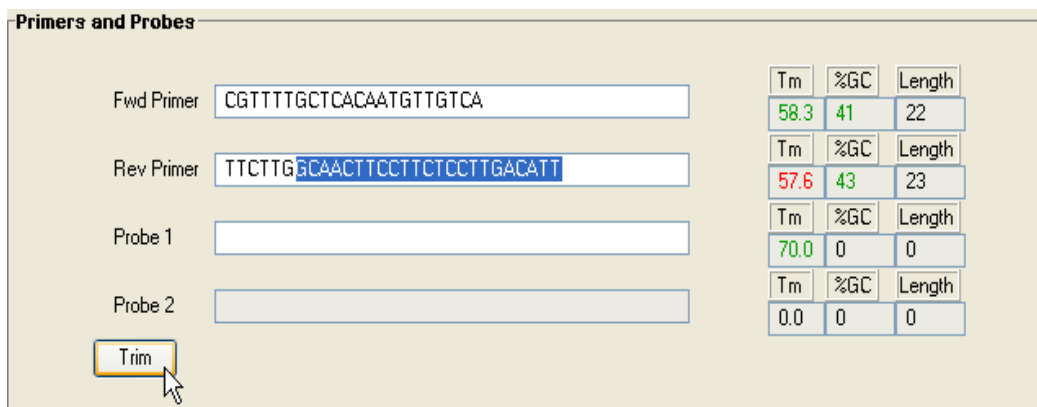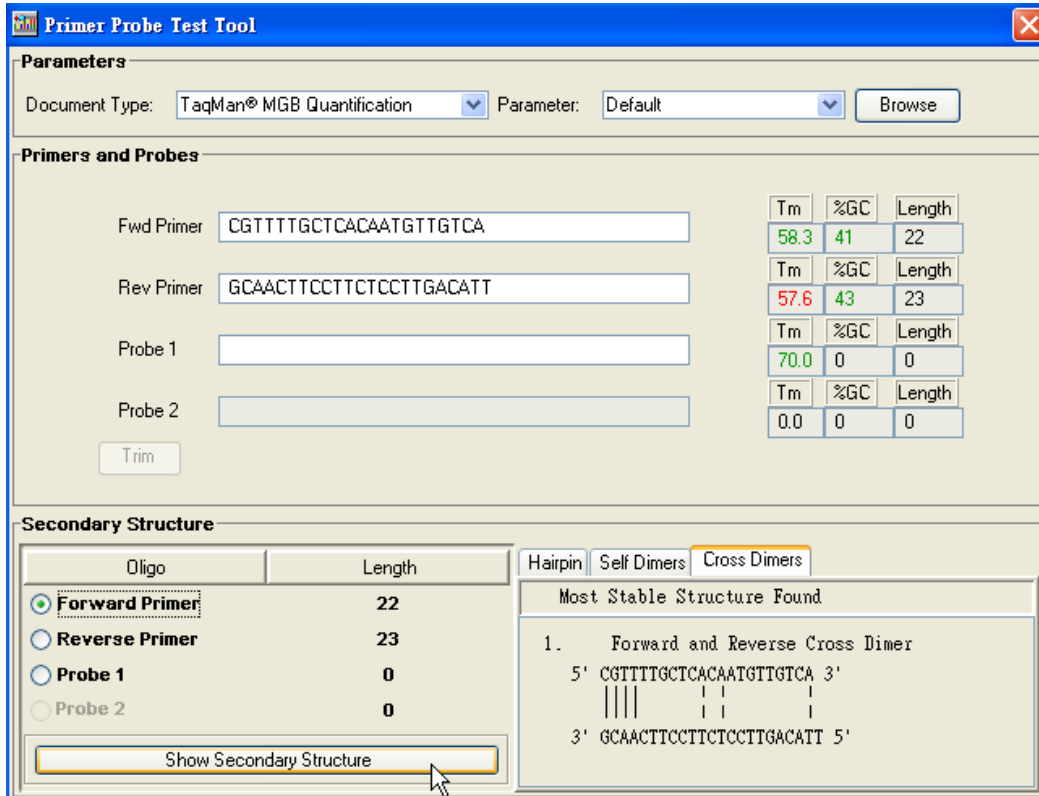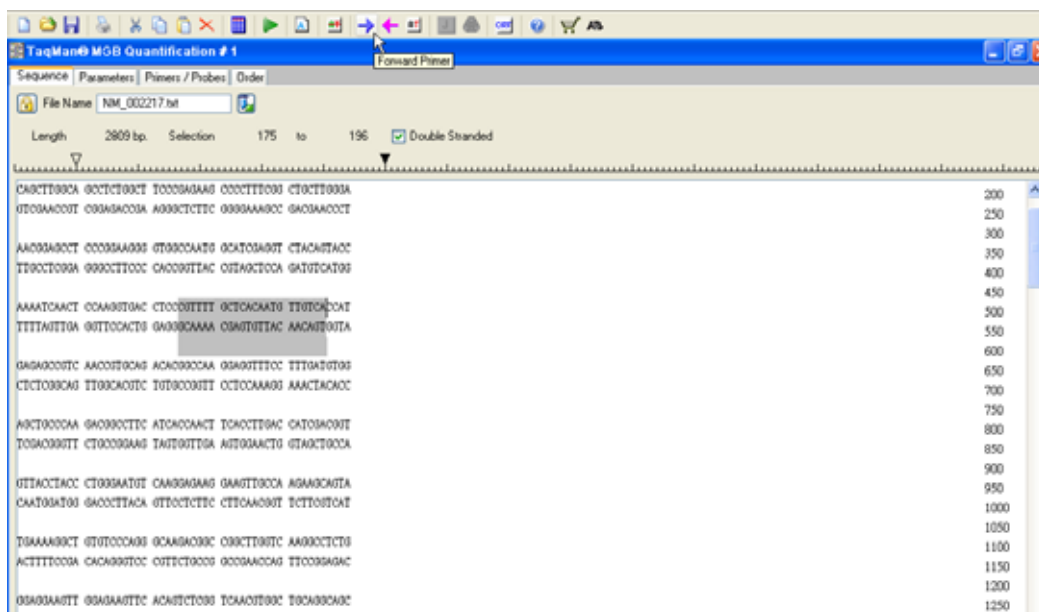
3. 在 SYBR Green primer 設計中必須要注意避免有 primer dimer 的產生

-在 Primer Probe Test Tool 中選定 primer set 後，點選 "Show Secondary Stucture"，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。
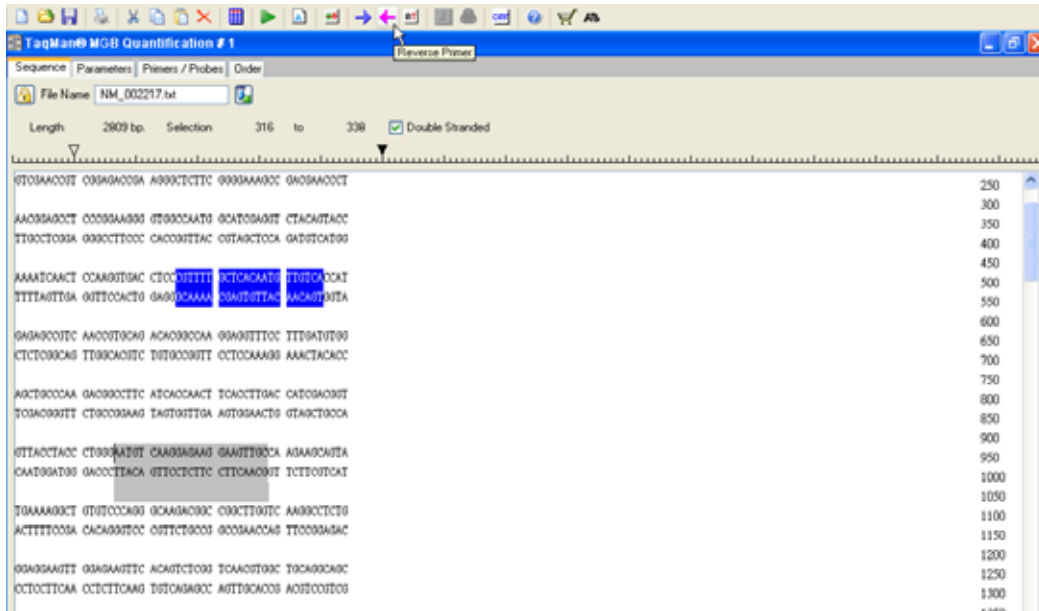

當 Fwd Primer 序列確定之後，回到"**Sequence**" Tab 中將確定序列 highlight 起來，再利用 "Forward
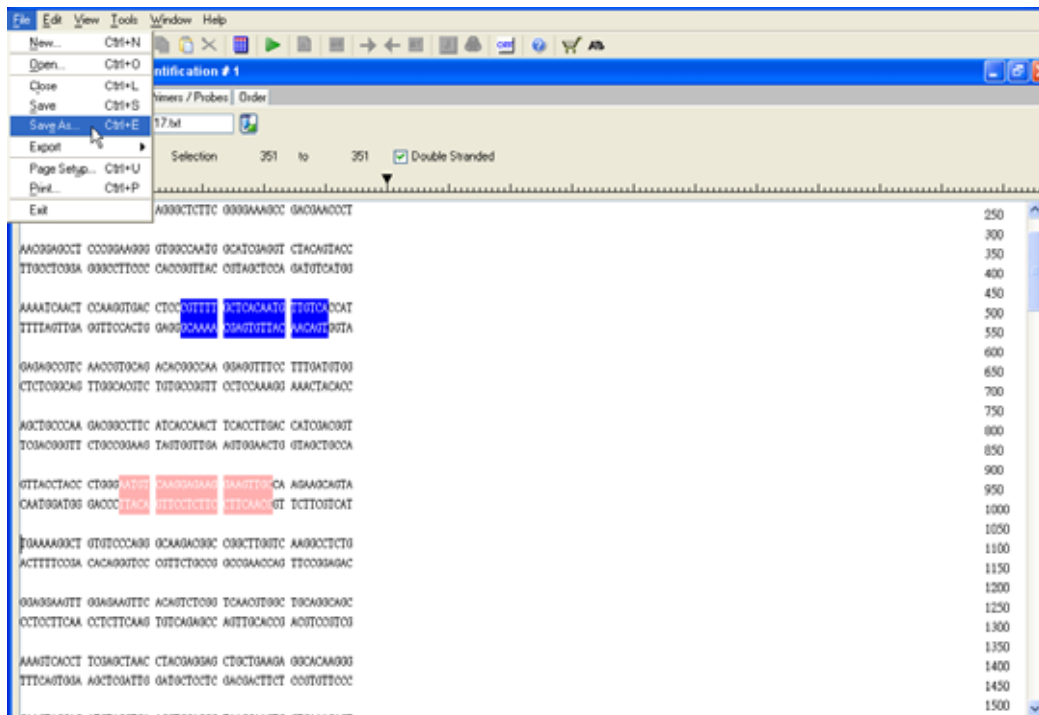
Primer" ➡ 固定起來，此時的 Fwd Primer 位置會被標定成藍色。

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
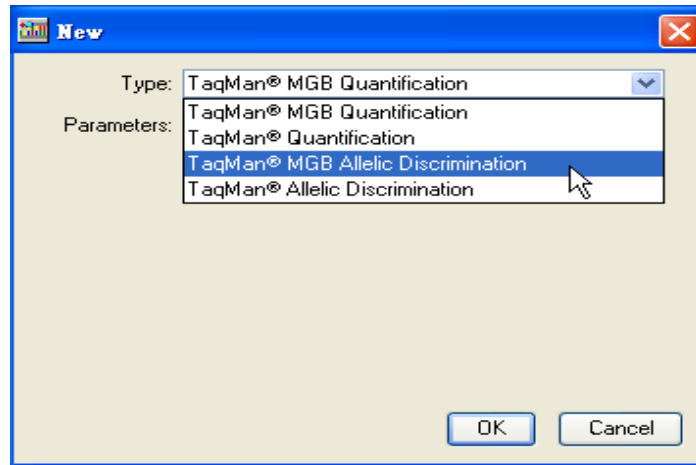考資料。另外，也可以把此次設計 document 進行存檔，存檔的方式從 File → Save As 存檔。

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)

23

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
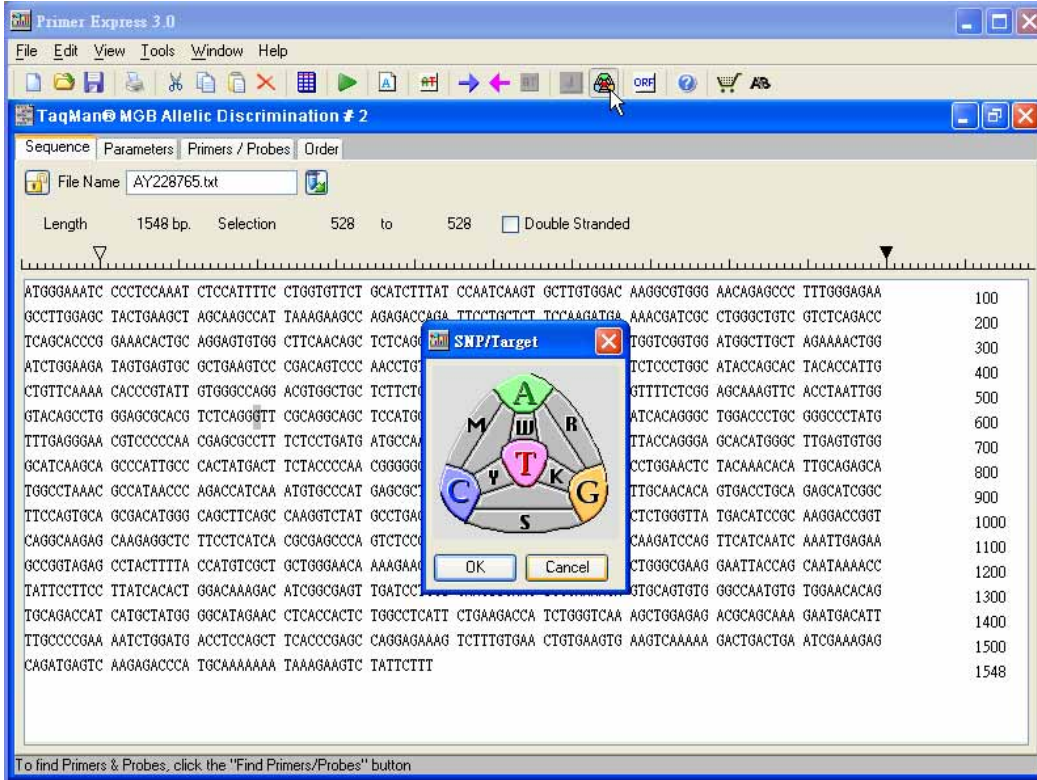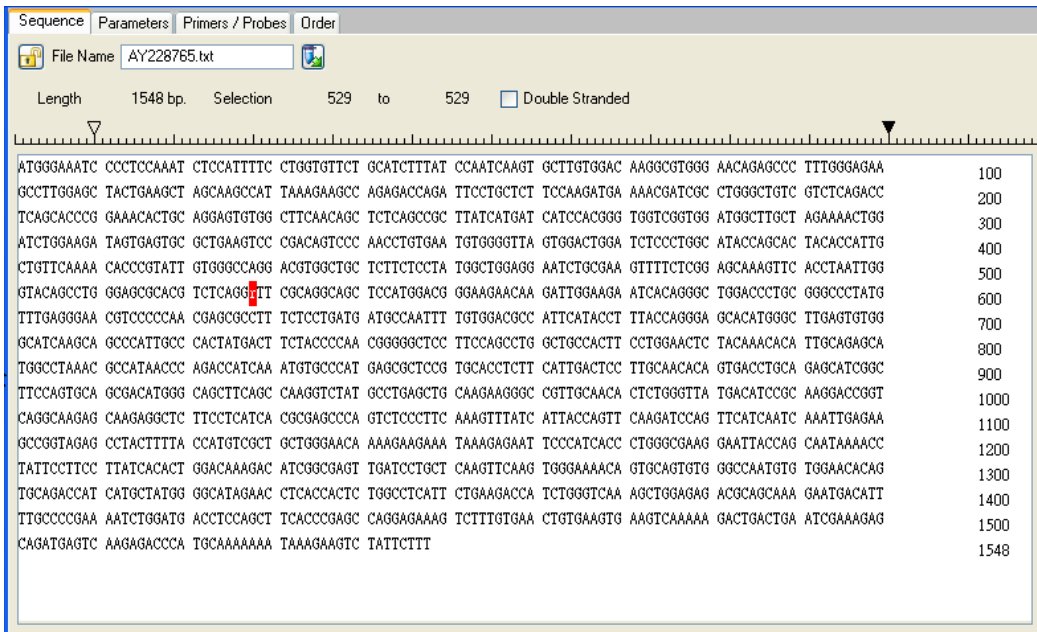

Primer Express 軟體會找到 Candidate Primers & Probes pairs，一次 search 最多能找到 50 種組合，這些組合列於"**Primers / Probes**" Tab 中。中間"Location"說明 primers & probes 在序列中的相對位置，在橫線上方的數字代表起始位置，橫線下方則代表終止位置。

"**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)

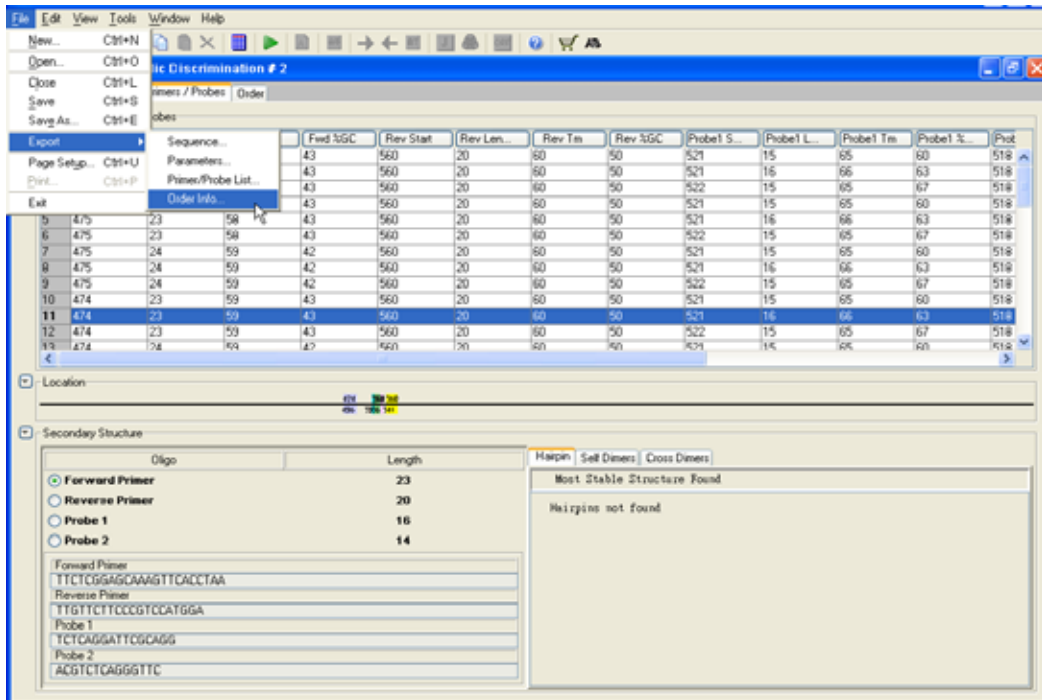在 ”**Primers / Probes**” Tab中會將每對Primers/Probe的組合列出來，請從中挑選出適當的組合，挑選方式可依據第 2 頁primer/ probe design guideline。在MGB Probe的篩選中，亦可在”**Parameters**” Tab中加選<u>”C ”比” G ”多的序列</u>作為進一步篩選的參數。

Parameter	Value
Max Primer G Repeats	3
Max Num Ambig Residues in Primer	0
Primer Secondary Structure	
Max Primer Consec Base Pair	4
Max Primer Total Base Pair	8
Primer Site Uniqueness	
Max % Match in Primer	75
Max Consec Match in Primer	9
Max 3' Consec Match in Primer	7
Probe Tm	
Min Probe Tm	68
Max Probe Tm	70
Probe GC Content	
Min Probe %GC Content	30
Max Probe %GC Content	80
Probe Length	
Min Probe Length	13
Max Probe Length	25
Probe Composition	
Max Probe G Repeats	3
Max Num Ambig Residues in Probe	0
No G at 5' End in Probe	☑
Select Probe with more C's than G's	
Probe Secondary Structure	
Max Probe Consec Base Pair	4
Max Probe Total Base Pair	8
Amplicon	
Min Amplified Region Tm	0
Max Amplified Region Tm	85
Min Amplified Region Length	50
Max Amplified Region Length	150
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"g")，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(65℃to 67℃)，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
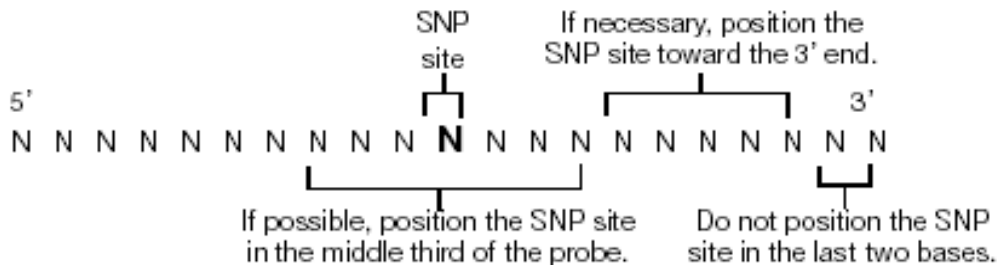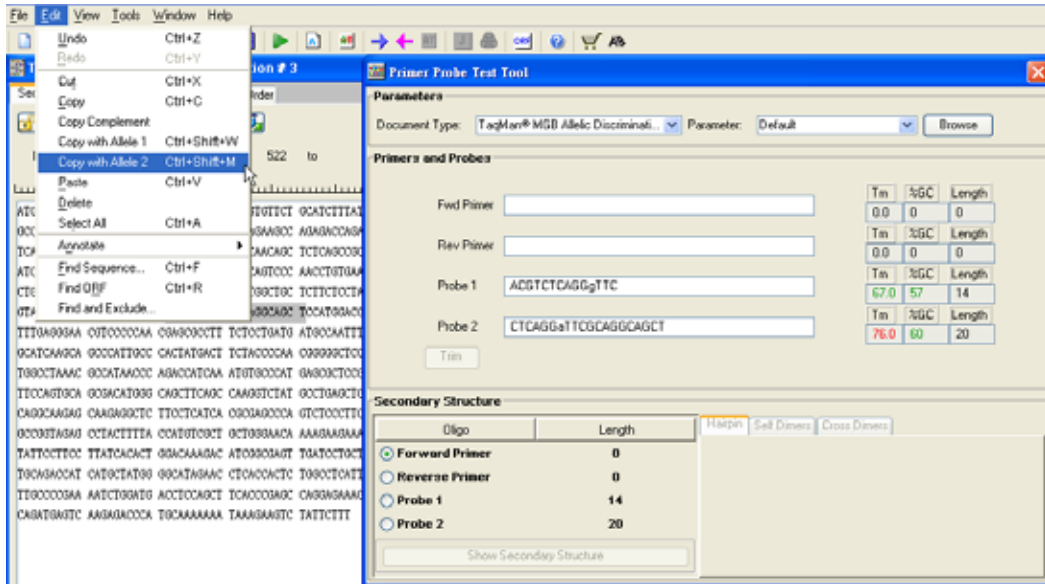適合的片段，點一下"**Trim**"，就可以將未框選的序列直接刪除，而留下需要的 Probe 序列。

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
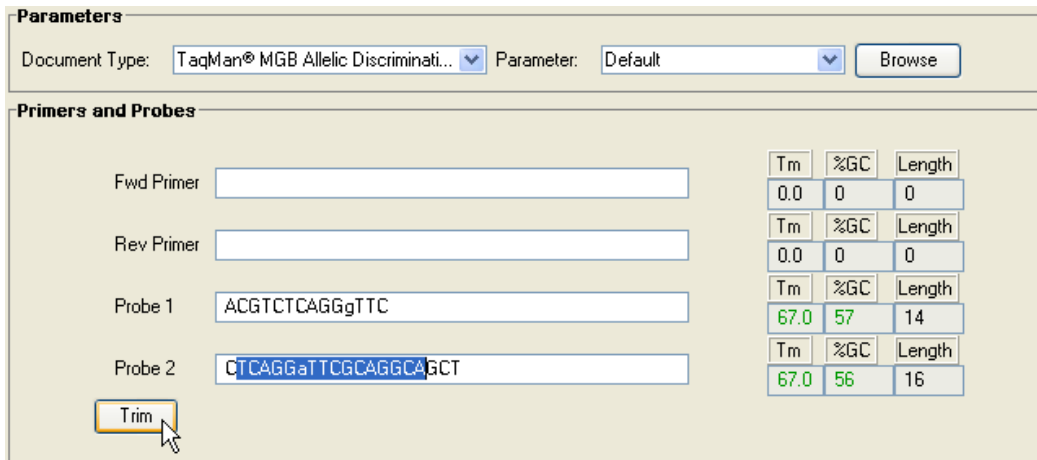能置放在最後兩個 base，如下圖：

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。

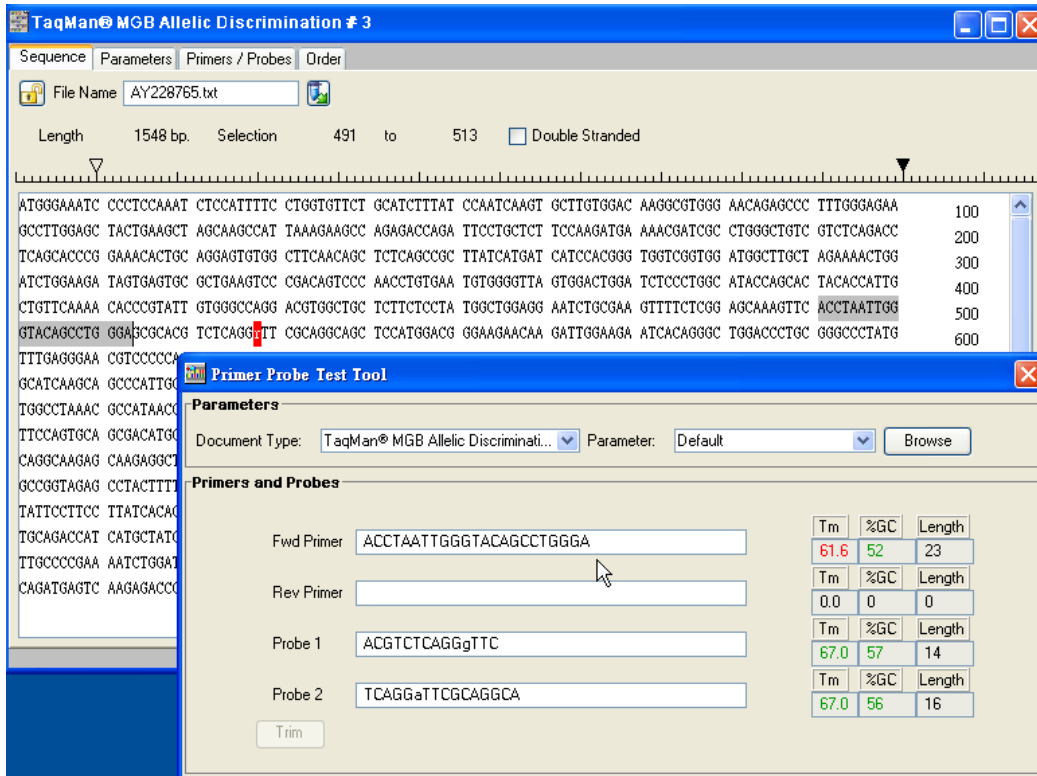

此時若 Tm 超過設定值(65℃ to 67℃)，可直接在 Probe 1 欄位中框選不同的序列片段，並觀察右邊對應的 Tm, %GC 和長度，以找出最適當的 Probe (請參照 primer/ probe design guideline)。若框選到適合的片段，點一下"**Trim**"，就可以將未框選的序列直接刪除，而留下需要的 Probe 序列。**注意 probe1 和 probe2 之間的 Tm 值差異不能超過 1℃ 以上。**
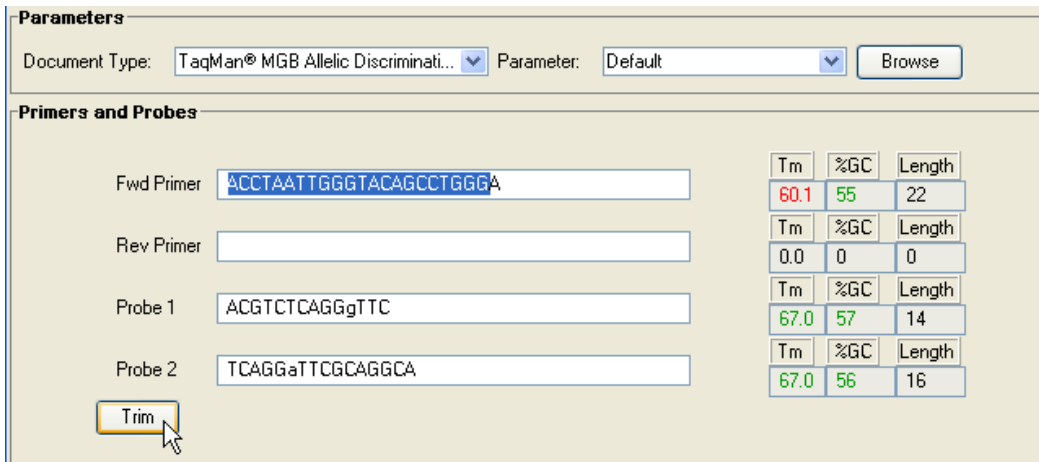
3.　　Forward Primer 設計:

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。

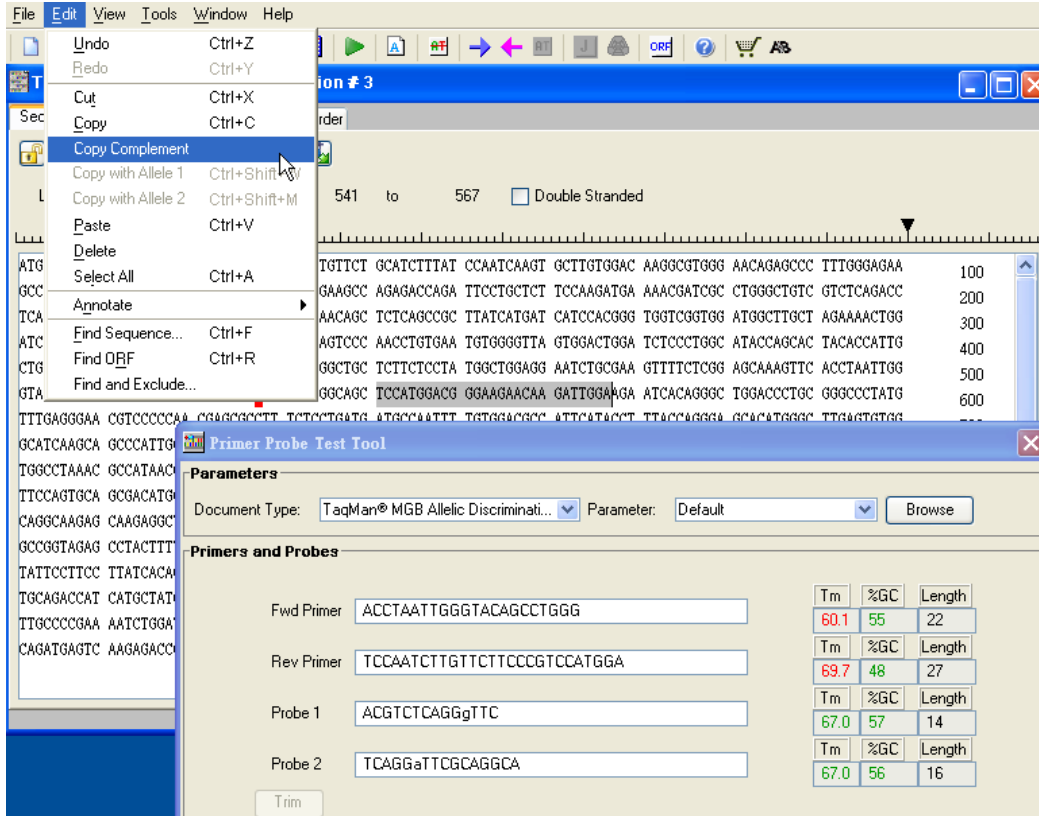確認 Forward Primer 的 Tm 值在 58-60℃,如果 Tm 值不符合,可直接在 Fwd Primer 中框選不同的序列片段,並觀察右邊對應的 Tm, %GC 和長度,以找出最適當的 Primer (請參照 primer/ probe design guideline),若框選到適合的片段,點一下"**Trim**",就可以將未框選的序列直接刪除,只留下需要的序列。
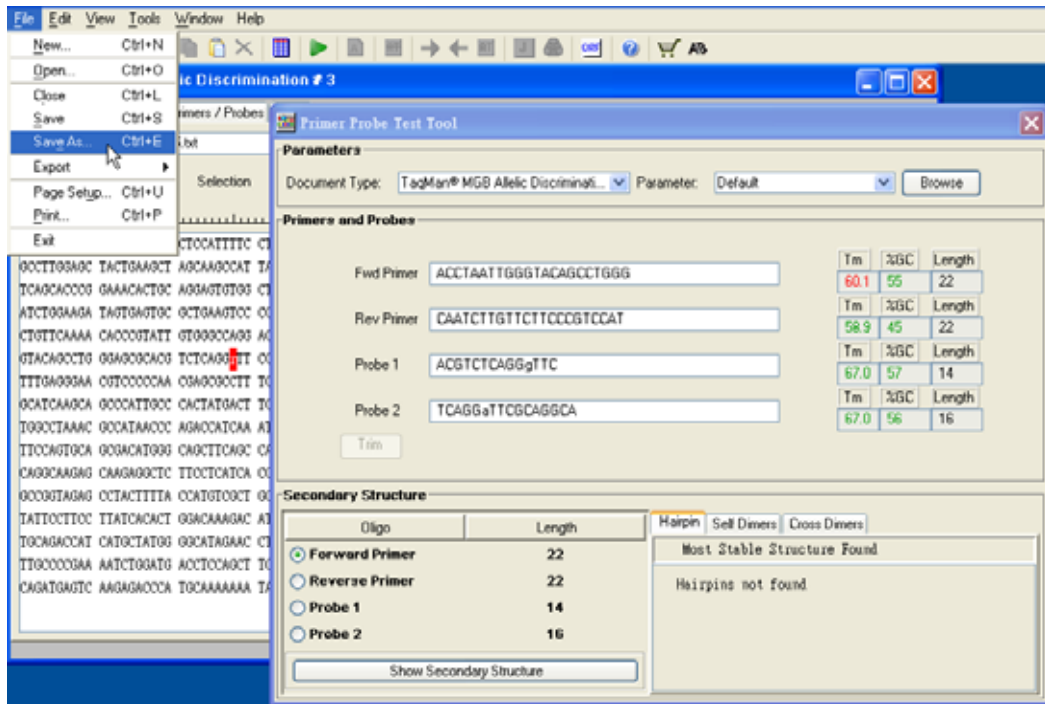
4.　　Reverse Primer 設計:

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℃，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