



Polymerase Chain Reaction: Types, Applications, Bioinformatics Tools and Guideline for Primer Design with emphasis on cereals

Mona Bordbar¹ , Reza Darvishzadeh² , Morad Jafari³ & Danial Kahrizi⁴

¹ Phd Student in Plant Genetic and Breeding, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.

² Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.

³ Associate professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.

⁴ Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran.

Corresponding author. E-mail: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir

ABSTRACT

Introduction: Polymerase chain reaction (PCR) is a critical and practical technology in various biological and medical sciences fields. Using this technique, millions of copies of a specific pattern can be reproduced in vitro with a minimal amount of DNA. This has made significant advances in molecular biology and medicine. This technique has many applications in biological sciences. PCR primers are an integral part of PCR. Well-designed primers allow the PCR system to work accurately. To create a good PCR primer pair, several factors must be considered, including base pair length, melting and annealing temperature, base pair repeats, etc. Carefully designed PCR primers increase sensitivity and specificity and reduce the effort spent on experimental optimization. The poorly designed primer and the lack of optimization of the reaction conditions probably lead to decreased technical accuracy and false positive or negative detection in the amplification of the target DNA fragments. Bioinformatics has become an essential tool for basic research and applied research in life sciences. Primer designing tools provide optimal and efficient design of primers by automating complex and accurate calculations in the shortest possible time.

Materials and methods: This review article is a content analysis study performed by searching Polymerase Chain Reaction (PCR), PCR type, and primer design for PCR in related articles on Google Scholar, Web of Science, PubMed and Scopus.

Results: This article aims to provide an almost complete guide for designing efficient and optimal primers for PCR and qPCR analyses by reviewing the PCR method, its types and applications and using the links and web-based services. In this regard, in the first part of the article, various methods, such as standard PCR, reverse transcription PCR (RT-PCR), quantitative PCR (qPCR), combined RT-PCR/qPCR, etc., will be explained with suitable figures. The following summarizes the use of PCR types, emphasizing cereal research. In the end, primer design methods, especially for qPCR, classification and review of existing software and their capabilities, methods and software for testing the features of primers to obtain maximum specificity and PCR efficiency, extracting the gene sequence for PCR primer designing is presented with practical examples.

Conclusion: A PCR with weak primers can produce little or no product due to non-specific amplification or primer dimer formation. Several online tools were introduced that are used to prepare effective primers for PCR in the field of molecular biology.

Keywords: Bioinformatics, Conventional PCR, Real-Time PCR, Primer design.

Article Type: Review Article

Article history: Received: 30 Jul 2023, Revised: 23 Aug 2023, Accepted: 21 Sept 2023, Published online: 23 Sept 2023

Cite this article: Bordbar, M., Darvishzadeh, R., Jafari, M. & Kahrizi, D. (2023). Polymerase Chain Reaction: Types, Applications, Bioinformatics Tools and Guideline for Primer Design with emphasis on cereals. *Cereal Biotechnology and Biochemistry*, 2(3), 340-390. DOI: [10.22126/cbb.2024.10070.1063](https://doi.org/10.22126/cbb.2024.10070.1063)



© The Author(s).
[10.22126/cbb.2024.10070.1063](https://doi.org/10.22126/cbb.2024.10070.1063)

Publisher: Razi University



بیوتکنولوژی و بیوشیمی غلات

شاپا الکترونیکی: ۵۱۷۰-۲۷۸۳



بیوتکنولوژی و بیوشیمی غلات

Homepage: <https://cbb.razi.ac.ir>

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز: انواع، کاربردها، ابزارهای بیوانفورماتیک و راهنمای طراحی آغازگر با تأکید بر غلات

مونا بردبار^۱، رضا درویش‌زاده^۲✉، مراد جعفری^۳ و دانیال کهریزی^۴

^۱ دانشجوی دکتری ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، گروه تولید و ژنتیک گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

^۲ نویسنده مسئول مکاتبات، استاد، گروه تولید و ژنتیک گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

^۳ دانشیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

^۴ استاد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

✉ نویسنده مسئول: darvishzadeh@urmia.ac.ir

چکیده

مقدمه: واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) یک فناوری بسیار مهم و کاربردی در زمینه‌های مختلف علوم زیستی و پزشکی می‌باشد. با استفاده از این تکنیک می‌توان در شرایط درون‌شیشه‌ای (*in vitro*) با حداقل مقدار DNA، میلیون‌ها نسخه از یک الگوی مشخص را تکثیر نمود. این امر پیشرفت‌های عمده‌ای در زیست‌شناسی مولکولی و پزشکی رقم زده است. این تکنیک، کاربردهای بسیار متنوعی در علوم زیستی دارد. آغازگرهای PCR جزء جدایی‌ناپذیر PCR هستند. آغازگرهایی که به خوبی طراحی شوند، به سیستم PCR اجازه می‌دهند تا با دقت کار کند. برای ایجاد یک جفت آغازگر خوب PCR، عوامل متعددی از جمله طول جفت باز، دمای ذوب و اتصال، تکرار جفت باز و غیره باید در نظر گرفته شوند. آغازگرهای PCR که با دقت طراحی می‌شوند، نه تنها حساسیت و اختصاصیت را افزایش می‌دهند، بلکه تلاش صرف شده برای بهینه‌سازی تجربی را نیز کاهش می‌دهند؛ در حالیکه طراحی ضعیف آغازگر همراه با عدم بهینه‌سازی شرایط واکنش احتمالاً منجر به کاهش دقت فنی و تشخیص مثبت یا منفی کاذب در تکثیر قطعات DNA هدف می‌شود. بیوانفورماتیک نه تنها برای تحقیقات پایه، بلکه برای تحقیقات کاربردی در علوم زیستی به ابزاری اساسی تبدیل شده است. ابزارهای طراحی آغازگر با خودکارسازی محاسبات پیچیده و دقیق در کمترین زمان ممکن طراحی بهینه و کارآمد آغازگرها را فراهم می‌کنند.

مواد و روش‌ها: مقاله حاضر یک مقاله مروری می‌باشد که به شیوه تحلیل محتوا (Content analysis) با جستجوی کلید واژه‌های واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR)، انواع PCR، طراحی آغازگر برای PCR در مقاله‌های مرتبط در پایگاه‌های اینترنتی Scopus، PubMed، Web of science، Google scholar به دست آمده است.

یافته‌ها: این مقاله قصد دارد با مروری بر روش PCR، انواع و کاربردهای آن و با استفاده از پیوندها و خدمات موجود در وب، راهنمایی تقریباً کاملی به منظور طراحی آغازگرهای کارآمد و بهینه برای آنالیزهای PCR و qPCR ارائه نماید. در این راستا، در قسمت اول مقاله انواع روش‌ها از قبیل PCR استاندارد، PCR رونویسی معکوس (RT-PCR)، PCR کمی (qPCR)، RT-PCR/qPCR ترکیبی و ... با ارایه شکل‌های مناسب توضیح داده شده است. در ادامه کاربرد انواع PCRها با تأکید بر تحقیقات غلات خلاصه شده است. در انتها، روش‌های طراحی آغازگر خصوصاً برای qPCR، طبقه‌بندی و بررسی نرم‌افزارهای موجود و قابلیت‌های آن‌ها، روش‌ها و نرم‌افزارهای بررسی خصوصیات آغازگرها برای کسب حداکثر اختصاصیت و کارایی PCR، نحوه استخراج توالی ژن در طراحی آغازگر برای PCR با ارایه مثال‌های عملی ارایه شده است.

نتیجه‌گیری: یک PCR با آغازگرهای ضعیف به دلیل تکثیر غیر اختصاصی و یا تشکیل دایمر آغازگر، می‌تواند محصول کمی داشته باشد یا اصلاً محصولی به دنبال نداشته باشد. ابزارهای آنلاین متعددی معرفی شدند که برای تهیه آغازگرهای مؤثر برای PCR در زمینه زیست مولکولی استفاده می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: بیوانفورماتیک، PCR استاندارد، PCR در زمان واقعی، طراحی پرایمر.

نوع مقاله: مقاله مروری

نوع مقاله: دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۰۸ **اصلاح:** ۱۴۰۲/۰۶/۰۱ **پذیرش:** ۱۴۰۲/۰۶/۳۰ **انتشار آنلاین:** ۱۴۰۲/۰۷/۰۱

استناد: بردبار، م.، درویش‌زاده، ر.، جعفری، م. و کهریزی، د. (۱۴۰۲). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز: انواع، کاربردها، ابزارهای بیوانفورماتیک و راهنمای طراحی آغازگر با

تأکید بر غلات. *بیوتکنولوژی و بیوشیمی غلات*، ۲(۳)، ۳۹۰-۳۴۰. DOI: [10.22126/cbb.2024.10070.1063](https://doi.org/10.22126/cbb.2024.10070.1063)



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه رازی

مقدمه

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) یک فناوری بسیار مهم و کاربردی در زمینه‌های مختلف علوم زیستی و پزشکی می‌باشد. با استفاده از این تکنیک می‌توان در شرایط درون‌شیشه‌ای (*in vitro*) با حداقل مقدار DNA، میلیون‌ها نسخه از یک الگوی مشخص را تکثیر نمود. این امر پیشرفت‌های عمده‌ای در زیست‌شناسی مولکولی و پزشکی رقم زده است. آغازگرهای PCR جزء جدایی‌ناپذیر PCR هستند. آغازگرهایی که به خوبی طراحی شوند، به سیستم PCR اجازه می‌دهند تا با دقت کار کند. برای ایجاد یک جفت آغازگر خوب PCR، عوامل متعددی از جمله طول جفت باز، دمای ذوب و اتصال، تکرار جفت باز و ... باید در نظر گرفته شوند. توسعه‌دهندگان این فناوری، این امکان را برای محققان فراهم می‌کنند که زمان کمتری را برای طراحی و بهینه‌سازی آغازگرها صرف نمایند و زمان بیشتری را به جنبه‌های دیگر اهداف تحقیقاتی خود اختصاص دهند.

در زمینه ژنتیک مولکولی با پیشنهاد مدل ساختاری مارپیچ دوگانه DNA توسط James D. Watson و Francis Crick در سال ۱۹۵۳ قدم بزرگی نهاده شد (Watson and Crick, 1953). به دنبال آن در اوایل دهه ۱۹۶۰، پیشرفت‌های چشمگیری در زمینه روشن شدن کدهای ژنتیکی حاصل شد و از الیگونوکلوئوتیدهای مصنوعی به عنوان الگوهای آغازگر برای DNA پلیمرز توسط H. Gobind Khorana استفاده شد که منجر به اهدای جایزه نوبل در سال ۱۹۶۸ شد (Khorana et

al., 1976). در سال ۱۹۷۱، یک محقق در آزمایشگاه Khorana، تکثیر بخشی از DNA توسط یک سیستم دو آغازگری را توصیف کرد (Kleppe et al., 1971). واکنش زنجیره‌ای پلیمرز یک روش درون‌شیشه‌ای است که امکان تکثیر یک قطعه DNA معین را به دامنه میلیاردی برابر فراهم می‌کند (Mullis & Faloona, 1987; Saiki et al., 1988).

تکنیک PCR توسط Kary Banks Mullis در سال ۱۹۸۳ اختراع شد، در حالی که وی به عنوان بیوتکنولوژیست در شرکت Cetus، شهر Emeryville، کالیفرنیا، ایالات متحده کار می‌کرد. در سال ۱۹۸۵، یک سرمایه‌گذاری مشترک بین شرکت Cetus و Perkin-Elmer، یکی دیگر از شرکت‌های بیوتکنولوژی مستقر در ایالات متحده برای طراحی ابزارهای ترموسایکلر و معرف برای PCR، تأسیس شد و در سال ۱۹۸۷، در یک مطبوعات خبری در دسترس بودن PCR-1000 "Thermal Cycler" و DNA AmpliTaq Polymerase" به صورت تجاری منتشر شد. این اختراع برای وی جایزه نوبل شیمی و همچنین جایزه ژاپن در سال ۱۹۹۳ را به ارمغان آورد (Shampo & Kyle, 2002).

اجزای ضروری یک PCR استاندارد

آنزیم Taq یا سایر پلی‌مرازهای حرارتی، در سال ۱۹۶۹، فردی به نام Thomas D. Brock گونه جدیدی از باکتری گرمادوست *Thermus aquaticus* را از حوضه آشفشان پارک ملی Yellowstone ایالت وایومینگ

جداسازی کرد (Brock & Freeze, 1969). در سال ۱۹۷۶، آنزیم DNA پلی‌مرز مقاوم در برابر حرارت، Taq polymerase، از *T. aquaticus* جدا شد (Singh et al., 2014). در سال ۱۹۸۶، Henry Erlich استفاده از پلیمرز Taq در PCR را اعلام کرد، زیرا می‌تواند فعالیت خود را در طیف گسترده‌ای از درجه حرارت‌های بالا حفظ کند. افزودن آن به مخلوط PCR با حذف نیاز به افزودن دستی DNA پلیمرز تازه از *E. coli*، در هر چرخه واکنش به دلیل عدم توانایی تحمل گرمایش و خنک سازی سریع، کل روند PCR را کوتاه کرد (Saiki et al., 1985). مسیر جنبشی پلیمرز Taq در سنتز رشته الگو با ترکیب نوکلئوتیدها توسط Rothwell و Waksman، در سال ۲۰۰۵ توصیف شد (Rothwell & Waksman, 2005). بسیاری دیگر از DNA پلی‌مرزهای مقاوم به حرارت نیز کشف شده‌اند که می‌توانند با توجه به کاربردهای آن‌ها مورد استفاده قرار گیرند (جدول ۱). معمولاً ۱ تا ۱/۵ واحد آنزیمی از Taq DNA پلیمرز در ۵۰ میکرولیتر مخلوط واکنش مورد نیاز است. با این حال، اگر بازدارنده‌ها (به عنوان مثال خلوص کم DNA الگو) در مخلوط واکنش وجود داشته باشد، ممکن است مقادیر بیشتری از Taq DNA Polymerase (۲ تا ۳ واحد) برای دستیابی به عملکرد بهتر محصولات تکثیر شده مورد نیاز باشد.

جدول ۱- DNA پلی‌مرزهای مقاوم به حرارت

Table 1. Heat-resistant DNA polymerases

پلی‌مرز (منبع) Polymerases (Source)	زیستگاه Habitat	کاربرد Applications	منبع References
Tfl (<i>Thermus Flavus</i>)	Not defined	Tolerate higher concentrations of blood, high temperature DNA sequencing	Kaledin et al., 1980
T4 (Bacteriophage T4 of <i>E. coli</i>)	Not defined	3' Overhang and 5' fill-in to form blunt ends, probe labelling, single strand deletion subcloning, second strand synthesis in site-directed mutagenesis	Dale et al., 1985; Kunkel et al., 1987
T7 (Bacteriophage T7, and trxA gene of <i>E. coli</i>)	Not defined	Strand extensions in site-directed mutagenesis, in situ detection of apoptotic DNA fragments	Bebenek et al., 1989; Wood et al., 1993
Vent/Tli (<i>Thermococcus litoralis</i>)	Deep sea Hydrothermal vents	5-15-Fold higher activity than Taq DNA polymerase, 3'→5' exonuclease activity	Mattila et al., 1991
rTth (<i>Thermus thermophilus</i>)	Hot spring in Izu, Japan	Tolerate high concentration of blood, reverse transcriptase activity in addition to a 5'→3' polymerase activity, 5'→3' exonuclease activity	Myers & Gelfand, 1991
Ultma (<i>Thermotoga maritime</i>)	Marine geothermal area near Vulcano, Italy	3'-5' Exonuclease activity	Diaz & Sabino, 1998
KOD (<i>Thermococcus kodakaraensis</i>)	Solfatara on Kodakara Island, Kagoshima, Japan	High processivity, fidelity, and extension rate without the complexity introduced by terminal transferase activity	Bensona et al., 2003
Pwo (<i>Pyrococcus woesei</i>)	Marine sediments, beach of Porto Levante, Vulcano Island, Italy	3'-to-5' Exonuclease activity, tolerate high concentration of blood	Cahill et al., 2003; Kanoksilapatham et al., 2004
Pfu (<i>Pyrococcus furiosus</i>)	Marine sediments,	3'-to-5' Exonuclease activity, lowest error rate	Cahill et al., 2003; Kanoksilapatham et al.,

beach of Porto Levante, Vulcano Island, Italy	2004
HotTub (<i>Thermus ubiquitous</i>)	Not defined
Tolerate high concentration of blood, cDNA synthesis, Kermekchiev <i>et al.</i> , 2009 second strand synthesis in site- directed mutagenesis, production of ssDNA probes by primer extension.	

dNTP ممکن است منجر به افزایش اشتباه در ترکیب

نوکلئوتیدها در رشته جدید شود.

بافر *PCR*: فعالیت هر آنزیمی در یک شرایط ویژه‌ای در بالاترین حد خود است. در واقع، بافرها کمک می‌کنند که این شرایط خاص ایجاد و تا انتهای واکنش حفظ شود. بافر آنزیم Taq پلی‌مراز که معمولاً به صورت غلظت چند برابری (X) است، شامل Tris HCl، KCl و معمولاً $MgCl_2$ می‌باشد. Tris HCl به پایداری pH بین ۸ تا ۹/۵ کمک می‌کند. در واقع دو عامل در این بافر نقش مهمی دارند: اولی وجود یون پتاسیم که منجر به استحکام فرایند اتصال آغازگرها به الگو در مرحله اتصال می‌شود و دیگری وجود یون منیزیم که به عنوان کوفاکتور آنزیم پلی‌مراز، به آن متصل خواهد شد تا آن را به بالاترین فعالیت ساختاری خود برساند.

منیزیم کلرید: در طول همانندسازی، یک جفت الکترون تنها در منطقه $3'-OH$ رشته در حال رشد ظاهر می‌شود که برای تشکیل پیوند فسفودی‌استر توسط Taq Polymerase استفاده می‌شود. از این جفت الکترون تنها، برای تبدیل dNTP به dNMP در اثر حمله هسته‌ای به اتم فسفات از آلفا- فسفات، آزاد شدن پیرو فسفات (بتا و گاما) استفاده می‌شود. اما dNTP ورودی دارای چهار بار منفی است و به دلیل وجود این بارهای منفی، حمله هسته‌ای عقب می‌ماند. بنابراین، Mg^{2+} با شلاته کردن

DNA // الگو: معمولاً ۱۰ پیکوگرم تا یک نانوگرم از DNA الگو برای DNA پلاسمید یا فاژ و یک نانوگرم تا یک میکروگرم برای DNA ژنومی در یک مخلوط واکنش کل (۵۰ میکرولیتر) مورد نیاز است. DNA الگوی بیشتر از این مقدار، منجر به تولید محصولات غیر اختصاصی *PCR* می‌شود. علاوه بر این، DNA الگو باید دارای خلوص قابل قبولی باشد. به عنوان مثال اختلاط مقدار کمی از فنل، EDTA، پروتئیناز K و غیره با DNA استخراج شده به شدت مانع از عمل DNA پلی‌مراز می‌شود. با این حال، رسوب DNA با اتانول و شستشوی رسوب DNA (DNA pellet) با اتانول ۷۰٪، معمولاً در حذف این آلاینده‌ها از نمونه DNA مؤثر است (web.stanford.edu).

آغازگرها: مهمترین نکته برای تکثیر یک قطعه‌ی هدف در یک ناحیه از ژنوم، طراحی آغازگر است. یک آغازگر موفق عمدتاً برای دستیابی به دو هدف یعنی اختصاصیت و کارایی طراحی می‌شود. در صورت طراحی دقیق آغازگرها برای جلوگیری از نتایج مثبت کاذب، می‌توان به هر دوی این اهداف دست یافت.

دئوکسی‌ریبونوکلئوتیدها (*dNTPs*): غلظت هر dNTP در مخلوط واکنش نهایی معمولاً ۲۰۰ میکرومولار است و غلظت هر چهار نوع dNTP (dATP، dCTP، dGTP و dTTP) باید برابر باشد. عدم دقت در غلظت حتی یک

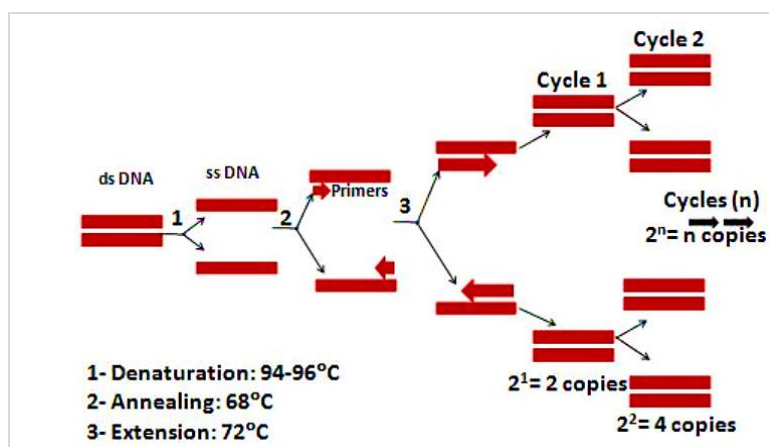
(<http://www.promega.com/paguide/chap1.htm>)

دامنه توصیه شده غلظت $MgCl_2$ در مخلوط واکنش استاندارد ۴-۱ میلی مولار است (web.stanford.edu).

قاعده کلی، روش کار و تشخیص بعد از تکثیر PCR

اصول: اصل PCR بر این واقعیت استوار است که در دمای واسرشته‌سازی بالا نزدیک به ۹۵ درجه سانتی‌گراد، دو رشته مولکول DNA هدف، به دلیل شکستن پیوندهای A-T و G-C جدا می‌شوند. در دمای اتصال در محدوده ۵۰-۶۵ درجه سانتی‌گراد، آغازگرهای رو به جلو و معکوس در انتهای ۳' مناطق کناری مولکول DNA هدف تک رشته جدا شده، متصل می‌شوند. سپس آنزیم Taq پلیمراز با افزودن dNTP و بازسازی ساختار مولکول دو رشته، رشته DNA جدید را در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد گسترش می‌دهد. این فرآیند چندین بار تکرار می‌شود و هزاران نسخه از مولکول DNA هدف تولید می‌شود (شکل ۱) (Müller, 2001).

بارهای اضافی منفی dNTP ورودی، باعث تسهیل حمله هسته‌ای و تشکیل پیوند و از این طریق پلیمریزاسیون می‌شود. همچنین، هر آنزیمی برای فعال شدن خود به فاکتور نیاز دارد و یون‌های فلزی Mg^{2+} به عنوان کوفاکتور ضروری DNA پلی‌مراز در PCR عمل می‌کنند. یون Mg^{2+} با پیوستن و ایجاد نیروهایی که پلی‌مراز را قوی‌تر می‌کند، توانایی پیوستن به dNTP را دارد اما با اختصاصیت بالا وارد پروتئین می‌شود. بنابراین، افزایش غلظت Mg^{2+} در PCR، منجر به باند قوی می‌شود اما احتمال تکثیر غیراختصاصی نیز افزایش می‌یابد. برای این منظور، غلظت آن باید برای هر آغازگر و الگو بهینه شود. همچنین، سایر اجزای واکنش PCR از جمله آغازگرها، الگو، محصولات PCR و dNTP به یون Mg^{2+} متصل می‌شوند. از این میان، dNTP ها میل بیشتری برای اتصال به یون Mg^{2+} دارند و چون یون آزاد Mg^{2+} به عنوان کوفاکتور آنزیمی در PCR مورد نیاز است، غلظت کل یون Mg^{2+} باید از غلظت کل dNTP فراتر رود



شکل ۱- اصول PCR

Fig 1. Principles of PCR

روش کار: واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵-۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵-۳ دقیقه اتفاق می‌افتد، جایی که دو رشته مولکول DNA هدف از هم جدا می‌شوند. واسرشته‌سازی اولیه با ۳۵-۳۰ چرخه شامل واسرشته‌سازی، اتصال و گسترش ادامه می‌یابد. تعداد چرخه‌های PCR به مقدار DNA الگو در مخلوط واکنش و عملکرد بازده محصول PCR بستگی دارد. واسرشته‌سازی شامل گرم کردن مولکول DNA هدف دو رشته‌ای در دمای ۹۵-۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۵-۳۰ ثانیه است. مرحله اتصال اجازه می‌دهد تا آغازگرهای مکمل رو به جلو و معکوس، به مناطق کنار ۳' با درجه حرارت ۶۵-۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۵-۳۰ ثانیه متصل شوند. مرحله الصاق با افزودن dNTPهای مکمل به رشته‌های جدید در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۵-۳۰ ثانیه اتفاق می‌افتد. بعد از آخرین چرخه، نمونه‌ها معمولاً در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵-۵ دقیقه نگهداشته می‌شوند تا انتهای بیرون‌زده محصولات PCR تازه سنتز شده، پُر شوند. در نهایت، نگهداری یا ذخیره‌سازی محصولات PCR در چهار درجه سانتی‌گراد انجام می‌گیرد.

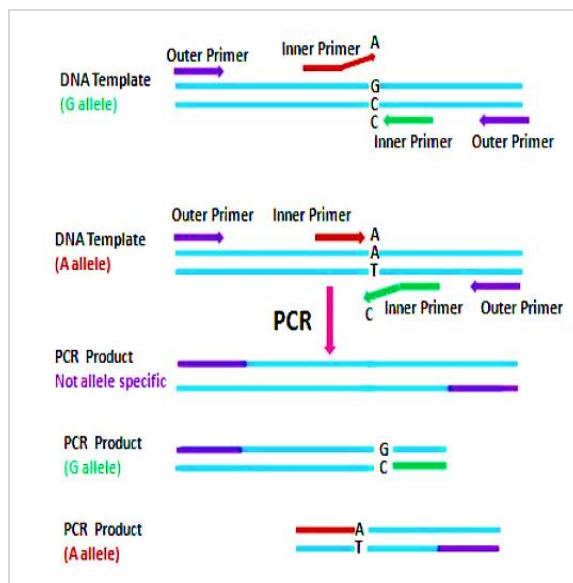
تشخیص بعد از تکثیر: محصول PCR تکثیر شده توسط الکتروفورز ژل آگارز به دنبال تاباندن اشعه ماورای بنفش (UV) به ژل آگارز آغشته به محلول اتیدیوم بروماید (EtBr) مشاهده می‌شود. از سالیان متمادی برای مشاهده اسیدهای نوکلئیک در ژل آگارز از EtBr استفاده می‌شود.

EtBr یک ماده جهش‌زایی قوی است و باعث جهش در سلول زنده می‌شود. از این‌رو امروزه از رنگ‌های قابل مشاهده با نور UV مانند رنگ DNA safe stain استفاده می‌شود.

با پیشرفت در زیست‌شناسی مولکولی و استفاده از تکنیک‌های مولکولی در حوزه‌های مختلف علوم زیستی و تغییرات در تکنیک پایه‌ای PCR انواع مختلف PCR ایجاد شد که می‌توان دسته‌بندی زیر را در نظر گرفت: (۱) انواع PCR استاندارد (۲) PCR رونویسی معکوس (RT-PCR) (۳) PCR در زمان واقعی یا PCR کمی (Quantitative PCR; qPCR) (۴) RT-PCR/qPCR به صورت ترکیبی.

PCR آل اختصاصی

PCR آل اختصاصی (Allele specific PCR) امکان شناسایی مستقیم جهش نقطه‌ای در DNA را فراهم می‌کند. این تکنیک نیاز به دانش قبلی از توالی DNA هدف مانند تفاوت بین آل‌ها و استفاده از آغازگر با عدم تطابق ۳' انتهایی شامل تغییرات تک نوکلئوتیدی دارد (Newton et al., 1989; Ugozzoli & Wallace, 1991). دو آغازگر اختصاصی آل، یکی برای هر آل SNP مورد نیاز است، که حاوی یکی از دو نوکلئوتید چند شکلی در انتهای ۳' باشد (شکل ۲). ممکن است از یک آغازگر متداول رو به جلو یا معکوس استفاده شود. به طور کلی، برای تشخیص هر دو آل SNP به دو واکنش PCR مجزا نیاز است (You et al., 2008).



شکل ۲- PCR ال اختصاصی

Fig 2. Allele-specific PCR

نابرابر استفاده می‌شود (شکل ۳)، زیرا چنین تکثیر

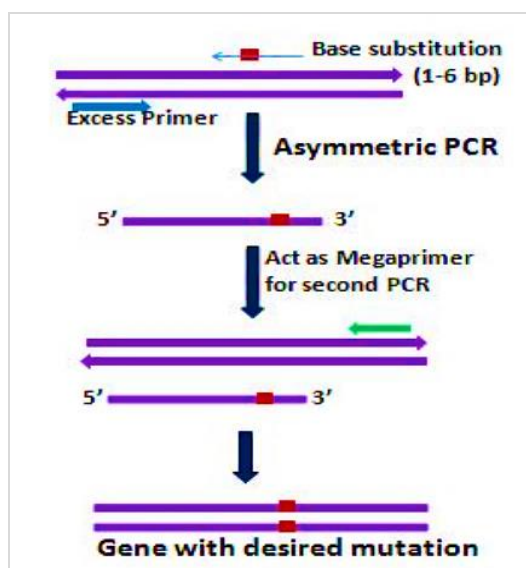
حساب‌شده با استفاده از آغازگر اضافی اتفاق می‌افتد

(Innis et al., 1988).

PCR نامتقارن (Asymmetric PCR)

از PCR نامتقارن برای تکثیر ترجیحی فقط یک رشته از

مولکول DNA هدف با استفاده از غلظت‌های آغازگر



شکل ۳- PCR نامتقارن

Fig 3. Asymmetric PCR

PCR کلونی (Colony PCR)

کلونی PCR یا PCR کل سلول (Whole cell PCR) نوعی PCR است که به طور معمول در مطالعات ژنومیک باکتریایی استفاده می‌شود. درج پلاسمیدهایی با تعداد کپی بالا مانند pUC18، pUC19 یا pBluescript در باکتری‌ها به طور معمول برای اهداف مختلف انجام می‌شود (Kilger *et al.*, 1997) و PCR کلونی به سرعت این درج‌های پلاسمید را غربال می‌کند، بدون اینکه DNA پلاسمیدی از کلونی‌های باکتری مورد بررسی استخراج شود. این روش مزایای مختلفی نسبت به روش‌های سنتی غربالگری سفید-آبی (Blue-white test) دارد، زیرا می‌تواند اندازه درج و جهت‌گیری را در ناقل تعیین کند (Plourde-Owobi *et al.*, 2005). در حقیقت، کلونی‌های سفید با روش غربالگری سفید-آبی سنتی باید با روش PCR کلونی نیز غربال شوند تا از تعیین توالی کلون‌های مثبت کاذب جلوگیری شود. علاوه بر این، PCR کلونی به تولید مقدار کافی محصول PCR مورد نظر برای تعیین توالی نیز کمک می‌کند (Carracedo, 2005).

PCR دژنره (Degenerate PCR)

این یک نوع PCR است که از آغازگرهای دژنره (منحط) برای تکثیر توالی‌های ناشناخته DNA، مربوط به یک توالی DNA شناخته شده استفاده می‌کند. آغازگرهای دژنره بر اساس هومولوگ‌های توالی ژنی شناخته شده

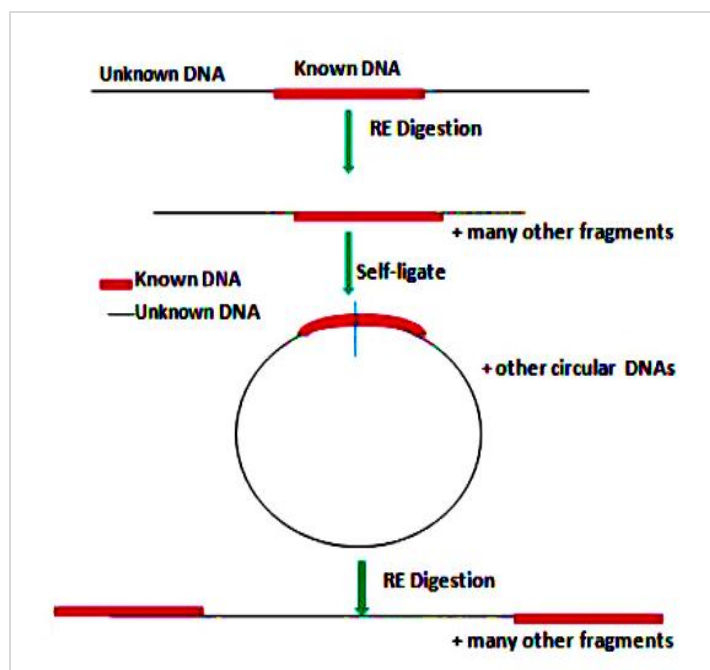
طراحی می‌شوند. این تکنیک امکان شناسایی اعضای جدید یک خانواده ژنی یا ژن‌های ارتولوگ (Orthologous genes) از ارگانسیم‌های مختلف را فراهم می‌کند (Lang & Orgogozo, 2011).

PCR هات استارت (Hotstart PCR)

این روش شامل همان مراحل PCR معمولی است، با این تفاوت که Taq پلی‌مراز پس از رسیدن بقیه اجزای PCR به دمای ذوب DNA اضافه می‌شود؛ به طوری که از تکثیر غیراختصاصی در دماهای پایین جلوگیری می‌کند. متناوباً، بازدارنده‌هایی با پیوند کوالانسی که تنها پس از رسیدن به دمای ذوب (Tm) از Taq پلی‌مراز جدا می‌شوند، نیز می‌توانند اضافه شوند (Chou *et al.*, 1992).

PCR معکوس (Inverse PCR)

در حالی که PCR معمولی برای هر دو انتهای ۳' DNA هدف نیاز به جفت آغازگر دارد، PCR معکوس اجازه می‌دهد تا DNA با تنها یک توالی شناخته شده تکثیر شود (شکل ۴). این روش به توالی هضم (Digestion) و اتصال مجدد (Self-ligation) نیاز دارد که منجر به تشکیل یک قطعه DNA حلقه‌ای می‌شود که می‌تواند بعداً به عنوان بخشی از توالی DNA شناخته شده برای PCR آغاز شود (Ochman *et al.*, 1988).



شکل ۴- PCR معکوس

Fig 4. Inverse PCR

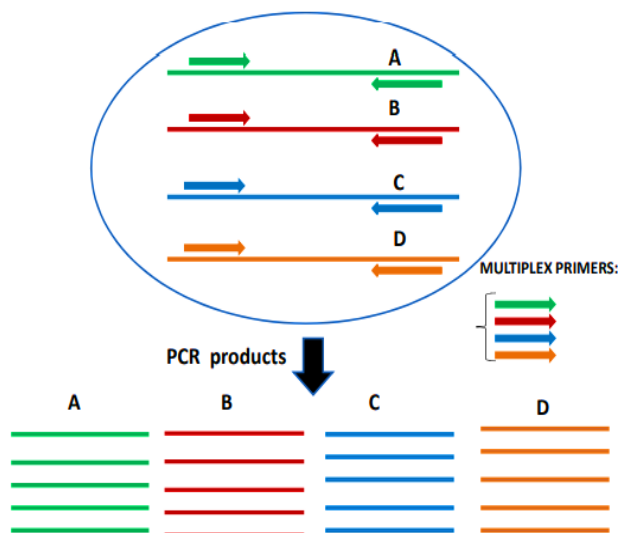
PCR چندگانه (Multiplex PCR)

PCR چندگانه در اصطلاح، شکل تغییریافته‌ای از PCR به منظور شناسایی سریع حذف‌ها یا تکرارها در یک ژن بزرگ است. در سال ۱۹۸۸، حذف در ژن دیستروفین برای اولین بار با روش PCR چندگانه شناسایی شد (Js, 1988). مخلوط PCR چندگانه از مجموعه آغازگرهای متعدد در یک مخلوط واکنش PCR استفاده می‌کند تا آمپلیکون‌هایی (محصولات تکثیر شده) با اندازه‌های مختلف را که برای توالی‌های مختلف DNA خاص است، تولید کند. این نوع PCR چندین ژن را همزمان در یک آزمایش واحد هدف قرار می‌دهد که در غیر اینصورت، جهت انجام چندین بار به زمان بیشتری لازم است (شکل ۵). طول جفت باز آمپلیکون‌ها باید به اندازه کافی متفاوت باشد تا بتواند به خوبی از هم تفکیک شود و در صورت مشاهده با ژل الکتروفورز، باندهای متمایزی را تشکیل

PCR مینی‌آغازگر (Miniprimer PCR)

روش‌های استاندارد PCR نیازمند Taq پلی‌مرازی است که می‌تواند به آغازگرهای با طول ۲۰ تا ۳۰ نوکلئوتید متصل شود. کارایی سنتز DNA نسبت به سایر آنزیم‌های تکثیری، به دلیل نیاز به وجود آغازگرهای با طول بیشتر، کمتر از Taq پلی‌مراز است (Wang et al., 2004). بنابراین، روش PCR جدیدی به نام PCR مینی‌آغازگر توسعه یافته است. در این نوع PCR، از Taq پلی‌مراز مهندسی شده و از "مینی‌آغازگر" های با طول ۱۰ نوکلئوتید استفاده می‌شود. PCR مینی‌آغازگر در درک زیست‌شناسی میکروبی برای شناسایی توالی DNA محافظت شده مانند 16S rRNA (و 18S rRNA یوکاریوتی) مفید است که با آغازگرهای استاندارد امکان‌پذیر نیست (Isenbarger et al., 2008).

دهد. PCR چندگانه با موفقیت در بسیاری از زمینه‌های آزمایش DNA مانند تجزیه و تحلیل حذف‌ها، جهش‌ها و چند ریختی‌ها، ریزماهواره‌ها و SNP‌ها اعمال شده است (Hayden et al., 2008).



شکل ۵- PCR چندگانه

Fig 5. Multiplex PCR

PCR آشیانه‌ای (Nested PCR)

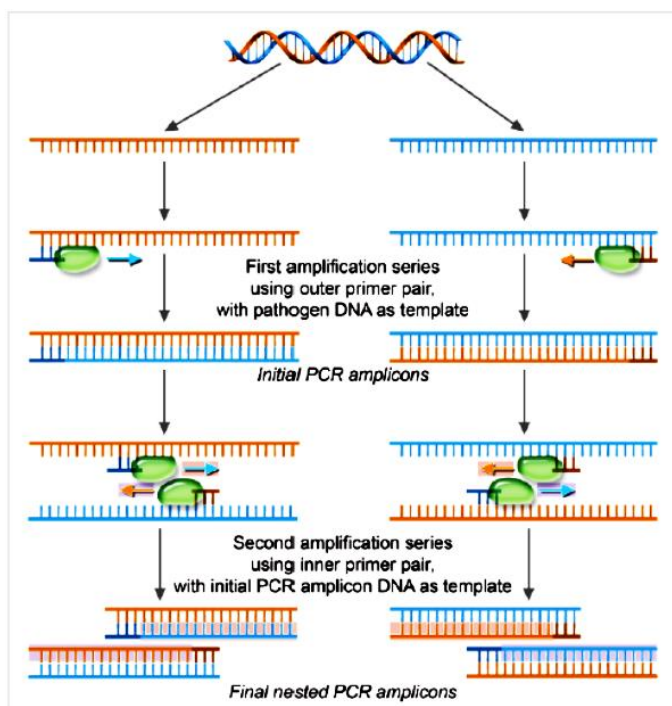
آشیانه‌ای می‌تواند در شرایطی که نیاز فراوانی به حساسیت و اختصاصیت واکنش باشد، برای جبران چنین اشتباهاتی مورد استفاده قرار گیرد. البته استفاده از آغازگرهایی که بتوانند به خوبی به توالی هدف متصل شوند، نیاز به استفاده از این تکنیک را در بسیاری از شرایط از بین می‌برد.

در PCR آشیانه‌ای، دو فرآیند PCR متوالی که هر کدام متشکل از حدود ۳۰ چرخه است، انجام می‌گیرد. در واکنش PCR اول، از یک جفت آغازگر که نواحی خارجی‌تر نسبت به توالی موردنظر محقق را هدف قرار می‌دهند، استفاده می‌شود. در واکنش دوم، جفت آغازگرهای Nested که به نواحی داخلی‌تری نسبت به آغازگرهای اول متصل می‌شوند، مورد استفاده قرار می‌-

PCR آشیانه‌ای نوعی از PCR است که هدف از انجام آن کاهش احتمال ایجاد محصولات غیراختصاصی واکنش و افزایش حساسیت آن است. این تکنیک در سال ۱۹۹۸ توسط Strom و Rechitsky ارائه شده است و کلمه Nested اشاره به طرز قرارگیری آغازگرهای مورد استفاده در واکنش اول و دوم نسبت به هم دارد. این تکنیک در صورتی به کار می‌رود که نیاز فراوانی به حساسیت و اختصاصیت در PCR احساس شود. مشکلی که معمولاً در PCR عادی رخ می‌دهد، اتصال نادرست آغازگرها و تکثیر قطعات غیراختصاصی نسبت به آغازگر مورد نظر است. هرچه تعداد چرخه‌های انجام گرفته در PCR بیشتر باشد، احتمال اینگونه خطاها نیز افزایش می‌یابد. PCR

الگوی تولید شده در واکنش PCR قبلی متصل می‌شوند. در صورتی که اتصال این آغازگرهای داخلی منجر به تولید محصول شود، نشان‌دهنده و مؤید درست انجام گرفتن واکنش اول و اختصاصی بودن آمپلیکون حاصل از آن است. (شکل ۶).

گیرند و در نتیجه محصولات PCR کوتاه‌تر از واکنش اول خواهند بود. در واقع، دو جفت آغازگر برای تکثیر یک مکان (لوکوس) واحد به کار می‌رود. به عبارت دیگر، PCR آشیانه‌ای نوعی از PCR است که طی آن آغازگرها (با توجه به نحوه طراحی آنها) به نواحی داخلی‌تر قطعات



شکل ۶- PCR آشیانه‌ای. آمپلیکون (محصول) تولید شده از PCR اول به عنوان الگو برای PCR دوم استفاده می‌شود

Fig 6. Nested PCR. The amplicon produced from the first PCR is used as a template for the second PCR

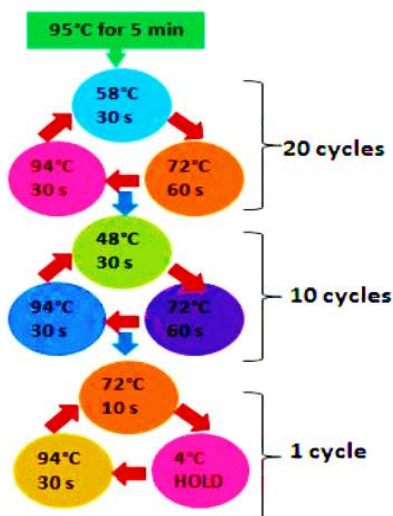
الگو و کاهش حساسیت PCR (Efficiency) می‌گردد اما اختصاصیت تکثیر افزایش می‌یابد. در حالیکه دماهای پایین سبب افزایش اتصال آغازگر به محل‌های غیراختصاصی شده و اختصاصیت PCR (Specificity) را کاهش می‌دهد (ولی حساسیت افزایش می‌یابد). تاچ‌داون PCR بر این اساس است که به جای استفاده از یک دمای

تاچ‌داون PCR (Touchdown PCR)

اگر وضعیتی پیش بیاید که در آن تقویت غیراختصاصی با تغییر دمای اتصال و/یا غلظت یون Mg^{2+} قابل کنترل نباشد، می‌توان از تکنیکی به نام "تاچ‌داون PCR" استفاده کرد. دماهای بالای اتصال، سبب کاهش اتصال آغازگر به توالی

می‌دهد. تاج داون PCR را می‌توان برای مشکلات مختلف PCR استفاده کرد. حتی غلظت‌های کمتر از حد مطلوب $MgCl_2$ و dNTPها را جبران می‌کند. همچنین مشکلات ناشی از عدم تطابق آغازگر و الگو را می‌توان با استفاده از تاج داون PCR برطرف نمود.

اتصال مشخص، دمای اتصال آغازگرها در ۵ تا ۱۰ سیکل اول PCR در یک بازه دمایی بین ۳ تا ۱۰ درجه سانتیگراد بالاتر از T_m مورد نظر تنظیم می‌شود و سپس برای ۲۰-۳۰ چرخه باقی مانده دمای اتصال به دمای T_m مورد نظر کاهش داده می‌شود (Don et al., 1991). شکل ۷ شماتیکی از مراحل انجام تاج‌داون PCR را نشان



شکل ۷- مراحل Touchdown PCR
Fig 7. Touchdown PCR steps

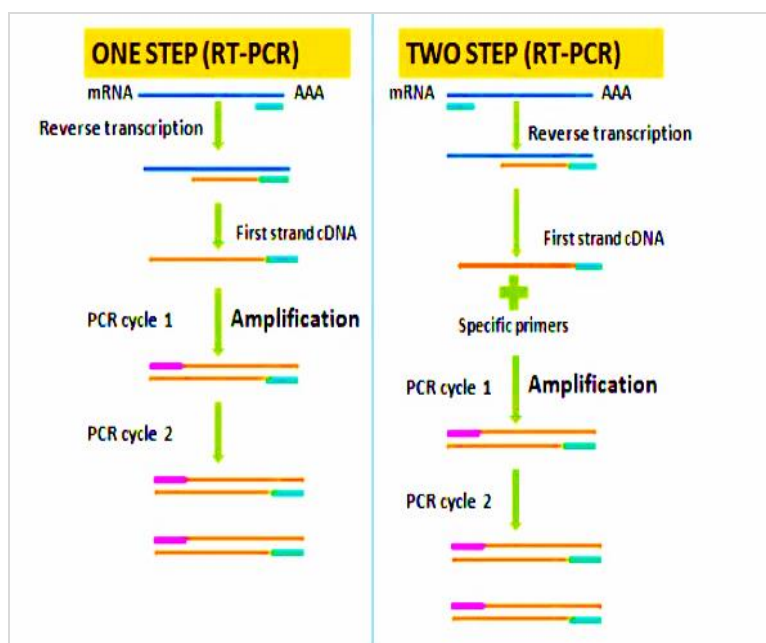
(Baltimore, 1970). آنزیم ترنس کریپتاز معکوس دارای عملکرد چندگانه شامل فعالیت یک DNA پلی‌مراز وابسته به RNA، یک DNA پلی‌مراز وابسته به DNA و ریبونوکلاز H است که برای انجام رونویسی به صورت همگام کار می‌کنند. جدا از عملکرد در فرآیند رونویسی، رونوشت‌های معکوس رترو ویروسی دارای یک انتهای (دمین) متعلق به خانواده RNase H هستند که برای تکثیر آن‌ها حیاتی است. ایده رونویسی معکوس در ابتدا بسیار محبوب نبود زیرا با دگم (باور) مرکزی زیست-شناسی مولکولی مغایرت داشت اما سرانجام در سال

PCR رونویسی معکوس (RT-PCR)

این روش با ایجاد DNA مکمل (cDNA) از RNA با کمک آنزیم ترنس کریپتاز معکوس و به دنبال آن تکثیر cDNA با استفاده از PCR استاندارد، تشخیص کمی سطح بیان RNA را امکان‌پذیر می‌کند. Howard Temin از دانشگاه ویسکانسین-مدیسون ترنس کریپتاز معکوس را در ویروس (Rous sarcoma virus) RSV (Temin and Mizutani, 2010) کشف کرد که بعداً توسط David Baltimore در سال ۱۹۷۰ به طور مستقل از دو RNA، ویروس‌های تومور جدا شد

دو روش اصلی برای انجام RT-PCR وجود دارد؛ روش یک مرحله‌ای و روش دو مرحله‌ای (شکل ۸). در یک مرحله‌ای، تمام اجزای سازنده از جمله آغازگرهای اختصاصی در یک لوله واحد مانند واکنش PCR قرار می‌گیرند. در روش دو مرحله‌ای، اولین واکنش شامل تشکیل cDNA با کمک واکنش رونویسی معکوس جداگانه و سپس افزودن cDNA به واکنش PCR است.

۱۹۷۰ زمانی که دانشمندان هوارد تمین و دیوید بالتیمور هر دو به طور مستقل آنزیم مسئول رونویسی معکوس به نام ترنس کریپتاز معکوس را کشف کردند، پذیرفته شد. ترنس کریپتازهای معکوس رتروویروسی، از جمله (AMV) Moloney murine و Avian myeloblastosis virus (MMLV) leukemia virus مشخص‌ترین ترنس-کریپتازهای معکوس مورد استفاده در زمینه زیست‌شناسی مولکولی هستند.



شکل ۸- RT-PCR یک مرحله‌ای و دو مرحله‌ای

Fig 8. One-step and two-step RT-PCR

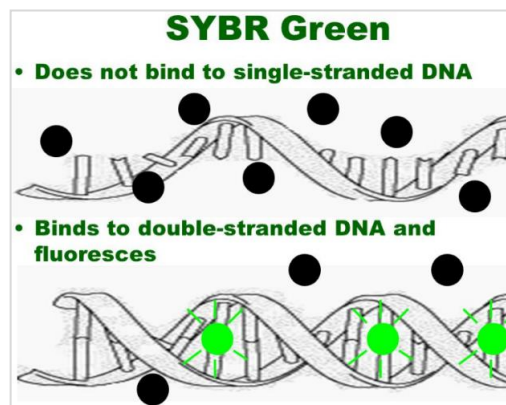
فلورسانس به سطحی افزایش می‌یابد که قابل اندازه‌گیری می‌شود و به عنوان چرخه آستانه (Cycle threshold; CT) یا نقطه عبور نامیده می‌شود. بنابراین، با استفاده از غلظت‌های مشخصی از DNA استاندارد، می‌توان مقدار DNA یا cDNA نمونه ناشناس را با رسم یک منحنی استاندارد لگاریتم غلظت در مقابل CT برآورد نمود. PCR

PCR زمان واقعی یا PCR کمی (qPCR)

qPCR در سال ۱۹۹۲ توسط Higuchi و همکارانش معرفی شد (Higuchi et al., 1992). در این تکنیک برای اندازه‌گیری تکثیر DNA در هر چرخه PCR، شدت فلورسنت رنگ گزارشگر، مانند SYBR Green I اندازه‌گیری می‌شود. در مرحله لگاریتم خطی تکثیر، شدت

سایبرگرین (SYBR® Green) و یا اواگرین (Eva green) می‌باشند که این رنگ‌ها قابلیت اتصال به DNA تک رشته را ندارند. این دو رنگ به شکاف کوچک مارپیچ دو رشته‌ای DNA متصل می‌شوند و سبب ایجاد نور فلورسنت می‌گردند، اما رنگ‌هایی که به رشته DNA متصل نشده باشند، فلورسنت خیلی کمی نشان می‌دهند (شکل ۹).

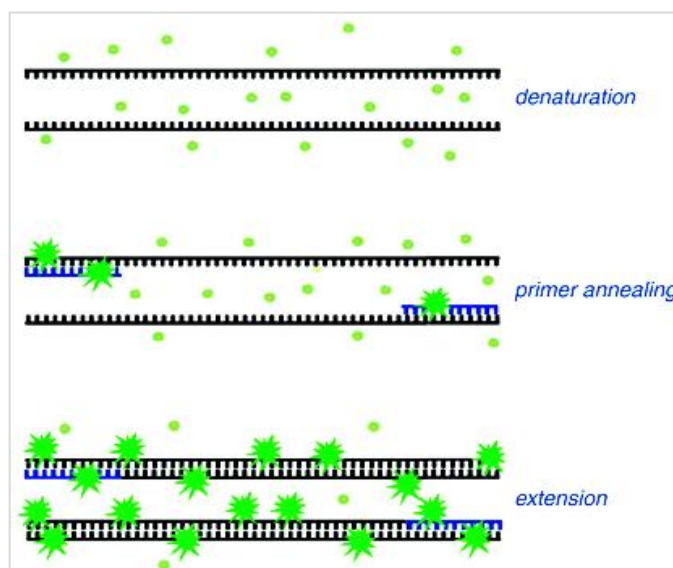
در زمان واقعی بسیار شبیه به PCR معمولی می‌باشد با تفاوت که در PCR در زمان واقعی، یک نشانگر فلورسنت در واکنش جهت ردیابی میزان تکثیر محصول واکنش استفاده می‌شود. این گزارشگرها به گونه‌ای طراحی می‌شوند که در صورت تکثیر DNA، نور تولید نمایند. بنابراین نور بیشتر برابر با تکثیر بیشتر محصول بوده به طوری که افزایش شدت نور ثبت شده در دستگاه با میزان محصول به دست آمده نسبت مستقیم دارد. یکی از این نشانگرهای فلورسنت، رنگ



شکل ۹- شکل بیانگر قابلیت اتصال رنگ‌های فلورسنت به DNA.
Fig 9. Figure showing the ability of fluorescent dyes to bind to DNA.

شدن محصول PCR افزایش می‌یابد (شکل ۱۰). بنابراین با ثبت مقدار فلورسنت ساطع شده در هر سیکل، می‌توان پیشرفت تکثیر محصولات واکنش PCR را در طول مرحله نمایی PCR مشاهده نمود.

بنابراین در روش ریل‌تایم، با تکثیر DNA، قطعات دو رشته‌ای افزایش می‌یابند و با اتصال رنگ‌های فلورسنت به آن‌ها میزان نور انتشار شده نیز بیشتر می‌گردد و این انتشار نور فلورسنت در سیکل‌های متوالی بر اثر مضاعف



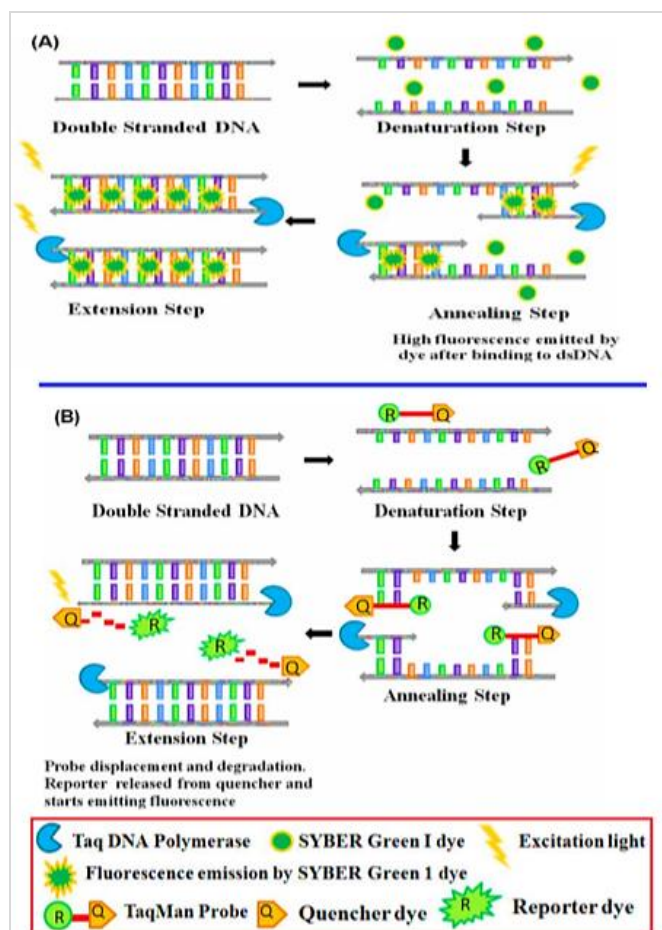
شکل ۱۰- عملکرد رنگ‌های فلورسنت در اتصال به DNA دو رشته‌ای در روش ریل تایم.

Fig 10. Performance of fluorescent dyes in binding to double-stranded DNA in real-time method.

می‌شود. در PCR در زمان واقعی برای انجام واکنش‌ها، تکثیر DNA هدف توسط دستگاه ترموسایکلر انجام شده و سپس محصولات تکثیر شده به دو طریق نشاندار شده و با دریافت فلورسنت توسط فلوروفور برانگیخته شده، تشخیص داده می‌شوند (شکل ۱۱-A و B). این دو روش عبارتند از (الف) با استفاده از نشانگرهای فلورسنت غیر اختصاصی که با DNA دو رشته‌ای تداخل پیدا می‌کنند مانند SYBR Green، یا (ب) با استفاده از نشانگرهای فلورسنت اختصاصی از طریق شناساگرهای (پروب) ژن هدف مانند TaqMan Probe. از نرم‌افزار تخصصی مانند REST برای جمع‌آوری و تجزیه و تحلیل داده‌های کمی تولید شده، استفاده می‌شود

(www.thermosciencybio.com).

qPCR، ترکیبی از تکثیر و شناسایی در یک مرحله واحد است و در نتیجه نیازی به پردازش پس از تکثیر نمونه را از بین می‌برد (Mackay, 2004). از دیگر مزایای qPCR می‌توان به حساسیت، تشخیص زمان واقعی پیشرفت واکنش، سرعت تجزیه و تحلیل و اندازه‌گیری دقیق میزان تکثیر در نمونه مورد بررسی اشاره کرد (Gachon *et al.*, 2004). این به دلیل وجود رنگ‌های فلورسنت یا کاوشگرهای الیگونوکلوئیدی برچسب خورده فلورسنت‌دار است که شدت آن‌ها با مقدار محصول DNA تشکیل شده ارتباط دارد (Wong & Medrano, 2005). برای تسهیل انواع مختلف واکنش‌های qPCR، انواع مختلفی از پلی-مرازها دارای خصوصیات شاخص مانند قدرت تصحیح کنندگی بالا، شروع گرم و تکثیرکنندگی سریع استفاده

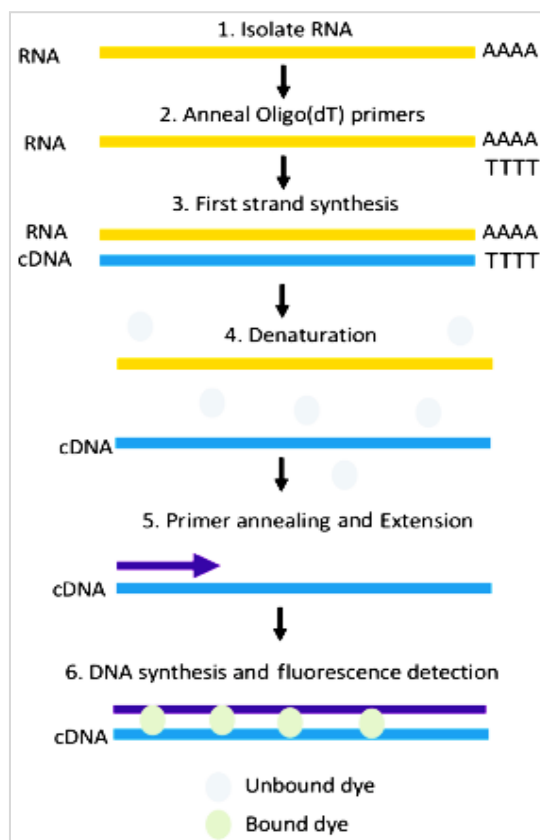


شکل ۱۱-qPCR: (A) سنجش سایبرگرین و (B) سنجش Tag Man
Fig 11. qPCR: (A) SYBR green assay and (B) Tag Man assay

RT-PCR / qPCR به صورت ترکیبی

همچنین می‌تواند برای شناسایی ویروس‌های RNA دار و تعیین کمیت بار ویروسی در نمونه‌های بالینی استفاده شود (Taylor *et al.*, 2010; Varkonyi-Gasic & Hellens, 2010).

PCR کمی رونویسی معکوس (RT-qPCR)، مرحله رونویسی معکوس RT-PCR را با قابلیت‌های کمی qPCR ترکیب می‌کند (شکل ۱۲). RT-qPCR یک تکنیک قدرتمند برای اندازه‌گیری سطوح بیان ژن و مطالعه رویدادهای پردازش RNA است. RT-qPCR



شکل ۱۲- رویه RT-qPCR
Fig 12. RT-qPCR procedure

در جدول ۲ کاربرد انواع PCRها در تحقیقات غلات خلاصه شده است.

جدول ۲- کاربرد انواع PCR در تحقیقات غلات

Table 2. Application of PCR types in cereals researches

منبع References	کاربرد در تحقیقات غلات Application in cereals researches	نوع پی سی آر PCR method	ردیف Number
Jiang <i>et al.</i> , 2022	شناسایی لاین‌های جهش‌یافته دو آللی (<i>Starch</i>) <i>sbeIIb</i> (Bi-allelic mutant lines) (branching enzyme IIb) برنج با استفاده از روش PCR اختصاصی آلل.	Allele specific PCR	1
Ling <i>et al.</i> , 2015	تهیه‌ی ۱۲ کاوشگر بلند با رویکرد مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نامتقارن برای شناسایی ذرت اصلاح شده ژنتیکی.	Asymmetric PCR	2
Yesheng <i>et al.</i> , 2002.	توالی‌یابی ژنوم برنج با استفاده از محصولات Colony PCR.	Colony PCR	3
Elbeaino <i>et al.</i> , 2013	شناسایی توالی‌های RNA پلیمراز وابسته به RNA جزئی ویروس نوار قرمز ذرت از طریق degenerate pcr.	Degenerate PCR	4
Al Mazrooei & Alreshidi, 2023	استفاده از Hotstart-PCR در غربالگری تعدادی از نمونه‌های محصولات غذایی و خوراکی ذرت، سویا و برنج از نظر تراریختی.	Hotstart PCR	5
Kim <i>et al.</i> , 2011	گزارش یک روش سریع و کارآمد PCR معکوس (Inverse PCR) برای جداسازی برچسب‌های ژنی در لاین‌های جهش‌یافته T-DNA برنج (<i>Oryza sativa</i>)	Inverse PCR	6
Xu <i>et al.</i> , 2010	توسعه یک روش 'miniprimer' PCR برای تعیین ژنوتیپ <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> عامل پژمردگی باکتریایی استوارت در ذرت.	Miniprimer PCR	7

Moon <i>et al.</i> , 2016	توسعه یک روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز چندگانه (Multiplex PCR) با استفاده از آغازگرهای گونه‌ای خاص برای تشخیص همزمان اعضای Poaceae، از جمله جو، ذرت، برنج و گندم، بر اساس چندشدگی توالی در DNA.	Multiplex PCR	8
Deepa <i>et al.</i> , 2016	شناسایی <i>Fusarium verticillioides</i> مولد فومونیزین در نمونه‌های غلات (ذرت، شلتوک، سورگوم، گندم و ارزن مرواریدی) با استفاده از Nested PCR.	Nested PCR	9
Huang & Cloutier, 2007	جداسازی و توالی‌یابی خانواده ژن زیر واحد گلوآنتین با وزن مولکولی پایین از کتابخانه BAC گندم Glenlea از طریق Touchdown PCR.	Touchdown PCR	10
Jabeen <i>et al.</i> , 2023	غربالگری آلرژن‌های غذایی در غلات با استفاده از RT-PCR.	RT-PCR	11
Banifatemeh <i>et al.</i> , 2021	بررسی تنوع بیان ژن‌های ZmHKT1 و ZmNHX1 همراه با فاکتور رونویسی ZmMYB30 در دو لاین ذرت متحمل و حساس به شوری.	qPCR	12
	انتخاب و آزمایش ژن‌های مرجع برای RT-qPCR دقیق در گیاهچه‌های برنج تحت سمیت آهن.	RT-PCR / qPCR	13

مزایا و معایب تکنیک PCR

مورد نظر تکثیر می‌شود. تجزیه و تحلیل نمونه‌ها پس از

PCR، محقق را در معرض مواد شیمیایی مضر مانند اتیدیوم بروماید، فلوروکروم‌ها و نور ماورای بنفش قرار می‌دهد که سرطان‌زا هستند (Baechtel, 1989; Butler, 2005).

کاربردهای PCR

پزشکی قانونی: PCR ابزاری مهم در تهیه پروفایل مولکولی افراد (تهیه اثر انگشت) و آزمایشات مبتنی بر DNA است. این روش شناسایی یک نفر را در میان میلیون‌ها نفر دیگر امکان‌پذیر می‌کند. نمونه‌های DNA استخراج شده از صحنه جرم را می‌توان با DNA افراد مظنون یا پایگاه داده DNA مقایسه کرد. همچنین انگشتنگاری DNA، تست والدینی را برای شناسایی والدین بیولوژیکی کودک امکان‌پذیر می‌کند (Saiki *et al.*, 1985; Butler, 2005).

تشخیص پزشکی: والدین احتمالی را می‌توان از نظر وجود بیماری‌های ژنتیکی تحت آزمایش ژن قرار داد و از این رو احتمال وجود ناهنجاری برای کودکان در این مورد نیز قابل تشخیص است. آزمایش قبل از زایمان را می‌توان با

از آنجا که در PCR تکثیر با طراحی آغازگرهای مکمل با DNA هدف انجام می‌شود، این روش بسیار اختصاصی است. این تکنیک نسبتاً سریع است و در کمتر از سه ساعت، یک میلیارد نسخه تکثیری تولید می‌کند. بر اساس نوع ماده ژنتیکی (DNA یا RNA)، می‌توان به راحتی تغییرات مناسب را انجام داد و از این روش برای طیف وسیعی از انواع ارگانیزم‌ها از میکروارگانیسم‌ها گرفته تا گیاهان و حیوانات استفاده کرد. البته این روش در کنار مزایای بسیار زیاد و کاربردی بودن، اشکالات بالقوه‌ای نیز دارد. اولین و مهمترین ایراد، هزینه آن است. این یک روش گران قیمت در مقایسه با آزمون‌های معمولی است. انجام PCR به مهارت و تخصص بالایی نیاز دارد. علاوه بر این، برای انجام PCR باید دانش صحیحی در مورد بیوانفورماتیک برای طراحی آغازگرها، ترکیب سایت‌های برشی و غیره داشت. این روش فقط در آزمایشگاه‌هایی که تکنیک‌های آزمایش زیست‌شناسی مولکولی و تجزیه و تحلیل تخصصی دارند، در دسترس است. بیشتر اوقات اسید نوکلئیک موجودات غیر زنده نیز همراه با نمونه‌های

تکنیک PCR نیازمند سنتز یک سری توالی‌های الیگونوکلوئوتیدی است که در سنتز DNA جدید به صورت انتخابی، به عنوان آغازگر عمل می‌کنند. آغازگرها در موفقیت PCR و یا شکست آن نقشی کلیدی دارند. در صورت طراحی صحیح آغازگرها، آزمایش منجر به تکثیر یک قطعه DNA واحد می‌گردد که منطبق بر ناحیه هدف در مولکول الگو است. در صورت طراحی نادرست، واکنش با شکست روبه‌رو خواهد شد.

منابع مبتنی بر وب برای طراحی آغازگر

منابع متعددی مبتنی بر وب برای PCR و طراحی آغازگر وجود دارد. اگرچه اکثر آن‌ها به صورت آزاد در دسترس هستند، اما از کیفیت متغیری برخوردار هستند و به خوبی نگهداری نمی‌شوند. این نقص، اغلب منجر به از دست رفتن پیوندها می‌شود و بنابراین سایت‌هایی که ممکن است قبلاً مفید بوده باشند، ممکن است در تاریخ بعدی کارایی نداشته باشند. تعدادی از معیارها وجود دارد که باید در طراحی آغازگرها تعیین شود و تعدادی از آن‌ها در جدول ۳ ذکر شده است.

آمیوسنتز، نمونه‌برداری از سلول‌های جنینی که در خون مادر در گردش هستند، انجام داد تا احتمال جهش در جنین مشخص شود (Saiki *et al.*, 1985). با استفاده از PCR می‌توان قبل از انجام پیوند اعضای بدن برای بررسی سازگاری بین اهدا کننده و گیرنده، تایپ بافت را انجام داد. این روش جایگزین آزمایش گروه خونی مبتنی بر آنتی‌بادی سنتی برای شناسایی آنتی‌ژن‌ها در سطح سلول‌های بدن و بافت‌ها است (Quill, 2008). رژیم‌های درمانی را می‌توان با استفاده از آزمایش‌های مبتنی بر PCR برای بررسی جهش‌ها در انکوژن‌ها در انواع خاصی از سرطان‌ها، برای بیماران جداگانه تنظیم کرد. از آنجایی که آنتی‌بادی‌های HIV تا چند هفته پس از عفونت ظاهر نمی‌شوند، آزمایش‌های مبتنی بر PCR ساخته شده‌اند که امکان شناسایی حتی یک ژنوم ویروسی را در میان سلول‌های میزبان فراهم می‌کند. به همین ترتیب، خون اهدایی، نوزادان و اثرات درمان‌های ضد ویروسی می‌توانند بلافاصله انجام شوند (Kwok *et al.*, 1987). علاوه بر این، خون اهدایی همچنین می‌تواند با استفاده از PCR در زمان واقعی از نظر آلودگی باکتریایی آزمایش شود (Dreier *et al.*, 2007).

اهمیت آغازگرها

جدول ۳- سایت‌های آنلاین برای طراحی آغازگر (Singh et al., 2014)

Table 3. Online sites for primer design (Singh et al., 2014)

نام ابزار	شرح	سایت
Tool name	Description	www
CODEHOP	Consensus Degenerate Hybrid Oligonucleotide Primers; degenerate PCR primer design; will accept unaligned sequences.	http://blocks.fhcrc.org/codehop.html
Gene Fisher	Interactive primer design tool for standard or degenerate primers; will accept unaligned sequences.	http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/genefisher/
DoPrimer	Easily design primers for PCR and DNA sequencing.	http://doprimer.interactiva.de/
Primer3	Comprehensive PCR primer and hybridization probe design tool; many options but easy to accept defaults at first.	http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi http://www.basic.nwu.edu/biotools/Primer3.html http://www.justbio.com/primer/index.php http://alces.med.umn.edu/rawprimer.html
Primer Selection	Select PCR primers from nucleotide sequence.	http://alces.med.umn.edu/rawprimer.html
Web Primer	Allow alternative design of primers for either PCR or sequencing purpose.	http://genome-www2.stanford.edu/cgi-bin/SGD/web-primer
PCR Designer	For restriction analysis of sequence mutations. Reduces PCR noise by lowering the probability of random priming.	http://cedar.genetics.soton.ac.uk/public_html/primer.html http://www.changbioscience.com/primo/primo.html
Primo Degenerate 3.4	Primo Degenerate 3.4 designs PCR primers based on a single peptide sequence or multiple alignments of proteins or nucleotides.	http://www.changbioscience.com/primo/primod.html
PCR Primer Design	An application that designs primers for PCR or sequencing purposes.	http://pga.mgh.harvard.edu/servlet/org.mgh.proteome.Primer
The Primer Generator	The program analyzes the original nucleotide sequence and desired amino acid sequence and designs a primer that either has a new restriction enzyme site or is missing an old one.	http://www.med.jhu.edu/medcenter/primer/primer.cgi
EPRIMER3	Picks PCR primers and hybridization oligos (EMBOSS).	http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/eprimer3.html
PRIMO	Prediction of forward and reverse oligonucleotide Primers.	http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/primo.html3 http://atlas.swmed.edu/primo/primo_form.html
PrimerQuest	A primer design tool.	http://www.idtdna.com/biotools/primer_quest/primer_quest.asp
MethPrimer	Design primers for methylation PCRs.	http://itsa.ucsf.edu/~urolab/methprimer/index1.html
Rawprimer	A tool for selection of PCR primers.	http://alces.med.umn.edu/rawprimer.html
MEDUSA	A tool for automatic selection and visual assessment of PCR primer pairs.	http://www.cgr.ki.se/cgr/MEDUSA/
The Primer Project	Software suite that completely automates the PCR primer design process.	http://www-nmr.cabm.rutgers.edu/bioinformatics/Primer_Primer_Project/Primer.html
Oligonucleotides for the PCR	Seek oligonucleotides on both sides of an area.	http://www.citi2.fr/bio2/Oligo2lib.html
GAP	Genome- wide Automated Primer finder servers.	http://promoter.ics.uci.edu/Primers/

نرم‌افزارهای طراحی آغازگر

اینترنت در دسترس است و بسیاری از دانشگاه‌ها

سرورهایی ایجاد کرده‌اند که در آن کاربر می‌تواند به صورت رایگان وارد سیستم شده و از طریق آن، به آنالیز پروتئین‌ها و توالی‌های اسیدنوکلئیک اقدام نماید (Singh & Kumar, 2001). تعداد زیادی از برنامه‌های مستقل

استفاده از نرم‌افزار در کاربردهای بیولوژیکی، بعد جدیدی به حوزه بیوانفورماتیک داده است. اکنون برنامه‌های متنوعی برای طراحی آغازگرها هم به صورت آنلاین و هم به صورت آنلاین در دسترس است. نرم‌افزارهای رایگان در

Biosoft International, IntelliGenetics Inc., Hitachi Inc., DNA Star, Advanced American Biotechnology and Imaging. برخی از دانشمندان همچنین الگوریتم‌ها و برنامه‌های رایانه‌ای را برای اهداف مختلف طراحی آغازگر توسعه داده‌اند (Rychlik & Rhoades, 1989; Lowe *et al.*, 1990; Lucas *et al.*, 1991; O'Hara & Venezia, 1991; Tamura *et al.*, 1991; Makarova *et al.*, 1992; Osborne, 1992; Li *et al.*, 1997). نرم‌افزارهای مختلفی که در طراحی آغازگر استفاده می‌شوند در جدول ۴ آمده است.

ساده و همچنین نسخه‌های پیچیده شبکه یکپارچه نرم-افزار تجاری موجود وجود دارد. این بسته‌های نرم‌افزاری ممکن است برای تجزیه و تحلیل کامل DNA و پروتئین، پیش‌بینی ساختار ثانویه، طراحی آغازگر، مدل‌سازی مولکولی، توسعه استراتژی‌های شبیه‌سازی، ترسیم پلاسمید یا تجزیه و تحلیل آنزیم محدود باشد. شرکت-هایی که در زمینه توسعه نرم‌افزارهای زیستی فعالیت می‌کنند عبارتند از: Alkabi Biosystems, Molecular Biology Insights, PREMIER

جدول ۴- نرم‌افزارهای طراحی آغازگر (Abd-El Salam, 2003)
Table 4. Primer design software (Abd-El Salam, 2003)

نام نرم‌افزار Software name	شرح Description	سایت www
PrimerSelect	Analyzes a template DNA sequence and chooses primer pairs for PCR and primers for DNA sequencing.	Pairs for PCR and primers for DNA sequencing. www.dnastar.com
DNASIS Max	DNASIS Max is a fully integrated program that includes a wide range of standard sequence analysis features.	http://www.medprobe.com/no/dnasis.html
Primer Premier 5	primer design for Windows and Power Macintosh.	http://www.premierbiosoft.com/primerdesign/primerdesign.html
Primer Premier:	Comprehensive primer design for Windows and Power Macintosh.	http://www.premierbiosoft.com/
NetPrimer	Comprehensive analysis of individual primers and primer pairs.	http://www.premierbiosoft.com/NetPrimer.html
Array Designer 2	For fast, effective design of specific oligos or PCR primer pairs for microarrays	http://www.premierbiosoft.com/dnamicomarray/dnamicomarray.html
Beacon Designer 2.1	Design molecular beacons and TaqMan probes for robust amplification and fluorescence in real time PCR.	http://www.premierbiosoft.com/molecular_beacons/taqman_molecular_beacons.html
GenomePRIDE 1.0	Primer design for DNA-arrays/chips.	http://pride.molgen.mpg.de/genomepride.html
Fast PCR	Software for Microsoft Windows has specific, ready-to-use templates for many PCR and sequencing applications: standard and long PCR, inverse PCR, degenerate PCR directly on amino acid sequence, multiplex PCR.	http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/bare-1.html/manual.htm
OLIGO 6	Primer Analysis Software for Mac and Windows.	http://www.oligo.net
Primer Designer 4	Will find optimal primers in target regions of DNA or protein molecules, amplify features in a molecule, or create products of a specified length.	http://www.scied.com/ses_pd5.htm
GPRIME	Software for primer design	http://life.anu.edu.au/molecular/software/gprime.htm

Sarani Gold	Genome Oligo Designer is software for automatic largescale design of optimal oligonucleotide probes for microarray experiments.	http://mail.strandgenomics.com/products/sarani/
PCR Help	Primer and template design and analysis	http://www.techne.com/CatMol/pcrhelp.htm
Genorama chip Design Software	Genorama Chip Design Software is complete set of programs required for genotyping chip design. The programs can also be bought separately.	http://www.asperbio.com/Chip_desin_soft.htm
Primer Designer	The Primer Designer features a powerful, yet extremely simple, real-time interface to allow the rapid identification of theoretical ideal primers for your PCR reactions.	http://genamics.com/expression/primer.htm
Primer Premier	Automatic design tools for PCR, sequencing or hybridization probes, degenerate primer design, Nested/Multiplex primer design, restriction enzyme analysis and more.	http://www.biotechniques.com/freesamples/itembtn21.html
PrimerDesign	DOS-program to choose primer for PCR or oligonucleotide probes.	http://www.chemie.unimarburg.de/%7Ebecker/pdhome.html

Erlich *et al.*, 1991; Dieffenbach) بحث نمی کنند

اصول عمومی طراحی آغازگر برای PCR

شاید مهمترین پارامتر برای موفقیت PCR، طراحی آغازگرها باشد. یک آغازگر ضعیف طراحی شده می تواند منجر به یک واکنش PCR شود که کارایی نخواهد داشت. توالی آغازگر موارد مختلفی مانند طول محصول، دمای ذوب شدن آن و در نهایت محصول را تعیین می کند. توالی آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر PCR می تواند تأثیر عمده ای بر اختصاصیت و حساسیت واکنش داشته باشد. هنگام انتخاب دو آغازگر تکثیری PCR، دستورالعمل های زیر باید در نظر گرفته شود:

طول آغازگر: از آنجا که اختصاصیت و دما و همین طور زمان اتصال، هر دو حداقل تا حدی به طول آغازگر بستگی دارد، این پارامتر برای موفقیت PCR بسیار مهم است (Wu *et al.*, 1991). برای مطالعات طیف گسترده، آغازگرهایی با طول معمول ۱۸-۳۰ نوکلئوتید بهترین هستند. طول آغازگرها باید حداقل ۱۸ نوکلئوتید باشد تا

الگوهای DNA و آغازگرهای الیگونوکلئوتیدی باید با جزئیات بیشتری بررسی شوند (Linz *et al.*, 1990). کارایی و حساسیت PCR تا حد زیادی به کارایی آغازگرها بستگی دارد (He *et al.*, 1994). توانایی یک الیگونوکلئوتید به عنوان آغازگر PCR به عوامل مختلفی بستگی دارد از جمله: الف) سینتیک اتصال یا انفصال دوبلکس آغازگر-الگو در دماهای اتصال و گسترش، ب) پایداری دوبلکس نوکلئوتیدهای ناسازگار و مکان آن ها و ج) کارایی که با آن پلی مرز می تواند دوبلکس ناسازگار را تشخیص و گسترش دهد. برای افزایش اختصاصیت تکثیر آغازگرهای مکمل توالی هدف باید از معیارهای طول، درصد GC، دمای ذوب و اتصال، پایداری انتهای ۵' و اختصاصیت انتهای ۳' مناسب برخوردار باشند (Dieffenbach *et al.*, 1993). به طور کلی در بهینه سازی PCR بیشتر اجزاء مختلف PCR را در نظر می گیرند؛ اما درباره مفاهیم اساسی طراحی آغازگر PCR

احتمال مواجهه با مشکلات سایت هیبریداسیون ثانویه ناقل یا اینزرت را به حداقل برساند. به طور کلی باید از آغازگرهای با تعداد زیاد از یک باز خاص خودداری شود. پرهیز از به کار بردن چهار یا بیشتر نوکلئوتید G یا C پشت سر هم بسیار مهم است.

دمای ذوب (T_m): درجه حرارت ذوب مطلوب برای آغازگرها در محدوده ۵۲-۵۸ درجه سانتی‌گراد، به طور کلی نتایج بهتری نسبت به آغازگرهای با دمای ذوب پایین‌تر ارائه می‌دهد. از آغازگرهای با دمای ذوب بالاتر از ۶۵ درجه سانتی‌گراد نیز باید خودداری شود، زیرا احتمال اتصال مجدد وجود دارد. پس توصیه می‌شود که واکنش با مرحله اتصال و گسترش در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد انجام گیرد. یک آزمایش کاری خوب از این مقدار (به طور کلی برای اولیگوهای در بازه ۱۸-۳۰ باز معتبر است) را می‌توان با استفاده از فرمول Wallace و همکاران محاسبه کرد (Wallace et al., 1979):

$$T_m = 2(A + T) + 4(G + C)$$

محتوای GC. درصد GC از ویژگی‌های مهم DNA است و اطلاعاتی در مورد قدرت اتصال آن فراهم می‌کند. محتوای GC آغازگرها باید بین ۴۵ تا ۶۰ درصد باشد (Dieffenbach et al., 1993). برای آغازگرهای با محتوای G یا C کمتر از ۵۰ درصد، ممکن است لازم باشد توالی آغازگر به بیش از ۱۸ جفت افزایش یابد تا دمای ذوب را بالای حداقل مقدار توصیه شده، نگه داشت. محتوای GC، دمای ذوب و دمای اتصال (T_a) کاملاً وابسته به یکدیگر هستند (Rychlik et al., 1990).

توالی انتهایی ۳': کاملاً اثبات شده است که موقعیت انتهایی ۳' در آغازگرهای PCR برای کنترل اشتباه مربوط به آغازگر ضروری است (Kwok et al., 1990). در آغازگرها باید انتهای ۵' انتهایی آنها نسبت به ۳' انتهایی آنها "چسبناک‌تر" باشد. انتهای ۳' "چسبنده" با محتوای بالای G یا C نشان داده شده است که می‌تواند به طور بالقوه در چندین جایگاه روی DNA الگو متصل شود. G یا C در انتهای ۳' مطلوب است اما قسمت اول این قانون باید اعمال شود. این گیره GC پیوندهای ثانویه جعلی را کاهش می‌دهد (Sheffield et al., 1989).

دایمرها و آغازگری اشتباه: آغازگرها نباید حاوی توالی مکمل (پالیندروم) در درون خود باشند، به عبارتی نباید حالت سنجاق مویی ایجاد کنند. اگر این حالت وجود داشته باشد، یک آغازگر دوباره به روی خود جمع شده و منجر به یک رویداد آغازگر غیرمولد می‌شود که سیگنال کلی به دست آمده را کاهش می‌دهد (Breslauer et al., 1986). سنجاق‌های مویی که زیر ۵۰ درجه سانتی‌گراد تشکیل می‌شوند، معمولاً چنین مشکلی ایجاد نمی‌کنند. آغازگرها نباید حاوی توالی نوکلئوتیدهایی باشند که به یک مولکول آغازگر اجازه دهد تا به خود و یا آغازگر دیگر مورد استفاده در واکنش‌های PCR (تشکیل دایمر آغازگر) متصل شود.

اختصاصیت: همانطور که در بالا ذکر شد، اختصاصیت آغازگر حداقل تا حدی به طول آغازگر بستگی دارد. بدیهی است که تعداد زیادی الیگوی ۲۴ بازی یونیک نسبت به الیگوی ۱۵ جفت بازی وجود دارد. با این حال،

آغازگرها باید به گونه‌ای انتخاب شوند که توالی منحصر به فردی در DNA الگو داشته باشند که قرار است تکثیر شود. آغازگر طراحی شده با توالی بسیار تکراری در هنگام تکثیر DNA ژنومی منجر به ایجاد اسمیر (کشیدگی) می‌شود. با این حال، اگر یک کلون واحد از یک کتابخانه ژنومی تکثیر شود، همان آغازگر ممکن است یک باند واحد بدهد.

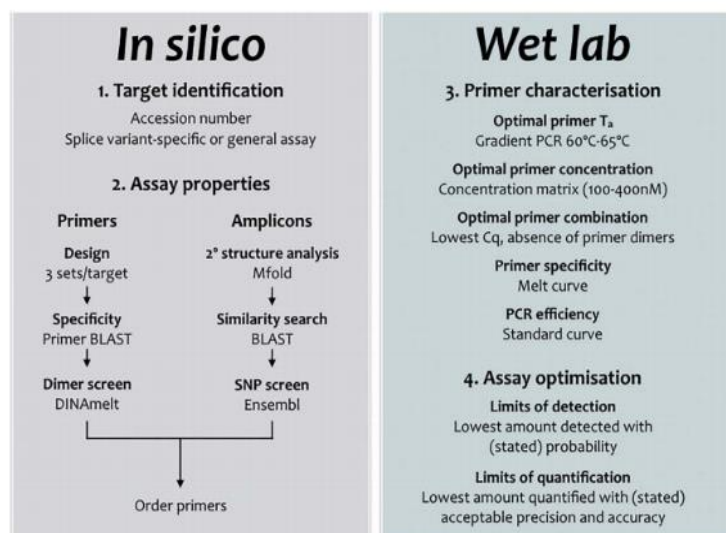
آغازگرهای دژنره: انحطاط در توالی آغازگر نیز باید در نظر گرفته شود. از آغازگرهای دژنره بر اساس توالی اسیدهای آمینه مناطق محافظت شده برای جستجوی اعضای یک خانواده ژنی استفاده می‌شود (Wilks et al., 1989). برنامه‌های رایانه‌ای نیز به طور خاص برای طراحی آغازگر دژنره توسعه یافته‌اند (Chen & Zhu, 1997).

توالی‌های آغازگر مکمل: آغازگرها نباید با همولوژی بیش از سه جفت باز درونی طراحی شوند. اگر یک آغازگر دارای چنین منطقه‌ای از خود همسانی باشد، "بازگشت سریع" می‌تواند رخ دهد. خطر مرتبط دیگر، همولوژی بین آغازگرها است. همولوژی جزئی در مناطق میانی دو آغازگر می‌تواند در هیبریداسیون تداخل ایجاد کند. اگر همولوژی در انتهای ۳' هر یک از آغازگرها رخ دهد، تشکیل دایمر آغازگر ایجاد می‌شود که به ویژه در Real time PCR مشکل ایجاد می‌کند.

سایر توصیه‌ها: غلظت آغازگر در واکنش تکثیر باید بین ۰/۵ تا ۰/۱ میکرومولار باشد. در صورت امکان، باید یک

جستجوی رایانه‌ای در برابر توالی ناقل و DNA اینزرت انجام شود تا بررسی شود که آغازگر و به ویژه ۸-۱۰ باز انتهای ۳' آن یونیک است. اینوزین نباید در آغازگرهای تعیین توالی موجود باشد. آن‌ها یا کار نمی‌کنند یا نتایج توالی ضعیفی دارند. طراحی آغازگرهای تعیین توالی DNA و PCR از رهنمودهای بسیار مشابهی پیروی می‌کند. حتی اگر ویژگی‌های آغازگر را می‌توان از نظر عناصر ذکر شده در بالا به صورت بصری بررسی کرد، تعدادی از برنامه‌های رایانه‌ای که تهیه شده‌اند، از این دستورالعمل‌ها برای انتخاب آغازگر استفاده می‌کنند.

جهت بررسی اختصاصیت و ویژگی‌های آغازگرهای طراحی شده همانطور که در شکل ۱۳ نشان داده شده است، شامل چهار مرحله است که دو مرحله اول توسط تجزیه و تحلیل درون یارانه‌ای (*in silico*) انجام می‌شود و دو مرحله آخر با تحقیقات تجربی به دست می‌آید. جهت بررسی اختصاصیت آغازگر از نرم‌افزار آنالین Primer blast و جهت بررسی ویژگی‌های آغازگر از جمله درصد GC و دمای Tm و ایجاد ساختارهای ثانویه و...، از نرم‌افزار Oligo Analyzer می‌توان استفاده کرد که در ادامه طرز کار کردن با این دو نرم‌افزار شرح داده شده است.



شکل ۱۳- شماتیکی از مراحل بررسی اختصاصیت و ویژگی‌های آغازگرها

Fig 13. Schematic of the stages of examining the specificity and characteristics of primers

طراحی شود و در واکنش باید از cDNA به عنوان الگو استفاده شود. اما از آن جاییکه در بیشتر موارد RNA استخراج شده و cDNA سنتز شده به DNA ژنومی آلوده است، بنابراین طراحی آغازگرها باید به صورتی باشد که یا به توالی DNA ژنومی متصل نشود و یا در صورت اتصال به DNA، محصولی از الگوی DNA تکثیر نشود. لازم به ذکر است که جهت حذف آلودگی DNA در موقع سنتز cDNA، می‌توان از آنزیم DNase استفاده نمود، اما استفاده از آنزیم DNase نیز مشکلاتی را ایجاد می‌کند. از جمله‌ی این مشکلات می‌توان به کاهش کیفیت RNA، نیاز به حجم بالایی از RNA، و قیمت بالای این آنزیم اشاره کرد. با توجه به مشکلات فوق بهتر است آغازگرها به گونه‌ای طراحی شوند که در صورت وجود آلودگی DNA، آغازگرها الگوی DNA را تکثیر نکنند و به صورت اختصاصی الگوهای cDNA را تکثیر نمایند.

موارد اختصاصی در طراحی آغازگر برای ریل تایم

PCR به روش SYBR® Green

روش ریل تایم PCR نیز مانند روش PCR نیازمند طراحی آغازگر است. برای طراحی آغازگر در روش ریل تایم علاوه بر رعایت نکات عمومی در طراحی آغازگر (که قبلاً به آن اشاره شد)، باید به یک سری نکات اختصاصی در طراحی آغازگر توجه نمود که در ادامه به این نکات اشاره شده است.

نکته اول: آغازگرهای طراحی شده نباید روی توالی ژنومی متصل و محصولی را تکثیر نمایند. در بررسی بیان ژن‌ها ابتدا از نمونه‌ها، RNA استخراج شده و سپس RNA استخراج شده توسط آنزیم Reverse transcriptase (آنزیم RT) به cDNA تبدیل می‌گردد. سپس بررسی بیان ژن‌ها با تعیین میزان نسخه‌های رونویسی شده از هر ژن (mRNA) در cDNA سنتز شده، صورت می‌پذیرد. بنابراین آغازگرها باید بر روی توالی mRNA ژن‌ها

اینکه در توالی DNA بین دو اگزون توالی اینترون وجود دارد، فاصله بین دو آغازگر در الگوی DNA به قدری زیاد می‌شود که این آغازگرها قادر به تکثیر الگوهای DNA نمی‌باشند. فرض نمایید در شکل ۱۸ طول اینترون برابر با سه هزار جفت باز باشد، حال اگر زمان بسط (Extension) واکنش ریل تایم روی ۳۰ ثانیه تنظیم شده باشد، دیگر توالی سه هزار جفت بازی تکثیر نخواهد شد. اما در این روش در الگوهای cDNA بین دو اگزون توالی اینترونی وجود ندارد، بنابراین آغازگرها می‌توانند الگوی cDNA را تکثیر نمایند. روش (Intron-spanning Intron inclusion) بهترین، مطمئن‌ترین و آسان‌ترین روش طراحی آغازگر برای بررسی بیان ژن‌ها می‌باشد، اما در این روش باید بین دو اگزون انتخاب شده، یک اینترون با طول حداقل ۳۰۰ جفت باز وجود داشته باشد و هنگامی که طول اینترون‌های یک ژن از ۳۰۰ جفت باز کمتر باشد، استفاده از این روش طراحی آغازگر توصیه نمی‌گردد.

نکته‌ی دوم: بهتر است آغازگرها روی اگزون‌های سمت ۳' mRNA طراحی شوند. دلیل این است که در سنتز cDNA آنزیم RT سنتز را از سمت ۳' mRNA آغاز می‌نماید. بنابراین سنتز cDNA سمت ۳' ژن‌ها با کیفیت بیشتری نسبت به سمت ۵' انجام گیرد.

نکته‌ی سوم: طول قطعه تکثیر شونده (محصول ریل تایم) باید بین ۹۰ تا ۲۰۰ جفت باز باشد. طول کمتر سبب می‌گردد که قطعه تکثیر شده با دایمر آغازگر اشتباه گرفته شود و طول بیشتر، می‌تواند سبب افزایش تکثیر غیر اختصاصی و همچنین دو قله‌ای شدن منحنی ذوب محصول ریل تایم شود.

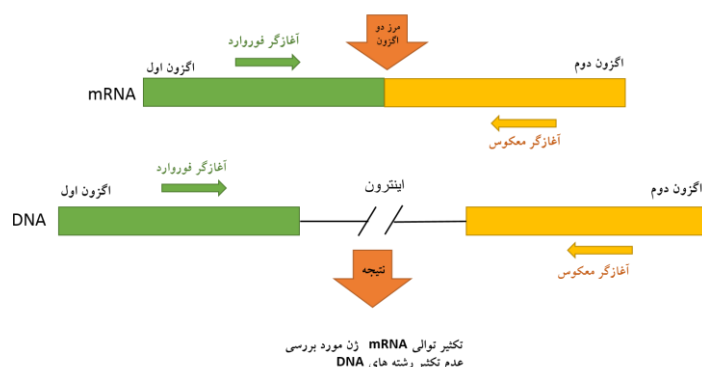
روش‌های طراحی آغازگر برای Real Time PCR به

روش SYBR Green

۱- طراحی آغازگرهای (Intron-spanning)

Intron inclusion

در این روش (شکل ۱۴) آغازگر فوروارد روی یک اگزون و آغازگر معکوس روی اگزون مجاور طراحی می‌شود. به دلیل



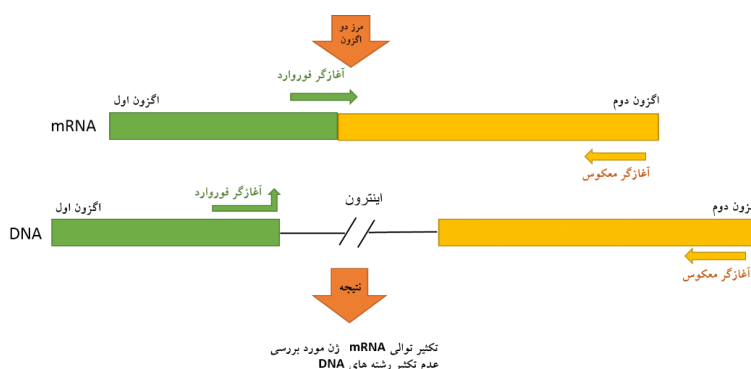
شکل ۱۴- طراحی آغازگر Intron inclusion برای بررسی بیان ژن‌ها

Fig 14. An intron inclusion primer designing for gene expression studies

۲- طراحی آغازگرهای Exon-exon junction

هنگامی که در یک ژن طول اینترون‌ها کوتاه باشد، می‌توان از روش دیگری برای اختصاصی نمودن آغازگرها برای الگوهای cDNA استفاده نمود. در طراحی آغازگر در این روش، یکی از آغازگرها دقیقاً روی محل اتصال اگزون‌ها طراحی می‌گردد (شکل ۱۵). در این روش باید توجه نمود

که توالی سمت ۳' آغازگر که روی اگزون دوم قرار می‌گیرد، باید بین ۳ تا ۵ جفت باز طول داشته باشد و قرار دادن بیش از ۶ جفت باز در سمت ۳' آغازگر به هیچ وجه توصیه نمی‌شود. به دلیل این که در این روش آغازگرها روی مرز دو اگزون طراحی می‌گردند، به این روش Exon-exon junction می‌گویند.



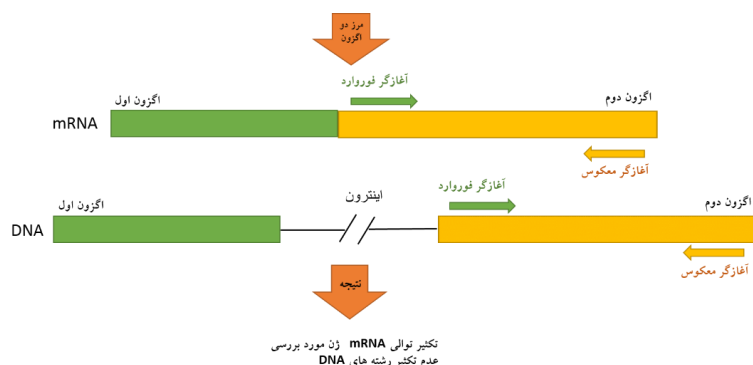
شکل ۱۵- طراحی آغازگر در مرز دو اگزون برای بررسی بیان ژن‌ها

Fig 15. Exon-exon junction primer designing for gene expression studies

۳- طراحی آغازگرهای داخل اگزونی

در این روش هر دو آغازگر رو به جلو و معکوس بر روی یک اگزون قرار دارد (شکل ۱۶). گرچه در شرایط عادی طراحی آغازگر به این روش توصیه نمی‌گردد، اما در برخی موارد ممکن است یک ژن فاقد اینترون باشد و یا طراحی آغازگر به دو روش قبلی ممکن نباشد. در این شرایط هر دو آغازگر روی یک اگزون طراحی می‌گردند. باید توجه داشت در مواردی که آغازگرها به این روش طراحی می‌گردند، باید با تیمار نمودن RNA های استخراج شده با آنزیم DNase، آلودگی DNA را تا حد امکان کاهش داد.

در روش Exon-exon junction نیز آغازگرها قادر به اتصال به توالی DNA نمی‌باشند (به دلیل وجود اینترون ها)، بنابراین آلودگی‌های DNA تکثیر نمی‌شوند. روش Exon-exon junction دارای یک مشکل بزرگ می‌باشد. در این روش تعداد مرزهای اتصال اگزون‌ها به یکدیگر کم می‌باشد بنابراین محل‌های انتخاب برای طراحی آغازگر محدود است و ممکن است که هیچ یک از جایگاه‌ها دارای شرایط لازم بعدی برای طراحی آغازگر نباشند (به عنوان مثال ممکن است آغازگر انتخاب شده دارای ساختار ثانویه نامناسب باشد).



شکل ۱۶- طراحی آغازگر داخل اگزونی برای بررسی بیان ژن‌ها
Fig 16. Intra-exon primer designing for gene expression studies

مراحل طراحی آغازگر با نرم‌افزار Primer3

یکی از پرکاربردترین نرم‌افزارهای آنلاین طراحی آغازگر،

Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3->)

است (Thornton & Basu, 2010). (0.4.0/primer3/

با استفاده از نرم افزار Primer3 می‌توان آغازگرهای

Intron inclusion و داخل اگزونی را برای ریل تایم،

آغازگرهای توالی‌یابی و پروب‌های هیبریداسیون طراحی

نمود. Primer3 دارای تعداد زیادی پارامترهای ورودی

مختلف است که می‌توان آن‌ها را برای تعریف ویژگی‌هایی

کنترل کرد که به نرم‌افزار اجازه می‌دهد آغازگرهای

مناسب برای هر هدف را طراحی کند. در این بخش

مراحل گام به گام طراحی آغازگر با استفاده از Primer3

ارائه می‌شود و عملکردهای متداول‌ترین پارامترها توضیح

داده می‌شود. باید دقت کرد که هدف، طراحی آغازگر برای

PCR معمولی است یا برای بررسی بیان ژن، چون اگر

هدف بررسی بیان ژن باشد، حتماً باید از توالی‌های

mRNA استفاده شود و بهتر است Complete cds را از

توالی مورد نظر انتخاب کرد و تفاوت دیگر در اندازه

محصول PCR است که معمولاً در بررسی بیان ژن، اندازه

محصول کوچک‌تر و بین ۱۵۰ تا ۲۰۰ نوکلئوتید می‌باشد.

سایر مراحل در طراحی آغازگر با مراحل طراحی برای

PCR معمولی مشابه است.

اولین مرحله در طراحی آغازگر مشخص کردن ژن هدف از

ارگانیزم مورد نظر است. پس توالی ژن هدف از پایگاه

داده مثلاً NCBI به درستی استخراج می‌شود. NCBI

یک پایگاه داده عمومی از ژنوم و سایر اطلاعات مربوط به

بیوتکنولوژی با بودجه دولتی است. برای این منظور در

سایت NCBI از قسمت Resources گزینه Nucleotid

را انتخاب و در کادر جستجو اسم گیاه و ژن مورد نظر را

تایپ کرده و از نتایج حاصل، مناسب‌ترین و نزدیک‌ترین

گزینه انتخاب می‌شود. سپس از قسمت GeneBank

توالی ژن را استخراج کرده و در کادر مربوط در نرم-

افزار Primer3 کپی می‌شود (شکل ۱۷-الف). شکل ۱۷-

ب نمای کلی از نرم‌افزار Primer3 را نشان می‌دهد.

پس از دریافت توالی موردنظر و با مراجعه به سایت نرم

افزار، توالی در باکس Source Sequence وارد می‌شود.

در این نرم‌افزار نیاز نیست که توالی کل mRNA را وارد

کرد، بلکه وارد نمودن توالی که آغازگرها باید در آن ناحیه

طراحی شوند، کفایت می‌کند. به عنوان مثال دو اگزون آخر سمت mRNA ۳' گزینه‌های خوبی برای طراحی آغازگر هستند. نحوه آماده کردن توالی برای وارد نمودن در نرم افزار Primer3 در شکل ۱۸ نشان داده شده است. در حالت پیش فرض نرم افزار، آغازگرهای مستقیم و معکوس طراحی می‌شود، در صورتی که هدف طراحی آغازگر برای TaqMan Real time PCR باشد، تیک Pick Left Primer مستقیم مورد نظر در باکس وارد می‌شود (شکل ۱۷-ج).

طراحی شوند، کفایت می‌کند. به عنوان مثال دو اگزون آخر سمت mRNA ۳' گزینه‌های خوبی برای طراحی آغازگر هستند. نحوه آماده کردن توالی برای وارد نمودن در نرم افزار Primer3 در شکل ۱۸ نشان داده شده است. در حالت پیش فرض نرم افزار، آغازگرهای مستقیم و معکوس طراحی می‌شود، در صورتی که هدف طراحی آغازگر برای TaqMan Real time PCR باشد، تیک Pick Left Primer مستقیم مورد نظر در باکس وارد می‌شود (شکل ۱۷-ج).

الف

GenBank
Rosa hybrid cultivar ACT mRNA for actin, partial cds
GenBank: AB239794.1
FASTA Graphics
Go to: [icon]
LOCUS AB239794 836 bp mRNA linear PLN 26-JUL-2016
DEFINITION Rosa hybrid cultivar ACT mRNA for actin, partial cds.
ACCESSION AB239794
VERSION AB239794.1
KEYWORDS -
SOURCE Rosa hybrid cultivar

ب

Primer3web version 4.1.0 - Pick primers from a DNA sequence.
Select the Task for primer selection: generic
Template masking before primer design (available species)
Select species: Example: Mus musculus
Primer failure rate cutoff: < 0.1
Nucleotides to mask in 5' direction: 1
Nucleotides to mask in 3' direction: 0
Paste source sequence below (5' to 3', string of ACGTNaGm -- other letters treated as N -- numbers and blanks ignored). FASTA format ok. Please N-out undesirable sequence (vector, ALU LINEs, etc.) or use a Missing Library (repeat library) NONE
[Text area for sequence]
[x] Pick left primer, or use left primer below [] Pick hybridization probe (internal oligo), or use oligo below [x] Pick right primer, or use right primer below (5' to 3' on opposite strand)
[Pick Primers] [Download Settings] [Reset Form]

ج

CTTGCTCTGCAATATGAGCAGGAGCTTGAACTGCTAAGACAAGTTCTTCAGTTGAGAAAAGCTATGAAT TGCTGATGGACAGGTGATCACCATCGGTGCTGAGCGATTCCGTTGCCAGAAAGTACTTTTCCAACCATC TATGATTGGAATGGAAGCTGCAGGCATTTCATGAGACTACATACAACCTATCATGAAGTGTGATGTCGAT ATCAGGAAGGATTGTGATGGAACATTGTTCTCAGTGGTGGGCTACCATGTTTCTGTCATTGCTGACA GAATGAGCAAGGAAATCACGGCTTTGGCACCAAGCAGCATGAAATCAAGGTTGTTGCTCCACCTGAGAG GAAGTACAGTGTCTGGATTGGTGGATCCATCTCGCATCTTAAGCACTTTCAGCAAATGTGGAT
[x] Pick left primer, or use left primer below [] Pick hybridization probe (internal oligo), or use oligo below [x] Pick right primer, or use right primer below (5' to 3' on opposite strand)
[Pick Primers] [Download Settings] [Reset Form]

شکل ۱۷- الف) نتایج جستجوی توالی ژن در NCBI. ب) نمای نرم افزار آنلاین Primer3. ج) انتخاب آغازگر مستقیم یا معکوس

Fig17. A) Gene sequence search results in NCBI. b) View of Primer3 online software. c) Selection of direct or reverse Primer

```

-----
TTTCTGCTCATGACTCTGCGGAATTTTGGGATGGGGAAGAGGAGCATCGAGGACCGTGTTCAGAGGAA
GCCCCGCTGCCTTGTGGAGGAGTTGAGAAAAACCAATGCCTCACCTGTGATCCCACTTTCATCCTGGGCT
GTGCTCCCTGCAATGTGATCTGCTCTGTTATTTCCATGATCGATTGATTATAAAGATCAGAGGTTTCT
TAACTTGATGGAAAAATTCAATGAAACCTCAGGATTCTGAGCTCTCCATGGATCCAGGTCTGCAATAAT

TTCCCTGCTCTCAT [CGATTATCTCCAGGAAGTCATAATAAAATAGCTGAAAATTTTGC] TTACATT
GTTATGTATTGGAGAGAATAAAAGAACATCAAGAATCCCTGGACATGAACAGTGTCTCGGGACTTTATTGA
TTGTTTCCTGATCAAAATGGAACAGGAAAAGCACAATCAACAGTCTGAATTTACTGTTGAAAGCTTGATA
GCCACTGTAACTGATATGTTTGGGGCTGGAACAGAGACAACGAGCACCCTCTGAGATATGGACTCCTGC
TCCGTGCTGAAGTACCCAGAGGTCACAGCTAAAGTCCAGGAAGAGATTGAATGTGTAGTTGGCAGAAACCG
GAGCCCTGTATGCAGGACAGGAGTCACATGCCCTACACAGATGCTGTGGTGCACGAGATCCAGAGATAC
ATTGACCTCCTCCCCACCAACCTGCCCATGACGTGACCTGTGATGTTAAATTCAAAAACCTACCTCATCC

```

شکل ۱۸- آماده کردن توالی برای وارد نمودن در نرم افزار Primer3. در شکل اگزون آخر به رنگ مشکی و اگزون قبل از آن به رنگ قرمز نشان داده شده است. برای مشخص نمودن مرز دو اگزون از علامت های "]" و "[" استفاده شده است. در مرحله بعد توالی فوق به همراه علامت های "]" و "[" در نرم افزار کپی و پیست (Copy/paste) می شود. در شکل فوق قرار دادن براکت ها به این معنی می باشد که ناحیه بین دو براکت باید در درون قطعه تکثیر شده قرار داشته باشد و به عبارتی آغازگرها باید به صورت Intron inclusion طراحی شوند.

Fig 18. Prepareing the sequence to enter in the primer3 software. In the above figure, the last exon is shown in black and the exon before it is shown in red. The symbols [and] are used to mark the border of two exons. In the next step, the above sequence is copied and pasted in the software along with [and] signs. In the above figure, placing the brackets means that the area between the two brackets must be inside the amplified fragment, and in other words, the primers must be designed as intron inclusion.

قسمت Excluded Regions می توان ناحیه ای را که

نباید آغازگر در آنجا طراحی شود را مشخص نمود. به عنوان مثال 150,20 به این معنی است که آغازگرها نباید در محدوده 20 نوکلئوتید بعد از نوکلئوتید شماره 150 طراحی شوند. البته با علامت های < و > نیز می توان این ناحیه را مشخص نمود. در شرایط کلی نیازی به پُر کردن این پارامتر نیست. در قسمت Product Size Range طول قطعه ای که تکثیر خواهد شد را باید مشخص نمود. همان طور که قبلاً گفته شد این طول برای ریل تایم معمولاً بین 100 تا 200 جفت باز تنظیم می شود. قسمت

تنظیمات نرم افزار Primer3

پارامتر Sequence Id برای انتصاب یک اسم برای توالی می باشد. البته این یک گزینه انتخابی می باشد و اگر تکمیل نشود، مشکلی در روند طراحی آغازگر ایجاد نمی شود. در قسمت Targets می توان ناحیه ای که باید در قطعه ای آمپلیکون (قطعه مورد تکثیر) حضور داشته باشد را مشخص نمود. به عنوان مثال 150,20 به این معنی است که 20 نوکلئوتید بعد از نوکلئوتید شماره 150 باید در محصول PCR حضور داشته باشد. البته با علامت های "]" و "[" نیز می توان این ناحیه را مشخص نمود ([I]). در

بهینه درصد GC آغازگر را می‌توان تنظیم نمود. این پارامتر روی 40 تا 60 درصد تنظیم می‌شود. Max self-Complementarity بیانگر تعداد بازهای جفت شده درون آغازگرها با یکدیگر می‌باشد که هر چه این تعداد کمتر باشد، آغازگرهای طراحی شده دارای کیفیت بهتری می‌باشند. این گزینه را می‌توان حداکثر 8 انتخاب کرد اما بهترین حالت 0 یا نزدیک آن می‌باشد. Max 3' Complementarity بیانگر تعداد بازهای جفت شده در ناحیه 3' آغازگرها با یکدیگر می‌باشد که هر چه این تعداد کمتر باشد، آغازگرهای طراحی شده دارای کیفیت بهتری می‌باشند. این گزینه را می‌توان 1، 2 و یا 3 انتخاب کرد اما بهترین حالت 0 می‌باشد. Max Poly-X بیانگر حداکثر مجاز تکرار یک باز در آغازگرها به صورت پشت سر هم می‌باشد. CG Clamp بیانگر حداکثر تعداد بازهای C و G در سمت 3' آغازگر می‌باشد. در صورتی که مجموع این دو باز در سمت 3' آغازگرها زیاد باشد، احتمال تکثیر غیر اختصاصی قطعات زیاد می‌شود. در صورتی که نرم‌افزار آغازگرهایی با این شرایط پیدا نکرد، می‌توان این مقدار را افزایش داد. سایر گزینه‌ها در حالت پیش فرض نرم‌افزار نگه داشته می‌شوند. سپس گزینه Pick Primer کلیک می‌شود (شکل ۱۹-الف). بعد از کلیک روی گزینه Pick Primer، نرم‌افزار به صورت خودکار بهترین آغازگر را انتخاب نموده و مشخصات بهترین آغازگر مستقیم و معکوس و جایگاه آغازگرها روی توالی ورودی نمایش داده می‌شود. البته نرم افزار چندین جفت آغازگر را معرفی می‌نماید که ویژگی‌های هر جفت آغازگر قابل مشاهده

Number To Return بیانگر تعداد جفت آغازگرهایی است که نرم‌افزار در قسمت نتایج نشان می‌دهد. پیش فرض نرم‌افزار عدد 5 است، بنابراین نرم‌افزار 5 آغازگر را طراحی و ارائه می‌دهد. می‌توان این پارامتر را بر روی 10 قرار داد تا 10 جفت آغازگر طراحی گردد و سپس بهترین آغازگر را انتخاب نمود. گزینه‌ی Max 3' Stability بیانگر حداکثر پایداری اتصال طرف 3' آغازگر با رشته الگو است. باید توجه نمود پایداری بسیار بالا سبب افزایش تکثیر غیراختصاصی قطعات می‌گردد. معمولاً پیش فرض نرم‌افزار برای این پارامتر مناسب بوده و نیازی به تغییر نیست. گزینه‌های Max Mispriming، Max Template Mispriming، Pair Max Template Mispriming روی پیش فرض خود نرم‌افزار تنظیم می‌شوند. این تنظیمات برای این است که آغازگرها در نواحی‌ای که در طول ژنوم تکراری می‌باشند، طراحی صورت نگیرد. در قسمت Primer Size حداقل، حداکثر و اندازه بهینه آغازگر را می‌توان تنظیم نمود. در قسمت Primer Tm؛ حداقل، حداکثر و بهینه Tm آغازگر را می‌توان تنظیم نمود. در قسمت Maximum Tm Difference حداکثر اختلاف دمای Tm آغازگرها را می‌توان تنظیم نمود. بهتر است این اختلاف کمتر از دو باشد. در قسمت Table of thermodynamic parameters مشخص می‌گردد پارامترهای ترمودینامیکی با چه فرمولی محاسبه شوند. قسمت Product Tm بیانگر Tm محصول تکثیر شده می‌باشد. در قسمت Primer GC% حداقل، حداکثر و میزان

می‌باشد. می‌توان از بین این نتایج آغازگر دلخواه خود را انتخاب کرد (شکل ۱۹-ب).

الف

General Primer Picking Conditions

Upload the settings from a file No file chosen

Primer Size Min Opt Max
 Primer Tm Min Opt Max Max Tm Difference [Table of thermodynamic parameters](#)
 Product Tm Min Opt Max
 Primer GC% Min Opt Max

Product Size Ranges

Number To Return Max 3' Stability
 Max Library Mispriming Pair Max Library Mispriming

Thermodynamic Secondary Structure Alignments		Old Secondary Structure Alignments	
☒ Use Thermodynamic Oligo Alignment			
TH: Max Self Complementarity	45.0	Max Self Complementarity	8.00
TH: Max 3' Self Complementarity	35.0	Max 3' Self Complementarity	3.00
TH: Max Pair Complementarity	45.0	Max Pair Complementarity	8.00
TH: Max 3' Pair Complementarity	35.0	Max 3' Pair Complementarity	3.00
TH: Max Primer Hairpin	24.0		

Primer3 Output

ب

PRIMER PICKING RESULTS FOR

ADDITIONAL OLIGOS

	start	len	tm	gc%	any_th	3'_th	hairpin	seq
1 LEFT PRIMER	84	20	58.86	50.00	0.00	0.00	0.00	AGAAGCACCTCTGAACCCAA
RIGHT PRIMER	246	20	59.10	55.00	0.00	0.00	0.00	GCTGACCATCTCCAGAGT
PRODUCT SIZE: 163, PAIR ANY_TH COMPL: 0.00, PAIR 3'_TH COMPL: 0.00								
2 LEFT PRIMER	52	20	58.82	55.00	0.00	0.00	0.00	GTTGCCCCAGAAGACATCC
RIGHT PRIMER	239	20	58.88	60.00	12.25	12.25	0.00	CCATCTCCAGAGTCCAGGAC
PRODUCT SIZE: 188, PAIR ANY_TH COMPL: 0.00, PAIR 3'_TH COMPL: 0.00								
3 LEFT PRIMER	227	20	59.10	55.00	4.49	0.00	0.00	ACTCTGGAGATGGTGTCAAGC
RIGHT PRIMER	378	20	59.23	50.00	0.00	0.00	0.00	AGCTGTGGTGGTGAAGGAAT
PRODUCT SIZE: 152, PAIR ANY_TH COMPL: 0.00, PAIR 3'_TH COMPL: 0.00								
4 LEFT PRIMER	174	20	59.30	55.00	14.43	0.00	0.00	CCAGGCTGTTCTTCCCTCT
RIGHT PRIMER	357	20	58.84	50.00	0.00	0.00	0.00	GCCACGCTCAGTCAAGATT
PRODUCT SIZE: 184, PAIR ANY_TH COMPL: 0.00, PAIR 3'_TH COMPL: 0.00								

Statistics

	con	too	in	in	not	no	tm	tm	high	high	high	high	high
	sid	many	tar	excl	ok	bad	GC	too	too	any_th	3'_th	hair-	poly
	ered	Ns	get	reg	reg	GC%	clamp	low	high	compl	compl	pin	X
	stab	ok											
Left	4422	0	0	0	0	82	0	2174	584	0	0	22	0
Right	4422	0	0	0	0	41	0	2095	589	0	0	19	0

Pair Stats:

considered 835, unacceptable product size 826, primer in pair overlaps a primer in a better pair 158, ok 9

libprimer3 release 2.4.0

(primer3_results.cgi release 4.1.0)

شکل ۱۹- الف) انتخاب پارامترهای مناسب در طراحی آغازگر. ب) نتیجه طراحی آغازگر با نرم‌افزار Primer3. Fig 19. a) Selection of suitable parameters in primer designing. b) Primer designing results with Primer3 software.

متأسفانه این نرم‌افزار به صورت گرافیکی وجود
آغازگرهای مستقیم-مستقیم، معکوس-معکوس و
ساختارهای ثانویه و احتمال تشکیل آغازگر دایمر بین
همچنین مستقیم-معکوس را ارایه نمی‌دهد. برای بررسی

مقاله یا سایت NCBI دانلود کرد. توالی‌های مشابه توالی مورد نظر جستجو می‌شود. برای این کار از سایت NCBI از قسمت BLAST، Nucleotide blast انتخاب شده و توالی در کادر مربوطه وارد شده و Database روی nt/nr قرار داده می‌شود. در خروجی در Description توالی-های مشابه با توالی موردنظر با شاخص‌های E-value و Query coverage به ترتیب نزدیک به صفر و بالا نشان داده می‌شوند. گونه‌هایی که Identity و Query coverage بالای ۷۰ درصد و E-value پایین‌تر از ۰/۰۱ دارند، انتخاب شده و توالی‌هایشان دانلود می‌شود. فایل دانلود شده در نرم‌افزار Notepad++ باز می‌شود. می‌توان توالی‌های EST را هم دانلود کرد. فایل توالی‌های nr و EST باهم ادغام و در یک فایل Notepad جدید وارد شده و با فرمت فایل FASTA ذخیره می‌شود تا برای نرم‌افزار Mega، قابل شناسایی باشد.

فایل در نرم‌افزار Mega باز شده و توالی‌ها نمایش داده می‌شوند. توالی اول، توالی موردنظر است و توالی‌های بعدی، توالی‌های حاصل از BLAST می‌باشند. گزینه DNA Align انتخاب می‌شود. سپس، بین توالی موردنظر و سایر توالی‌ها نقاط محافظت شده، شناسایی می‌شود. اگر تعداد توالی‌ها زیاد باشد، پیدا کردن نقاط محافظت شده کمی مشکل خواهد بود. می‌توان در صورت زیاد بودن توالی‌ها فقط توالی‌های خیلی مشابه را نگه داشت. برای این کار در نرم‌افزار Mega ماتریس فاصله و درخت فیلوژنیک رسم می‌شود، تا توالی‌های خیلی نزدیک با توالی موردنظر شناسایی شوند. از نرم‌افزار Mega در صفحه

تشکیل ساختارهای ثانویه می‌توان از نرم‌افزار Oligo analyzer استفاده نمود. علاوه بر این، باید اختصاصیت آغازگرهایی که با این نرم‌افزار و یا سایر نرم‌افزارها طراحی می‌گردند، با نرم‌افزار Primer blast از سایت NCBI مورد بررسی قرار گیرند که در ادامه مطالب به هر دو روش پرداخته شده است.

نحوه دسترسی به توالی ژن در طراحی آغازگر برای

PCR

بسته به نحوه دسترسی به توالی ژن سه حالت کلی در طراحی آغازگر PCR پیش خواهد آمد؛ حالت اول زمانی است که هیچ اطلاعی از توالی ژن در دسترس نیست. حالت دوم زمانی است که آغازگر از روی توالی‌های EST طراحی می‌شود و حالت سوم طراحی آغازگر با استفاده از داده‌های RNAseq برای ژنی است که هیچ توالی از آن ثبت نشده است.

۱- طراحی آغازگر زمانی که اطلاعاتی از توالی ژن در

دسترس نیست

فرض نمایید گونه‌ای هست که نه تنها توالی ژن بلکه توالی EST و RNASeq نیز برای آن ثبت نشده باشد. اگر در چنین گونه‌ای لازم به بررسی بیان ژن باشد، برای طراحی آغازگر می‌توان توالی ژن در گونه‌های نزدیک به گونه موردنظر را جستجو نمود، سپس توالی‌ها را هم‌ردیف‌سازی (Alignment) نموده و برای نقاط محافظت شده (Conserved) طراحی آغازگر انجام داد. روش کار: برای نزدیک‌ترین گونه به گونه مورد نظر، توالی ژن یا mRNA استخراج می‌شود. این توالی را می‌توان از

اصلی، آیکن Distance گزینه Compute انتخاب شده تا فاصله توالی موردنظر با سایر توالی‌ها محاسبه شود. در نتایج هرچه فواصل کمتر باشد، بدین معنی است که توالی‌ها بهم نزدیک هستند. پس از انتخاب توالی‌های مورد نظر و وارد کردن آن‌ها در فایل Notepad جدید، فایل با پسوند FASTA ذخیره می‌شود. سپس در نرم‌افزار Mega توالی‌ها Align می‌گردند. سپس روی نقاط مشابه که با **** مشخص شده‌اند، آغازگرها طراحی می‌شوند. نقاطی انتخاب می‌شوند که شباهت بیشتری دارند. برای انتخاب آغازگر مستقیم باید نقاط محافظت شده انتخاب شوند. اما یک یا دو نقطه غیرمحافظت شده نیز مشکلی ایجاد نمی‌کند. در نهایت، توالی آغازگر در نرم‌افزار Oligo Analyzer برای بررسی کیفیت تجزیه و تحلیل می‌شود. شکل ۲۰ شماتیکی از مراحل طراحی برای این روش را نشان می‌دهد (شکل ۲۰-الف).

۲-طراحی آغازگر برای توالی ژن موردنظر از روی

توالی‌های EST

در این روش از پایگاه داده EST در NCBI استفاده می‌شود. EST توالی‌بایی بخشی به طول ۵۰۰ نوکلئوتید از طرف سه پریم یا پنج پریم mRNA است. این توالی‌ها در بخش EST پایگاه داده NCBI ثبت و ذخیره می‌شوند. فرض کنید در گونه‌ای مثلاً چاودار که هنوز توالی ژنومی اش مشخص نشده است، قرار است بررسی بیان ژن Actin مدنظر باشد. برای این کار در گونه‌های نزدیک به گونه چاودار مثلاً گندم (Triticum) توالی ژن Actin جستجو می‌شود.

مراحل کار: از سایت NCBI گزینه Nucleotide انتخاب و اسم ژن در کادر باز شده وارد می‌شود. سپس روی گزینه Search کلیک کرده؛ در نتایج Recordها مشاهده می‌شود. از Recordها توالی‌های DNA انتخاب نمی‌شوند. چرا که نیاز به توالی‌های پروتئینی و یا توالی‌های CDS است. از توالی‌های CDS بهتر است از توالی‌های نوع Complete استفاده نمود. در صورت لزوم می‌توان از توالی‌های Partial نیز استفاده نمود. توالی CDS را کپی و از سایت NCBI گزینه BLASTx را انتخاب و توالی وارد می‌شود. در Data base پایگاه داده EST انتخاب می‌شود. در قسمت نتایج، توالی‌های مشابه با توالی‌های پروتئینی ژن Actin نمایش داده می‌شود. در نتایج در Description هرچه عدد Score Max بالاتر باشد و Query coverage (هم‌پوشانی با توالی مورد نظر) و Identity بالای ۷۰٪ و E-value از ۰/۰۱ کمتر باشد، بهتر است. سپس Accession no آن توالی مشابه انتخاب می‌شود. توالی انتخاب شده به احتمال بالا توالی ژن Actin در گونه موردنظر (چاودار) است. می‌توان این توالی را با سایر گونه‌ها که در آنها ژن اکتین شناسایی شده مقایسه کرد تا مطمئن شد توالی انتخاب شده، واقعاً توالی مربوط به ژن اکتین است. سپس از قسمت سمت راست بالای صفحه جاری گزینه Run blast را کلیک کرده تا وارد BLASTN شده و Accession no در کادر مربوطه وارد می‌شود. در قسمت Data base، گزینه Nucleotide collection(nt/nr) انتخاب می‌شود. کادر آرگانیزم را خالی گذاشته تا در همه گونه‌ها مقایسه انجام

شود. در Description، توالی Query با سایر توالی‌های مربوط به ژن Actin در سایر گونه‌ها نشان داده می‌شود. این نشان می‌دهد توالی انتخاب شده به احتمال بالا توالی ژن Actin است که همپوشانی و Identity بالایی با سایر گونه‌ها دارد. می‌توان با استفاده از توالی mRNA یا CDS این مراحل را نیز انجام داد. در نهایت توالی در نرم‌افزار Primer3 وارد و طراحی آغازگر انجام و آغازگرها در Oligo Analyzer برای کیفیت بررسی می‌شوند. شکل ۲۰ شماتیکی از مراحل طراحی برای این روش را نشان می‌دهد (شکل ۲۰-ب).

۳-طراحی آغازگر با استفاده از داده‌های RNAseq

در این حالت ابتدا باید توالی mRNA ژن را با استفاده از داده‌های RNAseq به دست آورد و بعد طراحی آغازگر انجام داد. همان‌طور که در بالا اشاره شد، در کل برای طراحی آغازگر ابتدا باید وارد سایت NCBI یا پایگاه داده-های دیگر شد. اگر در قسمت ژن پایگاه داده، توالی ژن ثبت شده باشد، کار راحت بوده، می‌توان در گونه‌ی مورد نظر توالی ژن را به دست آورد. با کلیک روی ژن موردنظر در گونه مورد بررسی، رکورد ژن نشان داده می‌شود. در قسمت Transcript می‌توان رونوشت‌های ژن که همان mRNA هستند را ملاحظه نمود. روی Refseq RNA (توالی‌های مورد توافق بدون خطا) کلیک می‌شود. در این صورت واریانت‌هایی از mRNA نمایش داده می‌شود. روی یکی از واریانت‌ها کلیک و سپس FASTA انتخاب می‌شود تا توالی نمایش داده شود. بعد می‌توان توالی mRNA را کپی و گزینه Pick primer انتخاب و با وارد

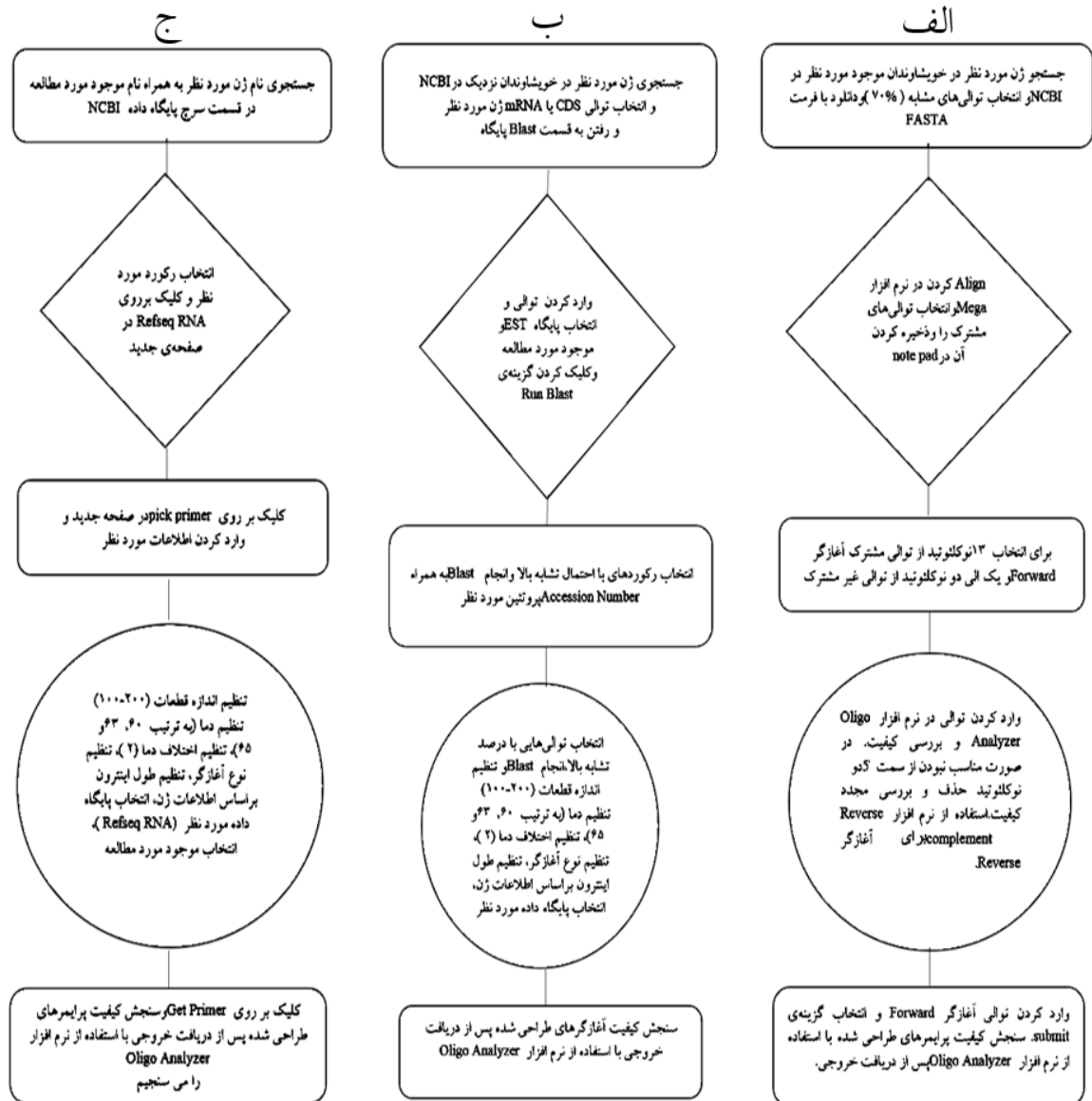
کردن اطلاعات و تکمیل پارامترهای مورد نیاز، آغازگرها را طراحی نمود. در نهایت توالی در نرم‌افزار Oligo Analyzer برای آزمون کیفیت بررسی می‌شود. بعضی مواقع حالتی پیش می‌آید که برای برخی ژن‌ها جستجو در صفحه اصلی NCBI هیچ رکوردی نشان نمی‌دهد. مثلاً ژن Ubq10 Crocus sativus (نام یک ژن در زعفران). اما برای زعفران آنالیزهای RNAseq انجام شده است در این صورت می‌توان آنالیزهای RNAseq ژن موردنظر را در زعفران پیدا کرد و از آن به توالی mRNA ژن مورد نظر دست یافت.

روش کار: برای ژن موردنظر در صفحه اصلی NCBI جستجو انجام می‌گیرد. توالی ژن ubq10 در گونه نزدیک به زعفران انتخاب می‌شود. در بخش Gene، اگر نتوان توالی را در گونه‌های نزدیک به زعفران پیدا نمود، دنبال گونه نزدیک به زعفران در بخش Nucleotid (mRNA) گشته و توالی که نزدیک به زعفران است، انتخاب و روی FASTA آن کلیک کرده تا توالی mRNA نمایش داده شود. ترجیحاً توالی Complete انتخاب می‌شود. توالی در Notepad کپی می‌گردد. حال می‌توان با این توالی که مربوط به گونه نزدیک به زعفران است، توالی این ژن را در زعفران به دست آورد. در ادامه در پایگاه داده NCBI در صفحه اصلی نام علمی زعفران را تایپ کرده و جستجو انجام می‌گیرد. یک بخشی در Genomes مشاهده می‌شود به نام بخش SRA، که شامل تعدادی رکورد است. SRA که هم شامل توالی‌های RNAseq و هم شامل NGS است انتخاب می‌گردد. از

قسمت بالا سمت چپ صفحه روی RNA کلیک کرده تا فقط داده‌های RNASeq نمایش داده شود. در قسمت راست صفحه در Top organisms روی Corcus sativus کلیک کرده تا فقط اطلاعات مربوط به گونه مورد نظر نمایش داده شود. از میان رکوردها، Seq RNAهایی انتخاب می‌شوند که با هدف ما بیشتر همخوانی داشته باشند (البته می‌توان همه رکوردها را انتخاب کرد). بیشتر که جستجو انجام می‌گیرد، ملاحظه می‌شود که داده‌های Seq RNA مربوط به بیان ژن در بخش Stigma در میان رکوردهاست که همان انتخاب می‌گردد. قسمتی تحت عنوان Spot است. همیشه تعداد اسپات بیشتر انتخاب می‌شود. حالا باید این توالی RNA Seq زعفران را با توالی ژن موردنظر در گونه نزدیک به زعفران مقایسه کرد. برای مقایسه از سایت NCBI از گزینه BLAST استفاده می‌شود. Nucleotide BLAST را انتخاب کرده و توالی گونه نزدیک به زعفران داخل کادر مربوطه تایپ می‌گردد. در قسمت Database، SRA را انتخاب کرده و در کادر پایین دیتابیس، Accession no مربوط به RNASeq زعفران که بالاترین Spot را داشت، تایپ می‌گردد. برای جستجوی شباهت بسیار بالا، از گزینه Highly و مشاهده با شباهت زیاد گزینه‌ی More را انتخاب و BLAST انجام می‌گیرد. در خروجی توالی‌های RNASeq مشابه با توالی ژن مورد نظر با گونه نزدیک به زعفران نمایش داده می‌شود. در Description توالی‌های با شاخص E-Value کمتر از ۰/۰۱ و Identity نزدیک به ۱۰۰٪ مهم هستند. میزان

Coverage هم باید بالا باشد. در قسمت Graphic توالی Query موردنظر و توالی‌های حاصل از Blast مشاهده می‌شوند، که متعلق به گونه زعفران است (Query توالی نزدیک به گونه زعفران است). این توالی‌ها نقاط مختلف از توالی مرجع را پوشش می‌دهند و منقطع هستند. بنابراین توالی‌ها باید باهم ادغام شوند. از قسمت Description توالی‌های موردنظر با E-Value کمتر از ۰/۰۱ و میزان Identity بالا انتخاب می‌شوند. توالی‌ها دانلود و با فرمت FASTA (Alignedseq) ذخیره می‌شوند تا در نرم افزار Notepad بتوان باز نمود. حال توالی‌های مربوط به زعفران که مشابه با توالی مرجع است مشاهده می‌شوند. باید این توالی‌ها را ادغام کرد تا توالی بزرگتری از رونوشت (ژن) را بدست آورد. برای این کار می‌توان از نرم‌افزار Cap3sequence assembly استفاده نمود. همه توالی‌ها انتخاب و در کادر مربوطه وارد می‌گردد. سپس گزینه Submit زده می‌شود. سپس توالی ادغام شده (Contigs) مشاهده می‌شود. حال که توالی ژن موردنظر در زعفران به دست آمد برای بررسی اینکه آیا این توالی واقعاً به ژن ubq10 در زعفران تعلق دارد یا نه، از نرم‌افزار BLAST استفاده می‌شود. این توالی با توالی ژن ubq10 در گونه‌های شناخته شده مقایسه می‌گردد. برای این منظور این توالی نهایی Contig شده را کپی کرده و وارد سایت NCBI شده و گزینه Nucleotide BLAST انتخاب می‌شود. توالی نوکلئوتیدی را وارد کادر کرده و در Database گزینه RNA-refseq که توالی‌های مرجع کامل و فاقد خطا است، انتخاب می‌شود. کادر ارگانیزم را

خالی گذاشته تا برای تمام گونه‌ها مقایسه را انجام دهد
سپس گزینه BLAST انتخاب می‌شود (برای مقایسه از
tblastx هم می‌توان استفاده کرد). blastn خود توالی را
مستقیم مقایسه می‌کند ولی tblastx مقایسه را با
پروتئین کد شده از توالی مرجع انجام می‌دهد. اگر Pr کد
شده این توالی با توالی‌های مرجع مشابه باشد به کاربر
گزارش داده خواهد شد. بین گونه‌ها ممکن است توالی
نوکلئوتیدی متفاوت باشد ولی توالی پروتئینی یکسان
باشد. در tblastx باز توالی را وارد کرده و در قسمت
Database باز RNA-refseq را انتخاب و BLAST
انجام می‌گیرد. در قسمت Description شباهت بسیار
بالای توالی ژن نهایی مورد نظر با توالی‌های ژن ubq10
در سایر گونه‌ها نشان داده می‌شود. Identity
و Coverage E-value بالا احتمالاً نشان‌دهنده توالی ژن
نهایی مورد نظر، یعنی ubq10 است. در نهایت توالی در
نرم‌افزار Primer3 وارد و طراحی آغازگر انجام و آغازگرها
در Oligo Analyzer برای کیفیت بررسی می‌شوند.



شکل ۲۰- الف) مراحل طراحی آغازگر زمانی که هیچ اطلاعاتی از توالی ژن در دسترس نیست، ب) طراحی آغازگر برای توالی ژن مورد نظر از روی توالی‌های EST و ج) طراحی آغازگر با استفاده از داده‌های RNAseq برای ژنی که هیچ توالی از آن ثبت نشده است.

Figure 20. A) Primer design steps when no gene sequence information is available, neither EST nor RNAseq. B) Primer design for the desired gene sequence from EST sequences. C) Primer design using RNAseq data for a gene whose sequence has not been recorded.

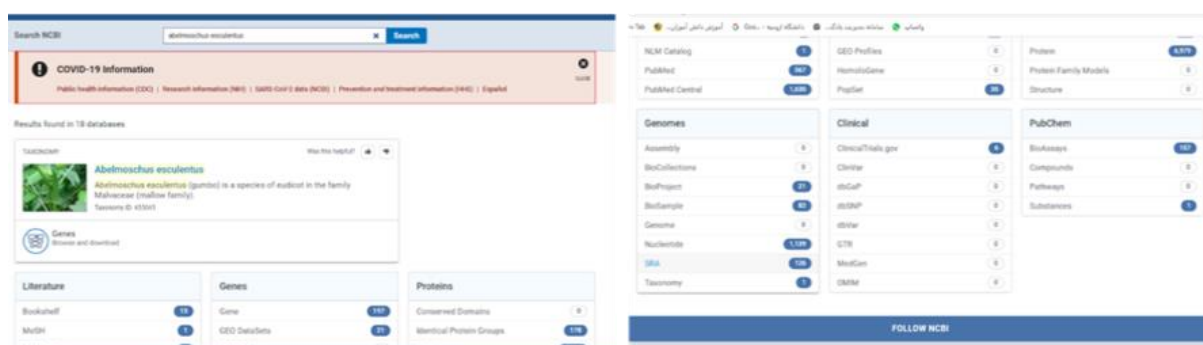
شود که هیچ توالی برای این ژن ثبت نشده است. برای گونه‌های خویشاوند آن مثل پنیرک با نام علمی *Malva sylvestris* و ختمی با نام علمی *Alcea rosea* نیز توالی ثبت شده‌ای وجود ندارد. با ادامه جستجو ملاحظه

مثال عملی طراحی آغازگر برای بررسی بیان ژن SOS در گیاه *Okra* با استفاده از داده‌های RNAseq وقتی در سایت NCBI نام ژن و گیاه بامیه با نام علمی *Esculentus abelmoschus* وارد می‌شود، ملاحظه می‌-

الف). سپس توالی به دست آمده از پنبه را به BLAST برده و چون توالی ورودی نوکلئوتید و توالی خروجی نیز نوکلئوتید می‌باشد، از Nucleotide Blast استفاده می‌شود. پایگاه داده را SRA انتخاب و نام بامیه را وارد کرده و در کادر مربوطه Accession number مجموعه RNASeq مربوطه تایپ می‌شود. توالی پنبه با توالی‌های موجود در مجموعه RNASeq مقایسه شده و شبیه‌ترین توالی‌ها نمایش داده می‌شود (شکل ۲۱ ب و ج).

می‌شود از تیره پنبه برای گیاه پنبه با نام علمی *Gossypium herbaceum* رکورد ثبت شده‌ای برای ژن مورد نظر وجود دارد. توالی Refseq RNAs ژن به فرمت FASTA دانلود و در نرم‌افزار Notepad++ ذخیره می‌شود. در ادامه برای گیاه Okra (بامیه) با نام علمی *Abelmoschus esculentus* در NCBI جستجو انجام می‌گیرد و SRA بررسی می‌شود. از بین گزینه‌ها توالی انتخاب می‌شود که بیشترین Spot را دارد (شکل ۲۱-).

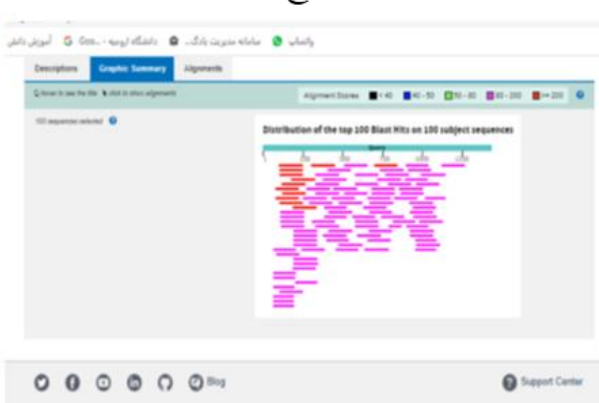
الف



ب

Sequences producing significant alignments	Download	Manage columns	Show																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Accession</th><th>Ref. Seq.</th><th>Query Cover</th><th>E-value</th><th>Identical</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>AB011111.1</td><td>AB011111.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011112.1</td><td>AB011112.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011113.1</td><td>AB011113.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011114.1</td><td>AB011114.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011115.1</td><td>AB011115.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011116.1</td><td>AB011116.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011117.1</td><td>AB011117.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011118.1</td><td>AB011118.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011119.1</td><td>AB011119.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011120.1</td><td>AB011120.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011121.1</td><td>AB011121.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011122.1</td><td>AB011122.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011123.1</td><td>AB011123.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011124.1</td><td>AB011124.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011125.1</td><td>AB011125.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011126.1</td><td>AB011126.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011127.1</td><td>AB011127.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011128.1</td><td>AB011128.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011129.1</td><td>AB011129.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011130.1</td><td>AB011130.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011131.1</td><td>AB011131.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011132.1</td><td>AB011132.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011133.1</td><td>AB011133.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011134.1</td><td>AB011134.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011135.1</td><td>AB011135.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011136.1</td><td>AB011136.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011137.1</td><td>AB011137.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011138.1</td><td>AB011138.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011139.1</td><td>AB011139.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011140.1</td><td>AB011140.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011141.1</td><td>AB011141.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011142.1</td><td>AB011142.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011143.1</td><td>AB011143.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011144.1</td><td>AB011144.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011145.1</td><td>AB011145.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011146.1</td><td>AB011146.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011147.1</td><td>AB011147.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011148.1</td><td>AB011148.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011149.1</td><td>AB011149.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011150.1</td><td>AB011150.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011151.1</td><td>AB011151.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011152.1</td><td>AB011152.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011153.1</td><td>AB011153.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011154.1</td><td>AB011154.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011155.1</td><td>AB011155.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011156.1</td><td>AB011156.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011157.1</td><td>AB011157.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011158.1</td><td>AB011158.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011159.1</td><td>AB011159.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011160.1</td><td>AB011160.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011161.1</td><td>AB011161.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011162.1</td><td>AB011162.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011163.1</td><td>AB011163.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011164.1</td><td>AB011164.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011165.1</td><td>AB011165.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011166.1</td><td>AB011166.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011167.1</td><td>AB011167.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011168.1</td><td>AB011168.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011169.1</td><td>AB011169.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011170.1</td><td>AB011170.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011171.1</td><td>AB011171.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011172.1</td><td>AB011172.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011173.1</td><td>AB011173.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011174.1</td><td>AB011174.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011175.1</td><td>AB011175.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011176.1</td><td>AB011176.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011177.1</td><td>AB011177.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011178.1</td><td>AB011178.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011179.1</td><td>AB011179.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011180.1</td><td>AB011180.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011181.1</td><td>AB011181.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011182.1</td><td>AB011182.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011183.1</td><td>AB011183.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011184.1</td><td>AB011184.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011185.1</td><td>AB011185.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011186.1</td><td>AB011186.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011187.1</td><td>AB011187.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011188.1</td><td>AB011188.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011189.1</td><td>AB011189.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011190.1</td><td>AB011190.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011191.1</td><td>AB011191.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011192.1</td><td>AB011192.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011193.1</td><td>AB011193.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011194.1</td><td>AB011194.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011195.1</td><td>AB011195.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011196.1</td><td>AB011196.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011197.1</td><td>AB011197.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011198.1</td><td>AB011198.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011199.1</td><td>AB011199.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> <tr><td>AB011200.1</td><td>AB011200.1</td><td>100%</td><td>1e-10</td><td>100%</td></tr> </tbody> </table>	Accession	Ref. Seq.	Query Cover	E-value	Identical	AB011111.1	AB011111.1	100%	1e-10	100%	AB011112.1	AB011112.1	100%	1e-10	100%	AB011113.1	AB011113.1	100%	1e-10	100%	AB011114.1	AB011114.1	100%	1e-10	100%	AB011115.1	AB011115.1	100%	1e-10	100%	AB011116.1	AB011116.1	100%	1e-10	100%	AB011117.1	AB011117.1	100%	1e-10	100%	AB011118.1	AB011118.1	100%	1e-10	100%	AB011119.1	AB011119.1	100%	1e-10	100%	AB011120.1	AB011120.1	100%	1e-10	100%	AB011121.1	AB011121.1	100%	1e-10	100%	AB011122.1	AB011122.1	100%	1e-10	100%	AB011123.1	AB011123.1	100%	1e-10	100%	AB011124.1	AB011124.1	100%	1e-10	100%	AB011125.1	AB011125.1	100%	1e-10	100%	AB011126.1	AB011126.1	100%	1e-10	100%	AB011127.1	AB011127.1	100%	1e-10	100%	AB011128.1	AB011128.1	100%	1e-10	100%	AB011129.1	AB011129.1	100%	1e-10	100%	AB011130.1	AB011130.1	100%	1e-10	100%	AB011131.1	AB011131.1	100%	1e-10	100%	AB011132.1	AB011132.1	100%	1e-10	100%	AB011133.1	AB011133.1	100%	1e-10	100%	AB011134.1	AB011134.1	100%	1e-10	100%	AB011135.1	AB011135.1	100%	1e-10	100%	AB011136.1	AB011136.1	100%	1e-10	100%	AB011137.1	AB011137.1	100%	1e-10	100%	AB011138.1	AB011138.1	100%	1e-10	100%	AB011139.1	AB011139.1	100%	1e-10	100%	AB011140.1	AB011140.1	100%	1e-10	100%	AB011141.1	AB011141.1	100%	1e-10	100%	AB011142.1	AB011142.1	100%	1e-10	100%	AB011143.1	AB011143.1	100%	1e-10	100%	AB011144.1	AB011144.1	100%	1e-10	100%	AB011145.1	AB011145.1	100%	1e-10	100%	AB011146.1	AB011146.1	100%	1e-10	100%	AB011147.1	AB011147.1	100%	1e-10	100%	AB011148.1	AB011148.1	100%	1e-10	100%	AB011149.1	AB011149.1	100%	1e-10	100%	AB011150.1	AB011150.1	100%	1e-10	100%	AB011151.1	AB011151.1	100%	1e-10	100%	AB011152.1	AB011152.1	100%	1e-10	100%	AB011153.1	AB011153.1	100%	1e-10	100%	AB011154.1	AB011154.1	100%	1e-10	100%	AB011155.1	AB011155.1	100%	1e-10	100%	AB011156.1	AB011156.1	100%	1e-10	100%	AB011157.1	AB011157.1	100%	1e-10	100%	AB011158.1	AB011158.1	100%	1e-10	100%	AB011159.1	AB011159.1	100%	1e-10	100%	AB011160.1	AB011160.1	100%	1e-10	100%	AB011161.1	AB011161.1	100%	1e-10	100%	AB011162.1	AB011162.1	100%	1e-10	100%	AB011163.1	AB011163.1	100%	1e-10	100%	AB011164.1	AB011164.1	100%	1e-10	100%	AB011165.1	AB011165.1	100%	1e-10	100%	AB011166.1	AB011166.1	100%	1e-10	100%	AB011167.1	AB011167.1	100%	1e-10	100%	AB011168.1	AB011168.1	100%	1e-10	100%	AB011169.1	AB011169.1	100%	1e-10	100%	AB011170.1	AB011170.1	100%	1e-10	100%	AB011171.1	AB011171.1	100%	1e-10	100%	AB011172.1	AB011172.1	100%	1e-10	100%	AB011173.1	AB011173.1	100%	1e-10	100%	AB011174.1	AB011174.1	100%	1e-10	100%	AB011175.1	AB011175.1	100%	1e-10	100%	AB011176.1	AB011176.1	100%	1e-10	100%	AB011177.1	AB011177.1	100%	1e-10	100%	AB011178.1	AB011178.1	100%	1e-10	100%	AB011179.1	AB011179.1	100%	1e-10	100%	AB011180.1	AB011180.1	100%	1e-10	100%	AB011181.1	AB011181.1	100%	1e-10	100%	AB011182.1	AB011182.1	100%	1e-10	100%	AB011183.1	AB011183.1	100%	1e-10	100%	AB011184.1	AB011184.1	100%	1e-10	100%	AB011185.1	AB011185.1	100%	1e-10	100%	AB011186.1	AB011186.1	100%	1e-10	100%	AB011187.1	AB011187.1	100%	1e-10	100%	AB011188.1	AB011188.1	100%	1e-10	100%	AB011189.1	AB011189.1	100%	1e-10	100%	AB011190.1	AB011190.1	100%	1e-10	100%	AB011191.1	AB011191.1	100%	1e-10	100%	AB011192.1	AB011192.1	100%	1e-10	100%	AB011193.1	AB011193.1	100%	1e-10	100%	AB011194.1	AB011194.1	100%	1e-10	100%	AB011195.1	AB011195.1	100%	1e-10	100%	AB011196.1	AB011196.1	100%	1e-10	100%	AB011197.1	AB011197.1	100%	1e-10	100%	AB011198.1	AB011198.1	100%	1e-10	100%	AB011199.1	AB011199.1	100%	1e-10	100%	AB011200.1	AB011200.1	100%	1e-10	100%			
Accession	Ref. Seq.	Query Cover	E-value	Identical																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011111.1	AB011111.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011112.1	AB011112.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011113.1	AB011113.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011114.1	AB011114.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011115.1	AB011115.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011116.1	AB011116.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011117.1	AB011117.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011118.1	AB011118.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011119.1	AB011119.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011120.1	AB011120.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011121.1	AB011121.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011122.1	AB011122.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011123.1	AB011123.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011124.1	AB011124.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011125.1	AB011125.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011126.1	AB011126.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011127.1	AB011127.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011128.1	AB011128.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011129.1	AB011129.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011130.1	AB011130.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011131.1	AB011131.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011132.1	AB011132.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011133.1	AB011133.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011134.1	AB011134.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011135.1	AB011135.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011136.1	AB011136.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011137.1	AB011137.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011138.1	AB011138.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011139.1	AB011139.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011140.1	AB011140.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011141.1	AB011141.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011142.1	AB011142.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011143.1	AB011143.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011144.1	AB011144.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011145.1	AB011145.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011146.1	AB011146.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011147.1	AB011147.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011148.1	AB011148.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011149.1	AB011149.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011150.1	AB011150.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011151.1	AB011151.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011152.1	AB011152.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011153.1	AB011153.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011154.1	AB011154.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011155.1	AB011155.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011156.1	AB011156.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011157.1	AB011157.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011158.1	AB011158.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011159.1	AB011159.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011160.1	AB011160.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011161.1	AB011161.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011162.1	AB011162.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011163.1	AB011163.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011164.1	AB011164.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011165.1	AB011165.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011166.1	AB011166.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011167.1	AB011167.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011168.1	AB011168.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011169.1	AB011169.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011170.1	AB011170.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011171.1	AB011171.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011172.1	AB011172.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011173.1	AB011173.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011174.1	AB011174.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011175.1	AB011175.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011176.1	AB011176.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011177.1	AB011177.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011178.1	AB011178.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011179.1	AB011179.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011180.1	AB011180.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011181.1	AB011181.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011182.1	AB011182.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011183.1	AB011183.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011184.1	AB011184.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011185.1	AB011185.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011186.1	AB011186.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011187.1	AB011187.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011188.1	AB011188.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011189.1	AB011189.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011190.1	AB011190.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011191.1	AB011191.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011192.1	AB011192.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011193.1	AB011193.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011194.1	AB011194.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011195.1	AB011195.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011196.1	AB011196.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011197.1	AB011197.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011198.1	AB011198.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011199.1	AB011199.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
AB011200.1	AB011200.1	100%	1e-10	100%																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						

ج



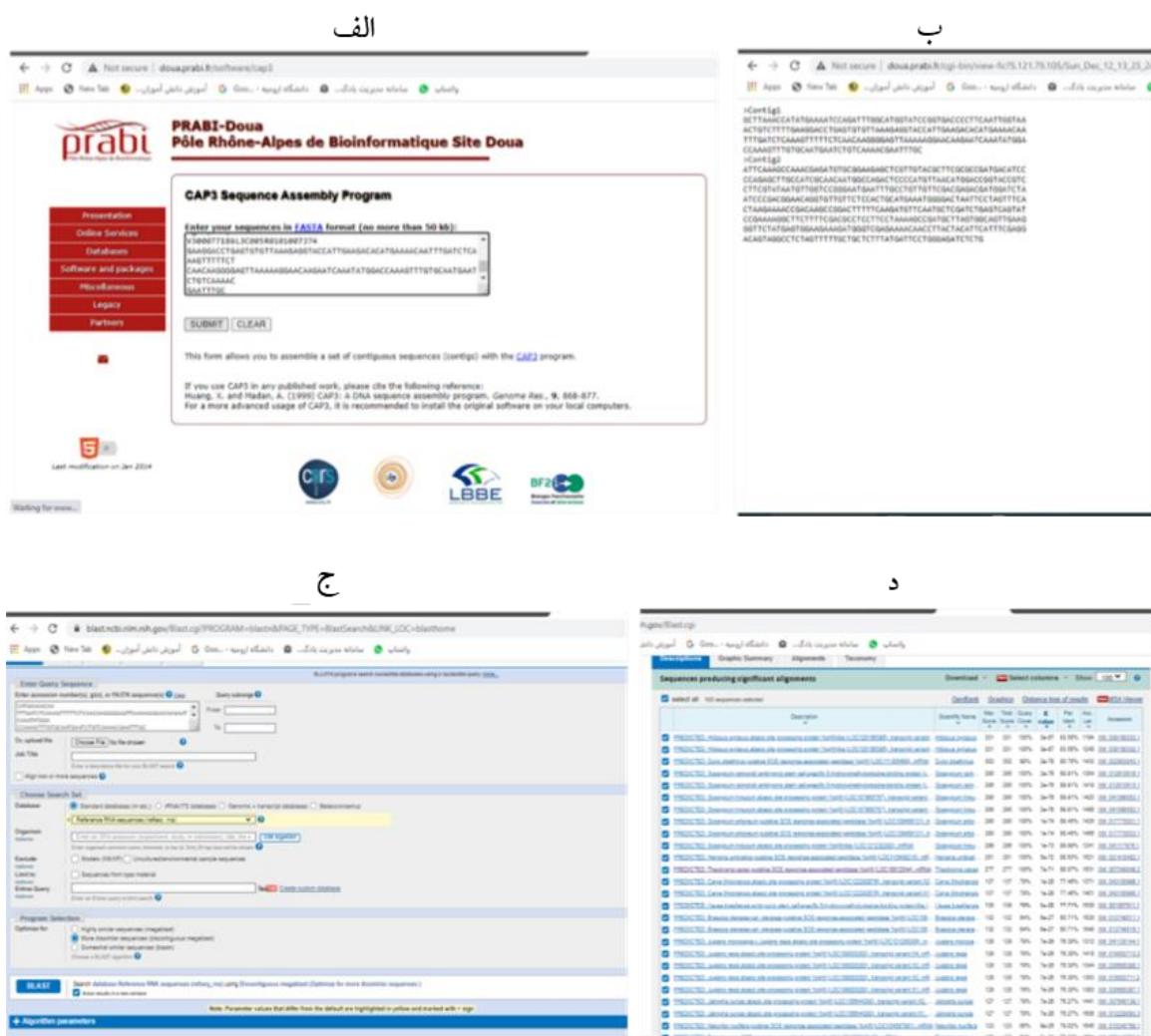
شکل ۲۱- الف) بررسی SRA گونه مورد نظر. ب) توصیف آماری نتایج مقایسه. ج) توصیف گرافیکی نتایج مقایسه.
Fig21. a) Checking the SRA of the desired species. b) Statistical description of the comparison results. c) Graphical description of comparison results

توالی‌هایی که دارای Identical بالا و نزدیک ۹۰ درصد و E-Value کمتر از ۰/۰۱ هستند، انتخاب شده و به برنامه Cap3sequence assembly منتقل می‌شوند تا باهم ادغام شوند (شکل ۲۲-الف).

تمام توالی‌ها را در کادر

ج). به احتمال زیاد توالی ادغام شده، توالی ژن مورد نظر است (شکل ۲۲-د). هرکدام از توالی‌های ادغام شده را به Primer 3pluse برده و طراحی آغازگر انجام می‌گیرد و سپس ویژگی‌های تک تک آغازگرها در نرم افزار Oligo Analyzer بررسی می‌گردد.

مربوطه کپی کرده و با انتخاب گزینه Submit و سپس Contigs، توالی ادغام شده نمایش داده می‌شود (شکل ۲۲-ب). دو توالی ادغام شده را به طور جداگانه به برنامه BLAST برده و در کادر Database، Refseq RNA انتخاب و نام ارگانسیم خالی گذاشته می‌شود (شکل ۲۲-).



شکل ۲۲- الف) استفاده از برنامه‌ی Cap3sequence assembly جهت ادغام توالی. ب) نتیجه‌ی ادغام توالی ج) نرم‌افزار Primer3. د) مشاهده‌ی توالی ژن مورد نظر.

Fig22. a) Using the Cap3sequence assembly program to integrate the sequence. b) Sequence integration results c) Primer3 software. d) Observing the desired gene sequence.

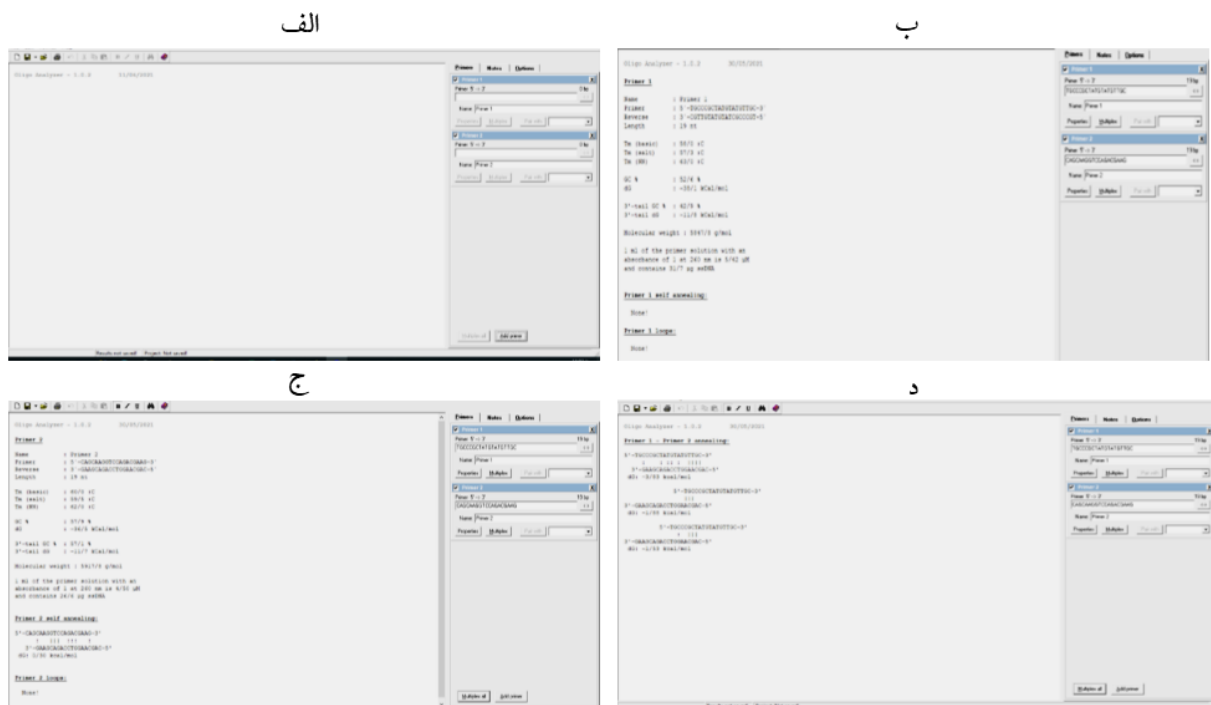
با استفاده از نرم‌افزار (IDT) Oligo analyzer می‌توان کیفیت آغازگرها مانند طول آغازگر، دمای TM، مقدار و

بررسی ساختارهای ثانویه آغازگرها با استفاده از

نرم‌افزار (IDT) Oligo analyzer

۲۳-ب). همچنین برای بررسی ویژگی‌های آغازگر معکوس نیز توالی آغازگر موردنظر در کادر Primer 2 وارد شده و با کلیک روی گزینه‌ی Properties اطلاعات نشان داده می‌شوند (شکل ۲۳-ج). در نهایت برای بررسی وجود ساختارهای ثانویه بین دو آغازگر مستقیم و معکوس، پس از وارد کردن توالی هر دو آغازگر در کادرهای مربوطه گزینه Multiplex all کلیک می‌شود (شکل ۲۳-د).

درصد بازهای GC، نحوه اتصال آغازگرها و تشکیل ساختارهای ثانویه، تشکیل Self-dimer و Hetero-dimer و Hair-pin را بررسی کرد. نمای کلی نرم‌افزار الیگو آنالایزر در شکل ۲۳ آمده است (شکل ۲۳-الف). جهت بررسی ویژگی‌های آغازگر مستقیم، توالی آغازگر مورد نظر در کادر Primer1 منتقل شده و با کلیک روی گزینه‌ی Properties اطلاعات نشان داده می‌شوند (شکل



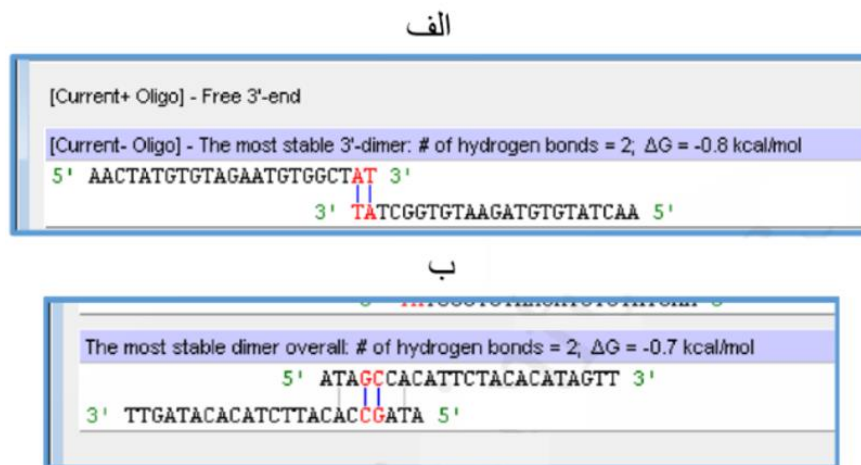
شکل ۲۳-الف) نمای کلی نرم‌افزار الیگو آنالایزر. ب) وارد کردن توالی آغازگر مستقیم و مشاهده ویژگی‌های آغازگر. ج) وارد کردن توالی آغازگر معکوس و مشاهده ویژگی‌های آغازگر. د) وارد کردن توالی هر دو آغازگر برای بررسی ساختارهای ثانویه.

Fig23. a) Overview of Oligo Analyzer software. b) Entering the primer sequence directly and observing the properties of the primer. c) Entering the reverse primer sequence and observing the properties of the primer. d) entering the sequence of both primers to examine the secondary structures.

مشکل‌ساز خواهند بود. در مثال اول Duplex برای یکی از آغازگرهای انتخاب شده تشکیل شده است. همانطور که مشاهده می‌شود در ناحیه ۳' آغازگرها تنها دو نوکلئوتید با

جهت بررسی تشکیل Self-Dimer، به Delta G توجه می‌شود. Delta G تا 4 - مشکلی در انجام صحیح PCR ایجاد نخواهد کرد. اما Delta G های منفی‌تر، معمولاً

هم جور شده‌اند که این حالت برای طراحی آغازگر مناسب می‌باشد، اما در صورتی که در سمت ۳' آغازگر چهار عدد نوکلئوتید و یا بیشتر با هم جور شوند، باید نقطه دیگری را برای طراحی آغازگر انتخاب نمود (شکل ۲۴-الف). مثال دوم جور شدن بازها درون آغازگر را نشان می‌دهد که در ۲۴-ب).



شکل ۲۴- الف) حالت جفت شدن نوکلئوتیدها در انتهای ۳' ب) حالت جفت شدن نوکلئوتیدها درون توالی آغازگر.

Figure 24. a) Pairing mode of nucleotides at the end of 3'. b) Pairing mode of nucleotides in the primer sequence.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>

(blast).

در این قسمت آغازگرهای مستقیم CCTCTCTGAATTGACTGTCCC و معکوس GTGGATGCTTGGGTTTCCTGA از نظر اختصاصیت بررسی می‌شوند. توالی آغازگر مستقیم و معکوس در بخش Primer Parameters و در باکس‌های Use my own و Use my own forward primer reverse primer (کادر 2 و 3) وارد می‌شوند. به دلیل بررسی اختصاصیت آغازگرها در این بخش در کادر 1 هیچ

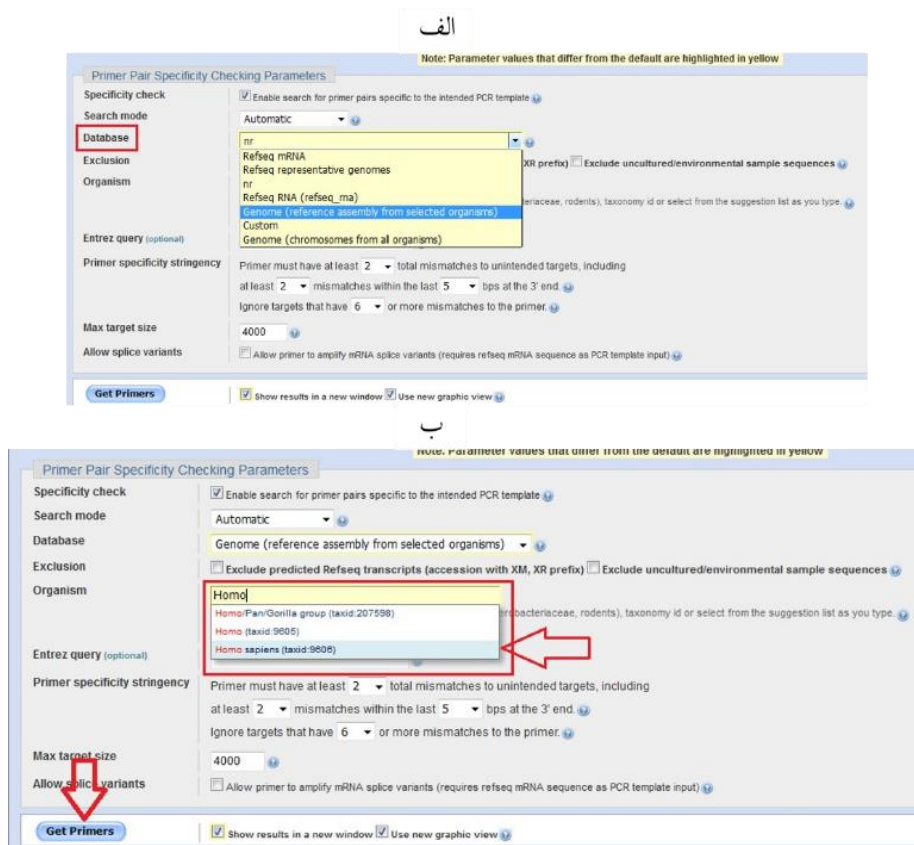
باید توجه داشت که در انتهای ۳' دو آغازگر بیش از سه باز جفت نشوند و در مجموع هرچقدر که تعداد این جفت‌شدگی‌ها کمتر باشد، مناسب بودن آغازگرها را نشان می‌دهد. پس از طراحی آغازگرهای مورد نظر باید اختصاصی بودن آغازگرها مورد بررسی قرار گیرد تا اطمینان حاصل شود که آغازگرهای طراحی شده فقط قطعه مورد نظر را تکثیر خواهند کرد. برای این منظور به سایت NCBI مراجعه کرده و در بخش BLAST و سپس Primer Blast بررسی انجام می‌شود

صفحه بعدی خواهد شد. شکل ۲۷ نتایج عملیات بررسی اختصاصیت آغازگرها را نشان می‌دهد. در کادر ۱ این شکل اطلاعاتی از جمله توالی، طول Tm، درصد GC آغازگرهای مستقیم و معکوس و همچنین احتمال تشکیل دایمر را می‌توان مشاهده کرد. بیشینه قابل قبول ۵'-Self Complementarity برای آغازگرها ۸ و در بهترین حالت برابر صفر است. بیشینه قابل قبول برای 3'-Self Complementarity برای آغازگرها ۳ و در حالت ایده‌آل صفر می‌باشد. کادر ۲ اندازه محصول اختصاصی این جفت آغازگر و ژنی که تکثیر می‌شود به همراه ناحیه کروموزومی را نشان می‌دهد. کادر ۳ هم‌ردیفی اختصاصی بین آغازگرها و ژنوم را نشان می‌دهد (شکل ۲۷).

توالی‌ای وارد نمی‌شود. تنظیمات کادر ۴ در حالت پیش فرض قرار می‌گیرد. این پارامترها برای طراحی آغازگر می‌باشند (شکل ۲۵). یکی از مهمترین تنظیمات بلاست آغازگر تنظیمات بخش Database می‌باشد. این قسمت بر روی nr قرار می‌گیرد تا نرم افزار اتصال آغازگرها بر روی mRNA و DNA ژنومی را مورد بررسی قرار دهد. تنظیمات بخش Primer Specificity Checking Parameters به صورت پیش فرض تنظیم می‌شود (شکل ۲۶-الف). در تنظیمات بعدی در کادر Organism اسم علمی موجود را تایپ کرده و سایر گزینه‌های نرم‌افزار در حالت پیش فرض نگه داشته می‌شود در پایان روی گزینه Get Primer کلیک می‌شود (شکل ۲۶-ب). نرم‌افزار پس از آنالیز داده‌های ورودی به صورت خودکار وارد

The screenshot shows the Primer Blast web interface.
 - Box 1 highlights the 'Enter accessions, FASTA sequences or a Gene ID' input field.
 - Box 2 highlights the 'Use my own forward primer' input field with the sequence 'CCTCTCTGAATGACTGTCCC'.
 - Box 3 highlights the 'Use my own reverse primer' input field with the sequence 'GTGGATGCTTGGGTTCCTGA'.
 - Box 4 highlights the 'PCR product size' section, showing 'Min' as 70, 'Opt' as 1000, and 'Max' as 10.

شکل ۲۵) نمای کلی نرم‌افزار Primer Blast و وارد کردن پارامترهای مورد نیاز برای بررسی اختصاصیت آغازگر.
 Fig 25. Overview of Primer Blast software and entering required parameters to check primer specificity.



شکل ۲۶- الف) تنظیمات بخش Database. ب) تنظیمات بخش ارگانیسم.

Fig 26. a) Database section settings, b) Organism section settings.

Primer pair 1						
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CCTCTCTGAATTGACTGTCCC	21	57.74	52.38	5.00	1.00
Reverse primer	GTGGATGCTTGGGTTCTCTGA	20	59.96	55.00	3.00	2.00
Products on target templates						
>NC_000006.12 Homo sapiens chromosome 6, GRCh38.p7 Primar						
product length = 1117						
Features associated with this product:						
lymphotoxin-alpha isoform X1						
lymphotoxin-alpha isoform X1						
Forward primer	1 CCTCTCTGAATTGACTGTCCC	21				
Template	31571995	31572015				
Reverse primer	1 GTGGATGCTTGGGTTCTCTGA	20				
Template	31573111	31573092				

شکل ۲۷) نتایج عملیات بررسی اختصاصیت آغازگرها.

Figure 27. The results of the operation of checking the specificity of the primers.

نکته مهم را مورد توجه قرار داد. نخست طول قطعات و دوم تعداد نوکلئوتیدهای Mismatched در انتهای ۳' آغازگر. وقتی که طول قطعات کمتر از ۲۰۰۰ جفت باز باشد، احتمال تکثیر شدن آن‌ها با روش PCR معمولی

اگر در نتایج Blast آغازگرها محصولات غیر اختصاصی با طول‌های مختلف نشان داده شوند، این سوال پیش می‌آید که آیا این محصولات غیر اختصاصی در عمل هم تکثیر می‌شوند یا نه؟ برای رسیدن به جواب این سوال باید دو

پایین است. بنابراین قطعات کوچکتر از ۲۰۰۰ جفت باز از نظر تعداد Mismatch ها مخصوصاً طرف ۳' آغازگر مورد بررسی قرار می‌گیرد. در عمل وقتی که باز انتهایی در طرف ۳' آغازگر یک Mismatch باشد، احتمال تکثیر قطعه مربوطه به شدت کاهش می‌یابد. هرچه تعداد این Mismatch ها بیشتر باشد، به همان نسبت احتمال تولید محصول غیر اختصاصی کمتر می‌شود.

بحث

امروزه PCR یک تکنیک بسیار پیشرفته و در عین حال ساده است که به دلیل توانایی آن در به دست آوردن نتایج کیفی و کمی، تطبیق پذیری خود را در اکثر زمینه‌های علوم زیستی و پزشکی ثابت کرده است. اختراع PCR با کاربرد آن در تشخیص بالینی، انگشت نگاری DNA، پروفایل DNA و فناوری DNA نو ترکیب، جدا از نقش آن در سایر زمینه‌های باستان‌شناسی، مردم‌شناسی، پزشکی قانونی، برای علم مدرن یک موهبت بوده است. کشف ژنوم انسان و همچنین ژنوم بسیاری از موجودات دیگر از جمله چندین گونه گیاهی منجر به استفاده قوی از PCR در هر یک از شکل‌ها برای تجزیه و تحلیل علمی دقیق شده است. آینده کاربردهای جدیدتری از PCR در علوم زیستی را به همراه خواهد داشت. کلید PCR در طراحی دو آغازگر الیگونوکلوئید نهفته است. ضروری است که در طراحی آغازگرهای PCR دقت شود. چندین

پارامتر از جمله طول آغازگر، درصد محتوای GC و توالی طرف ۳' برای موفقیت PCR باید بهینه شود. استفاده روز افزون از اطلاعات از اینترنت و توالی‌های نگهداری شده در پایگاه داده‌های ژنی از نقاط شروع عملی هنگام طراحی آغازگرها برای PCR است. کاربردهای گسترده PCR باعث توسعه طیف گسترده‌ای از برنامه‌های نرم‌افزاری برای طراحی آغازگر شده است. طبقه‌بندی و بررسی گزینه‌های نرم‌افزارهای موجود و قابلیت‌های آن‌ها باید منبع ارزشمندی برای هر برنامه PCR باشد. علم زیست‌شناسی و به ویژه بیوتکنولوژی به سرعت در حال تغییر است و به روزرسانی مداوم استراتژی‌ها و روش‌ها برای حفظ پیشرفت سریع و کارآمد ضروری است. استراتژی‌های محاسباتی در بیوتکنولوژی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. الگوریتم‌های مربوط به طراحی کارآمد آغازگرها باید با در نظر گرفتن داده‌های تجربی اصلاح شوند (Singh et al., 2001). یک آنالیز qPCR و PCR قابل اعتماد به آغازگرهای خوبی نیاز دارد. این معمولاً به معنای ویژگی مطلق، عدم وجود ساختارهای سنجاق سر یا پتانسیل متقاطع دیمریزاسیون و تحمل دما است. طراحی خوب باید ساختار آمپلیکون را در نظر بگیرد و اطمینان حاصل کند که مکان‌های هدف آغازگر از ساختار ثانویه عاری هستند (Bustin & Huggett, 2017).

References

- Al Mazrooei, S. S., & Alreshidi, D. R. 2023. PCR-screening of genetically modified organisms in food and feed products sold in Kuwait's market. Kuwait Journal of Science.

- Baechtel, F.S., & Quantico, V. 1989. The extraction, purification and quantification of DNA. In Proceedings of the International Symposium on the Forensic Aspects of DNA Analysis (pp. 25-28). United States Government Printing Office.
- Baltimore, D. 1970. Viral RNA-dependent DNA polymerase: RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature*, 226(5252), 1209-1211.
- Banifatemeh, M., Darvishzadeh, R., & Arzhang, S. 2021. The expression pattern of ZmNHX1, ZmHKT1, and ZmMYB30 genes in maize under salinity stress. *Agricultural Biotechnology Journal*, 13(1), 137-158.
- Bebenek, K., & Kunkel, T.A. 1989. The use of native T7 DNA polymerase for site-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Research*, 17(13), 5408.
- Benson, L.M., Null, A.P., & Muddiman, D.C. 2003. Advantages of *Thermococcus kodakaraensis* (KOD) DNA polymerase for PCR-mass spectrometry based analyses. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 14(6), 601-604.
- Breslauer, K.J., Frank, R., Blöcker, H., & Marky, L.A. 1986. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(11), 3746-3750.
- Brock, T.D., & Freeze, H. 1969. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *Journal of Bacteriology*, 98(1), 289-297.
- Bustin, S., & Huggett, J. 2017. qPCR primer design revisited. *Biomolecular Detection and Quantification*, 14, 19-28.
- Butler, J.M. 2005. Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers. Elsevier.
- Cahill, P., Bakis, M., Hurley, J., Kamath, V., Nielsen, W., Weymouth, D, ... & Smith, D.R. 2003. Exo-proofreading, a versatile SNP scoring technology. *Genome Research*, 13(5), 925-931.
- Carracedo, A. (Ed.). 2005. Forensic DNA typing protocols (Vol. 297). Springer Science & Business Media.
- Chen, H., & Zhu, G. 1997. Computer program for calculating the melting temperature of degenerate oligonucleotides used in PCR or hybridization. *Biotechniques*, 22(6), 1158-1160.
- Chou, Q., Russell, M., Birch, D.E., Raymond, J., & Bloch, W. 1992. Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Research*, 20(7), 1717-1723.
- Dale, R.M.K., McClure, B.A., & Houchins, J.P. 1985. A rapid single-stranded cloning strategy for producing a sequential series of overlapping clones for use in DNA sequencing: application to sequencing the corn mitochondrial 18 S rDNA. *Plasmid*, 13(1), 31-40.
- Deepa, N., Adkar-Purushothama, C. R., & Sreenivasa, M. Y. 2016. Nested PCR method for early detection of fumonisin producing *Fusarium verticillioides* in pure cultures, cereal samples and plant parts. *Food Biotechnol*, 30(1), 18-29.
- Diaz, R.S., & Sabino, E.C. 1998. Accuracy of replication in the polymerase chain reaction. Comparison between *Thermotoga maritima* DNA polymerase and *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 31(10), 1239-1242.
- Dieffenbach, C.W., Lowe, T.M., & Dveksler, G.S. 1993. General concepts for PCR primer design. *PCR Methods Appl.*, 3(3), S30-S37.
- Don, R.H., Cox, P.T., Wainwright, B.J., Baker, K., & Mattick, J.S. 1991. 'Touchdown'PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research*, 19(14), 4008.
- Dreier, J., Störmer, M., & Kleesiek, K. 2007. Real-time polymerase chain reaction in transfusion medicine: applications for detection of bacterial contamination in blood products. *Transfusion Medicine Reviews*, 21(3), 237-254.
- Elbeaino, T., Whitfield, A., Sharma, M., & Digiario, M. 2013. Emaravirus-specific degenerate PCR primers allowed the identification of partial RNA-dependent RNA polymerase sequences of Maize red stripe virus and Pigeonpea sterility mosaic virus. *Journal of Virological Methods*, 188(1-2), 37-40.

- Erlich, H.A., Gelfand, D., & Sninsky, J.J. 1991. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science*, 252(5013), 1643-1651.
- Gachon, C., Mingam, A., & Charrier, B. 2004. Real-time PCR: what relevance to plant studies? *Journal of Experimental Botany*, 55(402), 1445-1454.
- Hara, P.J., & Venezia, D. 1991. PRIMEGEN, a tool for designing primers from multiple alignments. *Bioinformatics*, 7(4), 533-534.
- Hayden, M.J., Nguyen, T.M., Waterman, A., & Chalmers, K.J. 2008. Multiplex-ready PCR: a new method for multiplexed SSR and SNP genotyping. *BMC Genomics*, 9(1), 1-12.
- He, Q., Marjamäki, M., Soini, H., Mertsola, J., & Viljanen, M.K. 1994. Primers are decisive for sensitivity of PCR. *Biotechniques*, 17(1), 82-84.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., & Griffith, R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*, 10(4), 413-417.
- Huang, X. Q., & Cloutier, S. 2007. Hemi-nested touchdown PCR combined with primer-template mismatch PCR for rapid isolation and sequencing of low molecular weight glutenin subunit gene family from a hexaploid wheat BAC library. *BMC Genetics*, 8(1), 1-9.
- Innis, M.A., Myambo, K.B., Gelfand, D.H., & Brow, M.A. 1988. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(24), 9436-9440.
- Isenbarger, T.A., Finney, M., Ríos-Velázquez, C., Handelsman, J., & Ruvkun, G. 2008. Miniprimer PCR, a new lens for viewing the microbial world. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(3), 840-849.
- Jabeen, U., Ali, A., Ullah, S., Mushtaque, R., Naqvi, S. W. H., Uddin, J., ... & Al-Harrasi, A. 2023. Screening of food allergens in cereals using real-time PCR. *Revue Française d'Allergologie*, 63(4), 103620.
- Jiang, Y., Ren, Y., Xu, X., Wang, H., & Wei, C. 2022. Application of allele specific PCR in identifying offspring genotypes of bi-allelic *sbeIIb* mutant lines in rice. *Plants*, 11(4), 524.
- Js, C. 1988. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Research*, 93, 265-269.
- Kaledin, A.S., Sliusarenko, A.G., & Gorodetskiĭ, S.I. 1980. Isolation and properties of DNA polymerase from extreme thermophilic bacteria *Thermus aquaticus* YT-1. *Biokhimiia* (Moscow, Russia), 45(4), 644-651.
- Kanoksilapatham, W., González, J.M., Maeder, D.L., DiRuggiero, J., & Robb, F.T. 2004. A proposal to rename the hyperthermophile *Pyrococcus woesei* as *Pyrococcus furiosus* subsp. *woesei*. *Archaea*, 1(4), 277-283.
- Kermekchiev, M.B., Kirilova, L.I., Vail, E.E., & Barnes, W.M. 2009. Mutants of Taq DNA polymerase resistant to PCR inhibitors allow DNA amplification from whole blood and crude soil samples. *Nucleic Acids Research*, 37(5), e40-e40.
- Khorana, H.G., Agarwal, K.L., Besmer, P., Büchi, H., Caruthers, M.H., Cashion, P.J., ... & Van de Sande, J.H. 1976. Total synthesis of the structural gene for the precursor of a tyrosine suppressor transfer RNA from *Escherichia coli*. 1. General introduction. *Journal of Biological Chemistry*, 251(3), 565-570.
- Kilger, C., Krings, M., Poinar, H., & Pääbo, S. 1997. "Colony sequencing": direct sequencing of plasmid DNA from bacterial colonies. *Biotechniques*, 22(3), 412-418.
- Kim, S. R., Jeon, J. S., & An, G. 2011. Development of an efficient inverse PCR method for isolating gene tags from T-DNA insertional mutants in rice. *Plant Reverse Genetics: Methods and Protocols*, 139-146.
- Kleppe, K., Ohtsuka, E., Kleppe, R., Molineux, I., & Khorana, H.G. 1971. Studies on polynucleotides: XCVI. Repair replication of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *Journal of Molecular Biology*, 56(2), 341-361.
- Kunkel, T.A., Roberts, J.D., & Zakour, R.A. 1987. [19] Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods in Enzymology*, 154, 367-382.
- Kwok, S., Kellogg, D.E., McKinney, N., Spasic, D., Goda, L., Levenson, C., & Sninsky, J.J. 1990. Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucleic Acids Research*, 18(4), 999-1005.

- Kwok, S., Mack, D.H., Mullis, K.B., Poiesz, B., Ehrlich, G., Blair, D., ... & Sninsky, J.J. 1987. Identification of human immunodeficiency virus sequences by using in vitro enzymatic amplification and oligomer cleavage detection. *Journal of Virology*, 61(5), 1690-1694.
- Lang, M., & Orgogozo, V. 2012. Identification of homologous gene sequences by PCR with degenerate primers. In *Molecular methods for evolutionary genetics* (pp. 245-256). Humana Press.
- Li, P., Kupfer, K.C., Davies, C.J., Burbee, D., Evans, G.A., & Garner, H.R. 1997. PRIMO: a primer design program that applies base quality statistics for automated large-scale DNA sequencing. *Genomics*, 40(3), 476-485.
- Ling, X. Y., Zhang, G., Pan, G., Long, H., Cheng, Y., Xiang, C., ... & Chen, Z. 2015. Preparing long probes by an asymmetric polymerase chain reaction-based approach for multiplex ligation-dependent probe amplification. *Analytical Biochemistry*, 487, 8-16.
- Linz, U., Delling, U., & Rübsamen-Waigmann, H. 1990. Systematic studies on parameters influencing the performance of the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry (Zeitschrift für Klinische Chemie und Klinische Biochemie)*, 28(1), 5-13.
- Liu, M.Q., Shen, X., Yin, W.L., & Lu, C.F. 2007. Changes of 5' Terminal Nucleotides of PCR Primers Causing Variable T-A Cloning Efficiency. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49(3), 382-385.
- Lowe, T., Sharefkin, J., Yang, S.Q., & Dieffenbach, C.W. 1990. A computer program for selection of oligonucleotide primers for polymerase chain reactions. *Nucleic Acids Research* 18(7): 1757-1761.
- Lucas, K., Busch, M., Mössinger, S., & Thompson, J.A. 1991. An improved microcomputer program for finding gene-or gene family-specific oligonucleotides suitable as primers for polymerase chain reactions or as probes. *Bioinformatics*, 7(4), 525-529.
- Mackay, I.M. 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*, 10(3), 190-212.
- Makarova, K.S., Mazin, A.V., Wolf, Y.I., & Soloviev, V.V. 1992. DIROM: an experimental design interactive system for directed mutagenesis and nucleic acids engineering. *Bioinformatics*, 8(5), 425-431.
- Mattila, P., Korpela, J., Tenkanen, T., & Pitkämä, K. 1991. Fidelity of DNA synthesis by the *Thermococcus litoralis* DNA polymerase—an extremely heat stable enzyme with proofreading activity. *Nucleic Acids Research*, 19(18), 4967-4973.
- Moon, J. C., Kim, J. H., & Jang, C. S. 2016. Development of multiplex PCR for species-specific identification of the Poaceae family based on chloroplast gene, *rpoC2*. *Applied Biological Chemistry*, 59, 201-207.
- Müller, C.R. 2001. Quality control in mutation analysis: The European molecular genetics quality network (EMQN). *European Journal of Pediatrics*, 160(8), 464-467.
- Mullis, K.B., & Faloona, F.A. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155, 335-350.
- Myers, T.W., & Gelfand, D.H. 1991. Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry*, 30(31), 7661-7666.
- Newton, C.R., Graham, A., Heptinstall, L.E., Powell, S.J., Summers, C., Kalsheker, N., ... & Markham, A.F. 1989. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Research*, 17(7), 2503-2516.
- Ochman, H., Gerber, A.S., & Hartl, D.L. 1988. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics*, 120(3), 621-623.
- Osborne, B.I. 1992. HyperPCR: A Macintosh HyperCard program for the determination of optimal PCR annealing temperature. *Computer Applications in the Biosciences*, 8(1), 83.
- Plourde-Owobi, L., Seguin, D., Baudin, M.A., Moste, C., & Rokbi, B. 2005. Molecular characterization of *Clostridium tetani* strains by pulsed-field gel electrophoresis and colony PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 5604-5606.
- Primer Design Tips & Tools, <http://www.lifetech-nologies.com/in/en/home/products-and-services/product-types/primers-oligos-nucleotides/invitrogen-custom-dna-oligos/primer-designtools.html>.
- Quill, E. 2008. Blood-matching goes genetic. *Science*, 319(5869), 1478-1479.

- Rothwell, P.J., & Waksman, G. 2005. Structure and mechanism of DNA polymerases. *Advances in Protein Chemistry*, 71, 401-440.
- Roux, K.H. 1995. Optimization and troubleshooting in PCR. *Genome Research*, 4(5), S185-S194.
- Rychlik, W., & Rhoads, R.E. 1989. A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and in vitro amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 17(21), 8543-8551.
- Rychlik, W., Spencer, W.J., & Rhoads, R.E. 1990. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Research*, 18(21), 6409-6412.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., & Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732), 1350-1354.
- Shampo, M.A., & Kyrle, R.A. 2002. Kary B. Mullis—Nobel Laureate for procedure to replicate DNA. In *Mayo Clinic Proceedings*, 77(7), 606.
- Sheffield, V.C., Cox, D.R., Lerman, L.S., & Myers, R.M. 1989. Attachment of a 40-base-pair G+ C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(1), 232-236.
- Singh, J., Birbian, N., Sinha, S., & Goswami, A. 2014. A critical review on PCR, its types and applications. *Int. J. Adv. Research in Biological Sciences*, 1(7), 65-80.
- Singh, V.K., & Kumar, A. 2001. PCR primer design. *Molecular Biology Today*, 2(2), 27-32.
- Tamura, T., Holbrook, S.R., & Kim, S.H. 1991. A Macintosh computer program for designing DNA sequences that code for specific peptides and proteins. *Biotechniques*, 10(6), 782-784.
- Taylor, S., Wakem, M., Dijkman, G., Alsarraj, M., & Nguyen, M. 2010. A practical approach to RT-qPCR—publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods*, 50(4), S1-S5.
- Temin, H. M., & Mizutani, S. 2010. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature*, 226 (5252): 1211-1213.
- Thornton, B., & Basu, C. 2011. Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 39(2), 145-154.
- Ugozzoli, L., & Wallace, R.B. 1991. Allele-specific polymerase chain reaction. *Methods*, 2(1), 42-48.
- Varkonyi-Gasic, E., & Hellens, R.P. 2010. qRT-PCR of small RNAs. In *Plant Epigenetics* (pp. 109-122). Humana Press.
- Wallace, R.B., Shaffer, J., Murphy, R.F., Bonner, J., Hirose, T., & Itakura, K. 1979. Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to Φ X 174 DNA: the effect of single base pair mismatch. *Nucleic Acids Research*, 6(11), 3543-3558.
- Wang, Y., Prosen, D.E., Mei, L., Sullivan, J.C., Finney, M., & Vander Horn, P.B. 2004. A novel strategy to engineer DNA polymerases for enhanced processivity and improved performance *in vitro*. *Nucleic Acids Research*, 32(3), 1197-1207.
- Watson, J.D., & Crick, F.H. 1953. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171(4356), 737-738.
- Wilks, A.F., Kurban, R.R., Hovens, C.M., & Ralph, S.J. 1989. The application of the polymerase chain reaction to cloning members of the protein tyrosine kinase family. *Gene*, 85(1): 67-74.
- Wong, M. L., & Medrano, J. F. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39(1), 75-85.
- Wood, K.A., Dipasquale, B., & Youle, R.J. 1993. In situ labeling of granule cells for apoptosis-associated DNA fragmentation reveals different mechanisms of cell loss in developing cerebellum. *Neuron*, 11(4), 621-632.
- Wu, D.Y., Ugozzoli, L., Pal, B.K., Qian, J., & Wallace, R.B. 1991. The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. *DNA and Cell Biology*, 10(3), 233-238.

- Xu, R., Chen, Q., Robleh Djama, Z., & Tambong, J. T. 2010. Miniprimer PCR assay targeting multiple genes: a new rapid and reliable tool for genotyping *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. *Letters in Applied Microbiology*, 50(2), 216-222.
- Yesheng, T., Ying, L., Jingjie, Z., Xin, H., Zhixin, L., Bin, H., & Guofan, H. 2002. Colony PCR apply to the rice genome sequencing. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 29(2), 316-318.
- You, F.M., Huo, N., Gu, Y.Q., Luo, M.C., Ma, Y., Hane, D., ... & Anderson, O.D. 2008. BatchPrimer3: a high throughput web application for PCR and sequencing primer design. *BMC Bioinformatics*, 9(1), 1-13.