مجله ایمنی زیستی
دوره ۸، شماره ۱، بهار ۱۳۹۴

اصول و نکات طراحی آغازگر جهت واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

سید محمد غیبی حیات[۱*]، کاظم عباس زاده گودرزی[۲]، حکمت الله مرادی موگرمون[۳]
[۱] کارشناسی ارشد باشگاه پژوهشگران و نخبگان جوان دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اندیمشک، اندیمشک، ایران
[۲] دکتری بیوتکنولوژی، دانشکده فناوری های پیشرفته پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
[۳]کارشناسی ارشد دانشگاه علوم پزشکی شیراز، مرکز تحقیقات ارتقاء کیفیت آموزش بالینی، دانشکده پزشکی، شیراز، ایران

gheibi65@yahoo.com

چکیده

در مهندسی ژنتیک، آغازگر به یک قطعه‌ی الیگونوکلئوتیدی (۲۶-۱۸ جفت باز) اطلاق می‌شود که توانایی اتصال به دی.ان.ا هدف را داشته و نقشی حیاتی در اختصاصیت واکنش PCR ایفا می‌کند. یکی از مهمترین معیارهایی که بر موفقیت فرآیند PCR تاثیرگذار است، طراحی یک آغازگر مناسب است. اگر تمامی شرایط برای یک PCR خوب فراهم باشد، ولی فقط از یک آغازگر نامناسب استفاده شود، در انتهای کار، محصول بسیار اندک با ناخالصی‌های فراوان تولید می‌شود، یا ممکن است هیچ محصولی تولید نشود. این پدیده می‌تواند به علت اتصالات غیر اختصاصی آغازگر به الگو و یا تشکیل دایمر آغازگر اتفاق بیفتد. برای طراحی یک آغازگر کارا برای فرآیند PCR، باید پارامترهای متنوعی را همچون طول آغازگر، دمای ذوب (Thermal Melting)، میزان GC، انتهای ´۳ آغازگر، انتهای ´۵ آغازگر، تشکیل آغازگردایمر، تشکیل حلقه و ساختارهای سنجاق‌سری را مورد توجه و بررسی قرار داد. در این مقاله سعی شده اصول و نکات طراحی یک آغازگر مناسب شرح داده شود و تمامی پارامترها مورد بحث قرار گیرد.

کلمات کلیدی: طراحی آغازگر، PCR، دایمرآغازگر، ساختار سنجاق‌سری

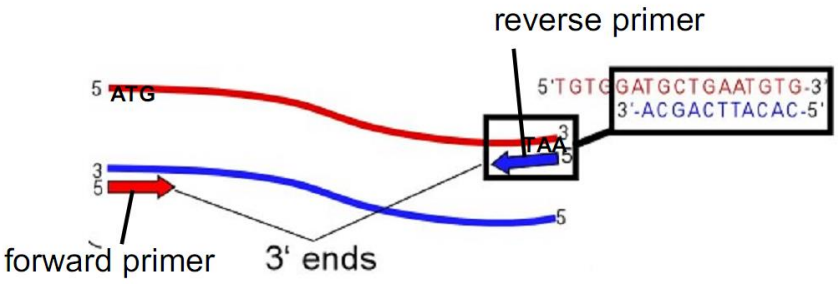
مقدمه

آغازگر (Primer) در مهندسی ژنتیک به قطعه ای از دی.ان.ا تک رشته‌ای اطلاق می‌شود که به‌صورت سنتتیک توسط دستگاه سنتز دی.ان.ا، بر اساس ترادف داده شده، تولید شده و دارای طولی حدود ۲۶-۱۸ نوکلئوتید است. از آغازگر، جهت اهداف گوناگونی مانند سنتز بخشی از دی.ان.ا، همسانه‌سازی ژن، تعیین جهش‌ها، تشخیص عوامل عفونی، تشخیص هویت و موارد جنایی و یا حتی در درمان بصورت آنتی‌سنس استفاده می‌شود. در این مقاله سعی شده تا تمامی موارد و نکات لازم جهت طراحی یک آغازگر مناسب جهت واکنش PCR شرح داده شود.

توالی آغازگر

توالی آغازگر رفت (Forward Primer) باید شبیه به ´۵ ژن مورد نظر و توالی آغازگر برگشت (Reverse Primer) مکمل معکوس انتهای ´۳ ژن باشد (شکل ۱).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-23]
[DOR: 20.1001.1.27170632.1394.8.1.9.4]



شکل۱- توالی آغازگر برگشت، مکمل معکوس انتهای ´۳ توالی مورد نظر برای PCR است

طول آغازگر

تعیین طول آغازگر، یک فاکتور بسیار موثر در واکنش PCR محسوب می‌شود (۱). طول مناسب آغازگر باید بین ۱۸ تا ۲۶ نوکلئوتید باشد (۲). هر چند گاهی به علت متفاوت بودن درصد GC (GC Content) در دو طرف ژن، طول آغازگرها را حتی تا ۵۰ نوکلئوتید افزایش می‌دهند و یا خیلی کوتاه می‌کنند.

در تعیین طول آغازگر باید به دو نکته زیر توجه داشت:

- بالا بودن طول آغازگر، باعث بالا رفتن زمان اتصال (Annealing) می‌شود و زمان مورد نیاز برای PCR افزایش می‌یابد. در این حالت ممکن است آنزیم پلی‌مراز در انتهای PCR به خوبی فعالیت نکند.

- کوتاه بودن طول آغازگر، احتمال اتصال غیر اختصاصی آغازگر به نقاطی غیر از ژن هدف را افزایش می‌دهد.

همچنین در هنگام طراحی آغازگر، باید به این نکته توجه نمود که تفاوت طول آغازگر رفت و برگشت نباید بیش از سه نوکلئوتید در نظر گرفته شود.

دمای ذوب (Tm)

دمای ذوب دمایی است که در آن نیمی از آغازگرها به منطقه هدف می‌چسبند و این دما می‌تواند به‌عنوان شاخصی از دمای مرحله اتصال (Annealing Step) در PCR در نظر گرفته شود. دمای اتصال برای یک جفت آغازگر در یک واکنش PCR، به طور معمول ۵۰ تا ٦٢ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته می‌شود. ذکر این نکته ضروری است که تفاوت دمای اتصال بین یک جفت آغازگر، نباید از ۵ درجه سانتی‌گراد تجاوز کند. البته در حالت ایده‌آل، این تفاوت دمایی به صفر میل می‌کند. دمای اتصال باید به‌میزان کافی پایین باشد تا پرایمر و دی.ان.ا الگو قادر به اتصال به یکدیگر باشند و از سوی دیگر باید به‌میزان مناسب بالا باشد تا از تشکیل اتصالات غیراختصاصی جلوگیری کند. یکی از مهمترین مشخصات Tm، وابستگی آن به ترکیب بازی دی.ان.ا است. گوانین و سیتوزین سه پیوند هیدروژنی، ولی آدنین و تیمین دو پیوند هیدروژنی دارند. بنابراین هر چقدر مقدار گوانین و سیتوزین در دی.ان.ا بیشتر باشد، Tm بیشتر است. دمای ۳-٤ درجه سانتی‌گراد کمتر از Tm، برای دمای اتصال مناسب است. زیرا در این دما هیبریداسیون بین پرایمر و دی.ان.ای الگو صورت گیرد. برای محاسبه دمای ذوب آغازگرهایی که حدود ۲۰ نوکلئوتید طول دارند، می‌توان از معادله والاس (معادله۱) استفاده نمود (۳). البته برای الیگونوکلئوتیدهایی با طول ۱۵ تا ۷۰

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-23]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1394.8.1.9.4]

نوکلئوتید، معادله بولتون و مک‌کارتی (معادله۲) مناسب‌تر است (٤). برای محاسبه Tm، روش‌های جدیدی مانند تئوری ترمودینامیک (۵) و یا فرمول‌های مختلف دیگر (٦) نیز وجود دارد.

معادله ۱- معادله والاس جهت تعیین Tm آغازگرهای با طول حدود ۲۰ نوکلئوتید

$$Tm = ((\text{Number of } G + C) \times 4^0C \times (\text{Numner of } A + T) \times 2^0c)$$

معادله ۲- معادله بولتون و مک‌کارتی جهت تعیین Tm آغازگرهای با طول ۱۵ تا ۷۰ نوکلئوتید (I: غلظت کاتیون‌های تک ظرفیتی، N: طول الیگونوکلئوتید)

$$Tm = 81.5 + 16.6\,(\log_{10}(I)) + 0.41\,(\%G+C) - (600/N)$$

ΔG اتصال آغازگر به توالی هدف

تغییرات انرژی آزاد اتصال آغازگر با رشته‌ی دی.ان.ا هدف را با ΔG نشان می‌دهند. به‌طورکلی هر چه ΔG منفی‌تر باشد، واکنش انجام‌پذیرتر است و آغازگر طراحی شده، بهتر است.

انتهای ´۵ آغازگر

انتهای ´۵ آغازگر در تعیین جفت شدن اختصاصی با توالی مورد نظر، از اهمیت کمتری برخوردار است و می‌توان توالی آن را به دلخواه برای هدف‌هایی همچون دستکاری ژنتیکی، همسانه‌سازی بعدی محصول، نوترکیبی، جهش‌زایی و یا بیان محصول PCR تغییر داد (شکل ۲). یکی از تغییرات متداول، ایجاد یک محل برش برای آنزیم محدود کننده است، تا بتوان به سادگی محصول تکثیر یافته را در یک حامل پلاسمیدی همسانه‌سازی نمود. محل برش آنزیم محدود کننده را در انتهای ´۵ آغازگر در نظر می‌گیرند. در هنگام انتخاب جایگاه‌های برشی، باید به نکات زیر توجه داشت:

- دو آنزیمی که این جایگاه‌ها را مورد شناسایی قرار می‌دهند، باید در یک شرایط بافری یکسان فعالیت بهینه داشته باشند. نه این‌که یک آنزیم در یک PH و آنزیم دیگر در PH دیگر فعالیت بهینه داشته باشد.

- این دو آنزیم باید در یک دمای یکسان فعالیت بهینه داشته باشند.

- دو آنزیم با توجه به Multiple cloning (MCS) sequence وکتور مورد استفاده طوری انتخاب شوند که ژن مورد نظر سرو ته کلون نشود.

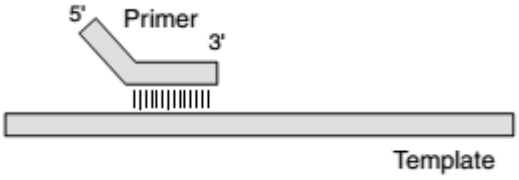
- دو آنزیم طوری انتخاب شوند که در محل MCS وکتور مورد استفاده، پشت سر هم قرار نگیرند و کمی با هم فاصله داشته باشند.

- دو آنزیمی که انتخاب می‌شوند با چند وکتور دیگر نیز همخوانی داشته باشند تا اگر احیانا ژن مورد نظر همسانه‌سازی نشد و بعدا نیاز به زیرهمسانه‌سازی (Sub-cloning) و انتقال ژن به وکتور دیگر باشد، نیازی به طراحی دوباره آغازگر نباشد.

- باید توجه شود که برخی از آنزیم‌ها Rare cuter هستند و به زمان بالایی برای برش نیاز دارند، مانند Xho1 (حداقل زمان برش ٦ تا ۸ ساعت است).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-23]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1394.8.1.9.4]



شکل ۲- عدم اهمیت اتصال انتهای بخش ´۵ آغازگر به توالی الگو

انتهای ´۳ آغازگر

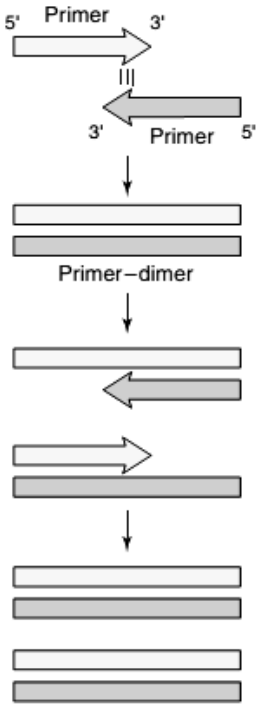
منطقه ای از آغازگر که باید کاملا با الگو منطبق باشد، انتهای ´۳ است، زیرا این قسمت انتهای آغازگر است که بوسیله دی.ان.ا پلی‌مراز طویل می‌شود و بنابراین برای اطمینان از جفت شدن اختصاصی با توالی هدف صحیح، بسیار اهمیت دارد. حداقل باید ۳ نوکلئوتید اول در انتهای ´۳ آغازگری با طول ۲۰ نوکلئوتید طول، کاملا با الگو منطبق باشد. بنابراین تعیین دقیق ترادف‌های ´۳ آغازگر نقش بسزایی در یک واکنش PCR دارد (۷). بکارگیری یک نوکلئوتید G و یا C در انتهای´۳ آغازگر، می‌تواند تاثیر بسیار خوبی در موفقیت فرآیند PCR داشته باشد. البته در توالی‌هایی که آغازگرهای آن‌ها دارای انتهای ´۳ غنی از G یا C است، احتمال اتصال اشتباهی افزایش می‌یابد. بنابراین باید از قرارگیری بیش از سه C یا G در انتهای ´۳ جلوگیری شود (۸). به‌طورکلی استفاده از توالی‌های تکراری، یا مناطق حاوی نوکلئوتیدهای تکراری، می‌تواند منجر به تشکیل آغازگردایمر (Dimer Primer) و یا ساختارهای سنجاق‌سری (Hairpin) و حتی اتصال آغازگر به مناطق غیر اختصاصی از الگو شود.

تشکیل آغازگردایمر

تشکیل آغازگر دایمر به علت اتصال آغازگر با خودش و یا آغازگر دیگر است که البته با طراحی دقیق آغازگرها و اطمینان از این‌که انتهاهای´۳ آن‌ها مکمل یکدیگر نیستند، می‌توان از تشکیل دایمرآغازگر پیشگیری نمود. اگر به هر علتی برخی از ترادف‌های موجود در انتهاهای ´۳ یک یا هر دو آغازگر با یکدیگر جفت شوند، در طول PCR، آغازگرها با هم متصل می‌شوند که این امر منجر به تشکیل آغازگر دایمر می‌شود. همچنین در چرخه بعدی PCR، رشته‌های آغازگر دایمر می‌تواند به عنوان یک الگوی جدید عمل نموده و باعث تشکیل بیشتر این محصول ناخواسته‌ی کوچک شوند (شکل ۳). بدتر از همه این‌که محصولات کوچکتر، با کارآیی بیشتری کپی برداری می شوند (یک دایمر آغازگر، کوچکترین اندازه قابل‌دستیابی در PCR است). دایمر آغازگرها می‌توانند اثرات زیادی روی PCR داشته باشند و آغازگر را از هدف واقعی خود روی دی.ان.ا الگو دور کند (۹).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-23]

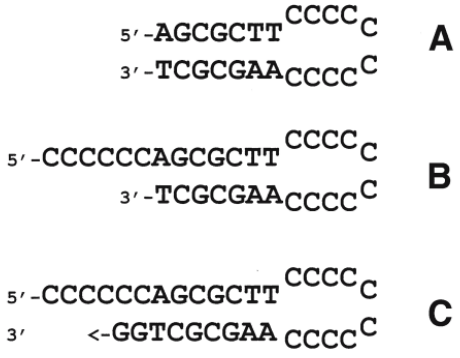
[DOR: 20.1001.1.27170632.1394.8.1.9.4]



شکل ۳- تشکیل آغازگردایمر ناشی از اتصال بخش‌های ´۳ آغازگر با یکدیگر

تشکیل حلقه و ساختارهای سنجاق‌سر در آغازگر

توالی آغازگر نباید دارای نواحی مکمل داخلی باشد، زیرا این نواحی باعث می‌شود که آغازگر در داخل خود ساختارهای ثانویه‌ای چون حلقه (Loop) تشکیل دهد (شکل ٤). در صورت مشاهده حلقه، کنترل ΔG و نیز دمای تشکیل آن الزامی است. ΔG تشکیل حلقه، بهتر است مثبت یا حداقل نزدیک صفر باشد. در این حالت تشکیل حلقه در طول PCR عملا غیرممکن می‌شود. همچنین تشکیل ساختارهای سنجاق‌سری در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد مشکلی ایجاد نمی‌کند (۱۰).



شکل۴- تشکیل ساختارهای سنجاق‌سری به علت ترادف‌های نامناسب در آغازگر

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-23]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1394.8.1.9.4]

نتیجه‌گیری

کلید موفقیت در فرآیند PCR، طراحی و ساخت یک آغازگر مناسب است. دانستن نکات لازم در رابطه با ساخت آغازگر، امری مهم تلقی می‌شود. پارامترهای گوناگونی بر روی کیفیت آغازگر تاثیر گذارند که از مهمترین این موارد می‌توان به طول آغازگر، دمای ذوب، میزان GC، انتهای ´۳ آغازگر، انتهای ´۵ آغازگر، تشکیل آغازگردایمر، تشکیل حلقه و ساختارهای سنجاق‌سری اشاره نمود. پس از طراحی توالی آغازگر، با نرم‌افزارهای مختلف، می‌توان بصورت دستی این موارد را در حالت بهینه تنظیم کرد.

فهرست منابع

References

1. **Wu, D.Y., UGOZZOLI, L., PAL, B.K., QIAN, J. and 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), pp.233-238.
2. **Wu, J.S., Lee, C., Wu, C.C. and Shiue, Y.L., 2004.** Primer design using genetic algorithm. *Bioinformatics*, *20*(11), pp.1710-1717.
3. **Wallace, R.B., Shaffer, J., Murphy, R.F., Bonner, J., Hirose, T. and Itakura, K., 1979.** Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to Φ X 174 DNA: the effect of single base pair mismatch. *Nucleic acids research*, *6*(11), pp.3543-3558.
4. **Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989.** *Molecular cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.
5. **You, F.M., Huo, N., Gu, Y.Q., Luo, M.C., Ma, Y., Hane, D., Lazo, G.R., Dvorak, J. and Anderson, O.D., 2008.** BatchPrimer3: a high throughput web application for PCR and sequencing primer design. *BMC bioinformatics*, *9*(1), p.253.
6. **Untergasser, A., Nijveen, H., Rao,** X., Bisseling, T., Geurts, R. and Leunissen, J.A., 2007. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic acids research*, *35*(suppl_2), pp. W71-W74.
7. **Kwok, S., Kellogg, D.E., McKinney, N., Spasic, D., Goda, L., Levenson, C. and 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), pp.999-1005.
8. **Sheffield, V.C., Cox, D.R., Lerman, L.S. and 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), pp.232-236.
9. **Vallone, P.M. and Butler, J.M., 2004.** AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. *Biotechniques*, *37*(2), pp.226-231.
10. **Breslauer, K.J., Frank, R., Blöcker, H. and Marky, L.A., 1986.** Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *83*(11), pp.3746-3750.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-23]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1394.8.1.9.4]

Primer design instruction for polymerase chain reaction

Seyed Mohammad Gheibi Hayat[1*], Kazem Abbaszadeh-Goudarzi[2], Hekmat allah Moradi Mogarmon[3]

[1] MS.c of the Young Researchers and Elite Club of Islamic Azad University, Andimeshk Branch, Andimeshk, Iran
[2] Ph.D. of Biotechnology, Faculty of Advanced Medical Technology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3] MSc of Shiraz University of Medical Sciences, Research Center for Clinical Education Quality Improvement, School of Medicine, Shiraz, Iran

gheibi65@yahoo.com

Abstract

In genetic engineering, Primer is an oligonucleotide with 18-26 base pair (bp) that attached to target DNA and have a critical role in the specificity of the PCR reaction. An appropriate primer design is one of the most important factor for good PCR. A poorly designed primer can result in little or no target product, due to non-specific amplification or primer dimer formation leading to reaction failure, even when all the other parameters are properly optimized. There are number of criteria such as primer length, Tm, GC contents, 3'-end sequence, 5'-end sequence, primer-dimer formation, hairpin-loop structure formation that need to be established in the design of primers to have efficient primers for PCR reaction. This article provides general guidelines for PCR primer design**.**

Keywords: Primer design, PCR, Primer dimer, Hairpin

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-23]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1394.8.1.9.4]