دانشگاه اصفهان

دانشکده مهندسی کامپیوتر

گزارش تمرین سوم

دنباله‌ی آلوده

پدیدآورنده:

محمد امین کیانی

4003613052

دانشجوی کارشناسی، دانشکده‌ی کامپیوتر، دانشگاه اصفهان، اصفهان،
Aminkianiworkeng@gmail.com

استاد: جناب اقای دکتر نقش‌نیلچی

نیمسال اول تحصیلی 04-1403

فهرست مطالب

مستندات 3
1-مسئله و تحلیل کلی آن: 3
2-تمرین اول و دوم: 4
3- تمرین سوم: 9
7- مراجع 13

مستندات

1-مسئله و تحلیل کلی آن:

ژن GAPDH (گلیسرآلدئید-۳-فسفات دهیدروژناز) یک آنزیم کلیدی در مسیر گلیکولیز است که نقش اساسی در متابولیسم انرژی سلولی دارد. این ژن به عنوان یک ژن خانه‌دار شناخته می‌شود زیرا در بسیاری از بافت‌ها به طور پایدار و بدون تغییر بیان می‌شود و به عنوان کنترل داخلی در مطالعات بیولوژیکی به کار می‌رود.

توالی دقیق ژن GAPDH انسان معمولاً شامل حدود ۱۰۰۰ جفت باز است و اطلاعات کامل آن در پایگاه‌های داده ژنوم موجود است. ساختار این ژن به طور عمده شامل نواحی کد کننده و غیرکد کننده (اینترون‌ها و اگزون‌ها) می‌باشد.

GAPDH به طور عمده مسئول تبدیل گلیسرآلدئید-۳-فسفات به ۱،۳-بیس فسفولوئی‌گسرات در گلیکولیز است. این فرایند انرژی (ATPs) را برای سلول‌ها تأمین می‌کند و همچنین در مسیرهای بیوشیمیایی دیگر مانند تنفس سلولی و سنتز لیپیدها نقش دارد.

نکات ژن GAPDH:

1. ترجمه و بیان: ژن GAPDH به دلیل بیان پایدار، معمولاً در شرایط مختلف، نقش مهمی در مقایسه با سایر ژن‌ها دارد. به همین علت به عنوان پیام کنترل داخلی در مطالعات RT-PCR و سایر آزمایش‌ها استفاده می‌شود.

2. الودگی در نمونه‌برداری: در هنگام نمونه‌برداری، آلوده‌کردن ژن GAPDH با RNA یا DNA سایر میکروارگانیسم‌ها می‌تواند نتیجه‌گیری نادرستی را در تحلیل‌ها به همراه داشته باشد. بنابراین، رعایت شرایط بهداشتی و استفاده از تجهیزات استریل الزامی است.

3. تغییرات در بیان: تحت تأثیر شرایط مختلف از جمله استرس‌های محیطی، سموم یا بیماری‌های خاص، سطح بیان GAPDH ممکن است تغییر کند. این تغییر می‌تواند منجر به اشتباه در تفسیر نتایج تجربی شود.

4. اهمیت در مطالعات بالینی: در مطالعات بالینی و زیست‌پزشکی، وجود آلودگی یا نوسانات در بیان GAPDH می‌تواند به اشتباه در نتایج آزمایش‌ها منجر شود، پس باید دقت زیادی برای تضمین اعتبار نتایج معطوف شود.

پس GAPDH یکی از حیاتی‌ترین آنزیم‌ها و ژن‌ها در زیست‌شناسی مولکولی است و استفاده درست از آن می‌تواند به فهم بهتری از فرآیندهای بیولوژیکی کمک کند.

مراحل آلوده کردن:

1. انتخاب دنباله DNA:

- از پایگاه داده GenBank استفاده کرده و به وب‌سایت NCBI می‌رویم و دنباله‌ی سالم GAPDH را انتخاب می‌کنیم.

- دنباله را به صورت دستی با وارد کردن یک یا چند نوکلئوتید غیرمعمول آلوده می‌کنیم.

2. استفاده از VecScreen:

- به بخش VecScreen رفته و دنباله آلوده خود را برای تجزیه و تحلیل وارد می‌کنیم.

- پس از بررسی، نتایج گرافیکی و alignment را مشاهده می‌کنیم که نتایج شامل نمودارهایی از درصد تطابق و توزیع نواحی آلوده می‌باشد.

3. طراحی PCR:

- از ابزار Primer-BLAST در NCBI استفاده می‌کنیم.

- دنباله سالم را وارد و شرایط PCR مورد نظر (مانند دمای ذوب و اندازه محصول) را تعیین می‌کنیم.

- بهترین پرایمرها را مشاهده و همچنین چهار نقشه جانشین آنها را بررسی می‌کنیم.

2-تمرین اول و دوم:

توالی ژن GAPDH انسان :

- عنوان:

Homo sapiens glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), mRNA

- شناسه GenBank : NM_002046.7

1- سالم :

>NM_002046.7 Homo sapiens glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), transcript variant 1, mRNA

GCTCTCTGCTCCTCCTGTTCGACAGTCAGCCGCATCTTCTTTTGCGTCGCCAGCCGAGCCA
CATCGCTCAGACACCATGGGGAAGGTGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGTCGTATTGGG
CGCCTGGTCACCAGGGCTGCTTTTAACTCTGGTAAAGTGGATATTGTTGCCATCAATGACCC
CTTCATTGACCTCAACTACATGGTTTACATGTTCCAATATGATTCCACCCATGGCAAATTCCAT
GGCACCGTCAAGGCTGAGAACGGGAAGCTTGTCATCAATGGAAATCCCATCACCATCTTCC
AGGAGCGAGATCCCTCCAAAATCAAGTGGGGCGATGCTGGCGCTGAGTACGTCGTGGAGT
CCACTGGCGTCTTCACCACCATGGAGAAGGCTGGGGCTCATTTGCAGGGGGGAGCCAAAA
GGGTCATCATCTCTGCCCCCTCTGCTGATGCCCCCATGTTCGTCATGGGTGTGAACCATGG
AAGTATGACAACAGCCTCAAGATCATCAGCAATGCCTCCTGCACCACCAACTGCTTAGCACC
CCTGGCCAAGGTCATCCATGACAACTTTGGTATCGTGGAAGGACTCATGACCACAGTCCAT
GCCATCACTGCCACCCAGAAGACTGTGGATGGCCCCTCCGGGAAACTGTGGCGTGATGGC
CGCGGGGCTCTCCAGAACATCATCCCTGCCTCTACTGGCGCTGCCAAGGCTGTGGGCAAG
GTCATCCCTGAGCTGAACGGGAAGCTCACTGGCATGGCCTTCCGTGTCCCCACTGCCAAC
GTGTCAGTGGTGGACCTGACCTGCCGTCTAGAAAAACCTGCCAAATATGATGACATCAAGA
AGGTGGTGAAGCAGGCGTCGGAGGGCCCCCTCAAGGGCATCCTGGGCTACACTGAGCAC
CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAACAGCGACACCCACTCCTCCACCTTTGACGCTGGGGCT
GGCATTGCCCTCAACGACCACTTTGTCAAGCTCATTTCCTGGTATGACAACGAATTTGGCTA
CAGCAACAGGGTGGTGGACCTCATGGCCCACATGGCCTCCAAGGAGTAAGACCCCTGGAC
CACCAGCCCCAGCAAGAGCACAAGAGGAAGAGAGAGACCCTCACTGCTGGGGAGTCCCT
GCCACACTCAGTCCCCCACCACACTGAATCTCCCCTCCTCACAGTTGCCATGTAGACCCCT
TGAAGAGGGGAGGGGCCTAGGGAGCCGCACCTTGTCATGTACCATCAATAAAGTACCCTGT
GCTCAACCA

حال به دنباله ی سالم بالا دنباله‌های مخرب مثل >gnl|uv|J02400.1:1-5243-49 Simian virus 40 را اضافه کردیم:

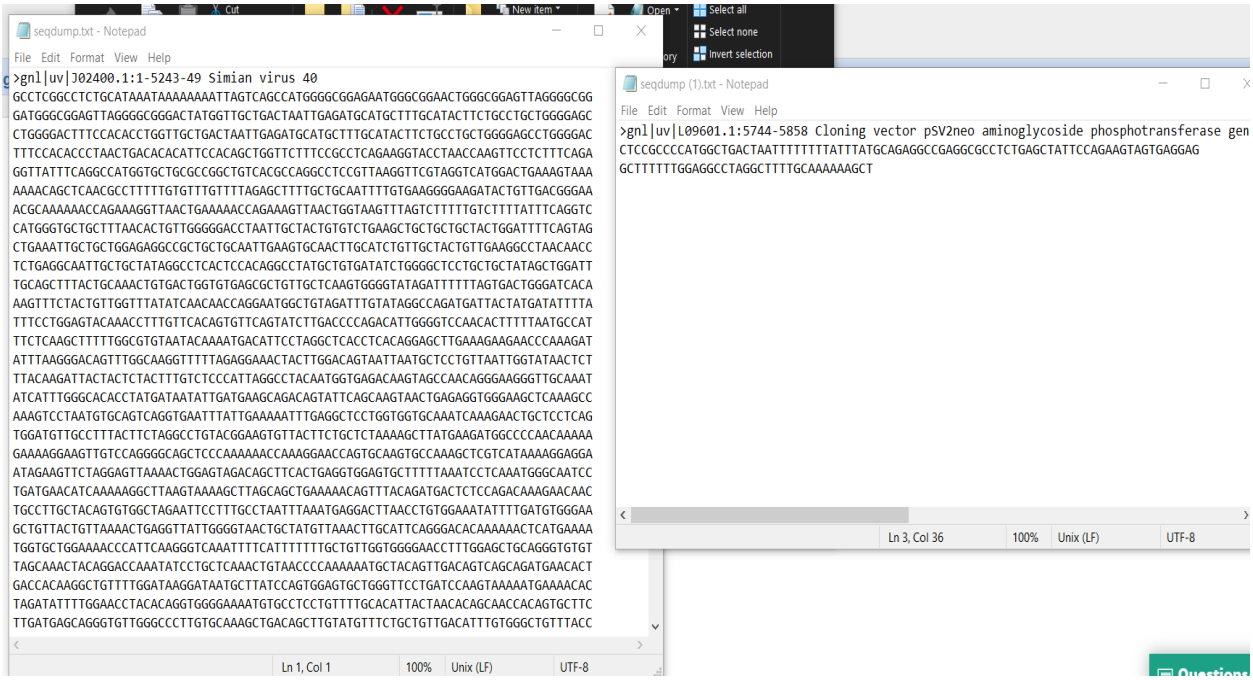
GCCTCGGCCTCTGCATAAATAAAAAAAA

+

AGGTTACAGAATATTTTTCCATAATTTTCTTGTATAGCAGTGCAGCTTTTTCCTTTGTGGTGTA
AATAGCAAAGCAAGCAAGAGTTCTATTACTAAACACAGCATGACTCAAAAAACTTAGCAA

2- آلوده :

GCTCTCTGCTCCTCCTGTTCGACAGTCAGCCGCATCTTCTTTTGCGTCGCCAGCCGAGCCA
CATCGCTCAGACACCATGGGGAAGGTGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGTCGTATTGGG
CGCCTGGTCACCAGGGCTGCTTTTAACTCTGGTAAAGTGGATATTGTTGCCATCAATGACCC
CTTCATTGACCTCAACTACATGGTTTACATGTTCCAATATGATTCCACCCATGGCAAATTCCAT
GGCACCGTCAAGGCTGAGAACGGGAAGCTTGTCATCAATGGAAATCCCATCACCATCTTCC
AGGAGCGAGATCCCTCCAAAATCAAGTGGGGCGATGCTGGCGCTGAGTACGTCGTGGAGT
CCACTGGCGTCTTCACCACCATGGAGAAGGCTGGGGCTCATTTGCAGGGGGGAGCCAAAA
GGGTCATCATCTCTGCCCCCTCTGCTGATGCCCCCATGTTCGTCATGGGTGTGAACCATGA
GAAGTATGACAACAGCCTCAAGATCATCAGCAATGCCTCCTGCACCACCAACTGCTTAGCA
CCCCTGGCCAAGGTCATCCATGACAACGCCTCGGCCTCTGCATAAATAAAAAAAATTTGGTA
TCGTGGAAGGACTCATGACCACAGTCCATGCCATCACTGCCACCCAGAAGACTGTGGATGG
CCCCTCCGGGAAACTGTGGCGTGATGGCCGCGGGGCTCTCCAGAACATCATCCCTGCCTC
TACTGGCGCTGCCAAGGCTGTGGGCAAGGTCATCCCTGAGCTGAACGGGAAGCTCACTGG
CATGGCCTTCCGTGTCCCCACTGCCAACGTGTCAGTGGTGGACCTGACCTGCCGTCTAGA
AAAACCTGCCAAATATGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGGCGTCGGAGGGCCCCCT
CAAGGGCATCCTGGGCTACACTGAGCACCAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAACAGCGACAC
CCACTCCTCCACCTTTGACGCTGGGGCTGGCATTGCCCTCAACGACCACTTTAGGTTACAG
AATATTTTTCCATAATTTTCTTGTATAGCAGTGCAGCTTTTTCCTTTGTGGTGTAAATAGCAAA
GCAAGCAAGAGTTCTATTACTAAACACAGCATGACTCAAAAAACTTAGCAAGTCAAGCTCATT
TCCTGGTATGACAACGAATTTGGCTACAGCAACAGGGTGGTGGACCTCATGGCCCACATGG
CCTCCAAGGAGTAAGACCCCTGGACCACCAGCCCCAGCAAGAGCACAAGAGGAAGAGAG
AGACCCTCACTGCTGGGGAGTCCCTGCCACACTCAGTCCCCCACCACACTGAATCTCCCC
TCCTCACAGTTGCCATGTAGACCCCTTGAAGAGGGGAGGGGCCTAGGGAGCCGCACCTTG
TCATGTACCATCAATAAAGTACCCTGTGCTCAACCA



NIH U.S. National Library of Medicine | NCBI National Center for Biotechnology Information | Sign in to NCBI

BLAST » vector contamination » RID-RN03CVM6013

Home | Recent Results | Saved Strategies | Help

BLAST Results

Formatting options | Download | How to read this page | Blast report description

Vecscreen

Job title: Nucleotide Sequence

Interpretation of VecScreen Results

RID RN03CVM6013 (Expires on 01-06 19:51 pm)

Query ID lcl|Query_6345647
Description None
Molecule type dna
Query Length 1437

Database Name screen/UniVec
Description UniVec (build 10.2)
Program BLASTN 2.16.1+ Citation

Other reports: Search Summary [Taxonomy reports] [Distance tree of results] [MSA viewer]

Graphic Summary

Distribution of Vector Matches on the Query Sequence

1 | 359 | 718 | 1077 | 1437

Match to Vector: Strong Moderate Weak
Segment of suspect origin:

Segments matching vector:
Strong match: 577-607, 1026-1149

Alignments

Questions/comments

Alignments

Download Graphics ▼ Next ▲ Previous

gnl|uv|J02400.1:1-5243-49 Simian virus 40
Sequence ID: Length: 5292 Number of Matches: 1

Range 1: 4271 to 4394 Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
249 bits(124)	2e-63	124/124(100%)	0/124(0%)	Plus/Plus

```
Query  1026  AGGTTACAGAATATTTTTCCATAATTTTCTTGTATAGCAGTGCAGCTTTTTCCTTTGTGG  1085
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4271  AGGTTACAGAATATTTTTCCATAATTTTCTTGTATAGCAGTGCAGCTTTTTCCTTTGTGG  4330

Query  1086  TGTAAATAGCAAAGCAAGCAAGAGTTCTATTACTAAACACAGCATGACTCAAAAAACTTA  1145
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4331  TGTAAATAGCAAAGCAAGCAAGAGTTCTATTACTAAACACAGCATGACTCAAAAAACTTA  4390

Query  1146  GCAA  1149
             ||||
Sbjct  4391  GCAA  4394
```

Download Graphics ▼ Next ▲ Previous

gnl|uv|L09601.1:5744-5858 Cloning vector pSV2neo aminoglycoside phosphotransferase gene region with intron and partial exons from Mesocrecitus auratus mu class glutathione s-transferase gene
Sequence ID: Length: 115 Number of Matches: 1

Range 1: 20 to 50 Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
62.6 bits(31)	3e-07	31/31(100%)	0/31(0%)	Plus/Minus

```
Query  577  CGCCTCGGCCTCTGCATAAATaaaaaaaaTT  607
            |||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  50   CGCCTCGGCCTCTGCATAAATAAAAAAAATT  20
```

RN03CVM6013-Alignment.txt - Notepad

File Edit Format View Help

```
BLASTN 2.16.1+
Reference: Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro
A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and
David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new
generation of protein database search programs", Nucleic
Acids Res. 25:3389-3402.


RID: RN03CVM6013


Database: UniVec (build 10.2)
           6,111 sequences; 1,270,404 total letters
Query=
Length=1437


                                                                  Score     E     Max
Sequences producing significant alignments:                      (Bits)  Value  Ident

gnl|uv|J02400.1:1-5243-49 Simian virus 40                         249     2e-63  100%
gnl|uv|AF058756.1:4795-5000 Cloning vector pFR-Luc                212     1e-52  99%
gnl|uv|NG000029.1:2930-3028 Invitrogen cloning vector pCDM8       98.7    3e-18  100%
gnl|uv|NG000030.1:2716-2807 Invitrogen cloning vector pcDNAI      98.7    3e-18  100%
gnl|uv|L09601.1:5744-5858 Cloning vector pSV2neo aminoglycosid...  62.6    3e-07  100%
gnl|uv|AH003157.2:2847-2944 Unidentified cloning vector galK a...  60.6    1e-06  100%
gnl|uv|AH003157.2:225-322 Unidentified cloning vector galK and...  60.6    1e-06  100%
gnl|uv|U14626.1:189-288 Cloning vector pSVSport1 beta-lactamas...  60.6    1e-06  100%
gnl|uv|DQ188846.1:1639-2515 Synthetic Renilla luciferase repor...  60.6    1e-06  100%
gnl|uv|U57027.2:1-189 Reporter vector pCAT<R>3-Promoter vector     60.6    1e-06  100%
gnl|uv|AF033313.1:4191-4292 Cloning vector pADGal4 2.1             60.6    1e-06  100%

ALIGNMENTS
>gnl|uv|J02400.1:1-5243-49 Simian virus 40
Length=5292

 Score = 249 bits (124),  Expect = 2e-63
 Identities = 124/124 (100%), Gaps = 0/124 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1026  AGGTTACAGAATATTTTTCCATAATTTTCTTGTATAGCAGTGCAGCTTTTTCCTTTGTGG  1085
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
```

Ln 1, Col 1 | 100% | Unix (LF) | UTF-8

بررسی آلودگی توالی DNA با استفاده از ابزار **VecScreen:**

خلاصه اطلاعات:

1. **RID(شناسه جستجو):**
   - شماره **RID-RN03CVM6013** نشان‌دهنده نتایج تحلیل خاصی از توالی مورد بررسی است که تا تاریخ 6 ژانویه 2025 معتبر خواهد بود.
2. **طول توالی ورودی(Query Length) :**
   - طول توالی بررسی‌شده 1437 نوکلئوتید است.
3. **پایگاه داده مورد استفاده:**
   - **UniVec (build 10.2) :** این پایگاه داده شامل توالی‌های برداری استاندارد است که برای شناسایی آلودگی‌های احتمالی در توالی DNA استفاده می‌شود.
4. **مطابقت‌ها(Matches) :**
   - آلودگی‌های شناسایی‌شده در دو بخش از توالی ورودی:
     - **Strong Match:**
     - بخش 577-607 (مطابقت قوی با یک وکتور).
     - بخش 1026-1149 (مطابقت قوی با توالی وکتور.Simian Virus 40)
   - جزئیات بخش‌های آلوده:
     - توالی‌ها به طور کامل با بخش‌های مرتبط از پایگاه داده وکتور مطابقت دارند.

تحلیل هم‌ترازی(Alignment Analysis) :

1. **بخش اول:**
   - **وکتورSimian Virus 40 :**
     - تطابق کامل (100%) با توالی از پایگاه داده.
     - بدون هیچ شکاف (Gap) بین توالی‌ها.
2. **بخش دوم:**
   - **Cloning vector pSV2neo :**
     - مطابقت کامل (100%) در یک بخش کوچک (31 باز).

نتایج گرافیکی:

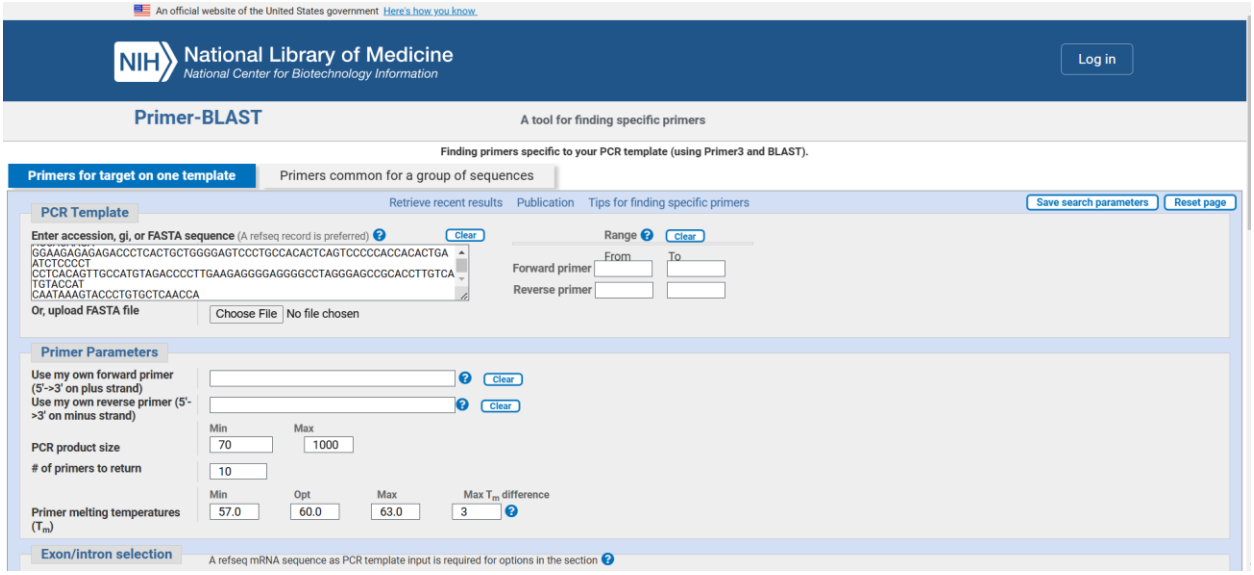
- توالی ورودی با توالی‌های وکتور در پایگاه داده UniVec بررسی شد و موقعیت‌های آلوده (Strong و Moderate Match) به صورت گرافیکی مشخص شدند.

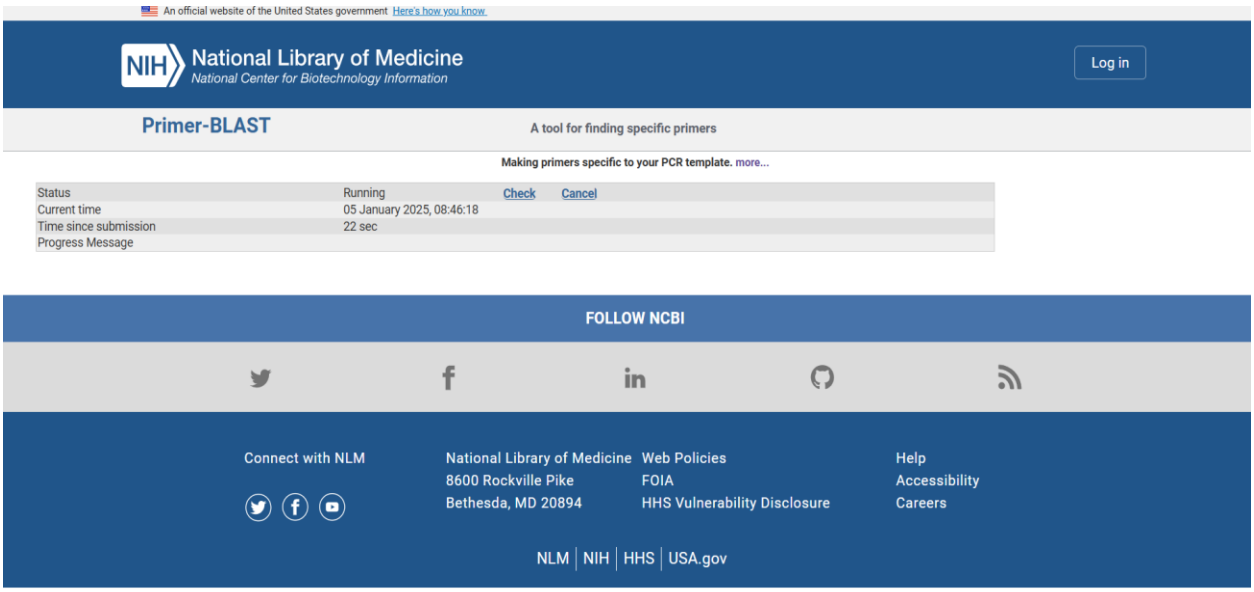
حال می‌توان بخش‌های آلوده به توالی‌های وکتور را شناسایی و حذف کرد تا از صحت و خلوص توالی اطمینان حاصل شود.

3- تمرین سوم:

ابتدا برشی از دنباله را داده تا آن تکه را با همانندسازی به صورت کامل تشکیل دهد(هرچه دنباله طولانی تری بدهیم تطبیق و پیدا کردن درست‌ترین دنباله راحت‌تر است، در ابتدا با سه خط از توالی به مشکل دریافت دو نوع دنباله برخورد کرد اما با طولانی‌تر کردن توالی به تطبیق و خروجی درست رسید.):

GCTCTCTGCTCCTCCTGTTCGACAGTCAGCCGCATCTTCTTTTGCGTCGCCAGCCG
AGCCACATCGCTCAGACACCATGGGGAAGGTGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGG
TCGTATTGGGCGCCTGGTCACCAGGGCTGCTTTTAACTCTGGTAAAGTGGATATTGT
TGCCATCAATGACCCCTTCATTGACCTCAACTACATGGTTTACATGTTCCAATATGAT
TCCACCCATGGCAAATTCCATGGCACCGTCAAGGCTGAGAACGGGAAGCTTGTCAT
CAATGGAAATCCCATCACCATCTTCCAGGAGCGAGATCCCTCCAAAATCAAGTGGG
GCGATGCTGGCGCTGAGTACGTCGTGGAGTCCACTGGCGTCTTCACCACCATGGA
GAAGGCTGGGGCTCATTTGCAGGGGGG





از بین ده جفت primer که داریم، کدام primer بهتر است؟(مپ کردن)

1 - دمای ذوب(Tm) :

- **Tm (Melting Temperature)** باید بین 55-65 درجه سانتی‌گراد باشد.
- اختلاف **Tm** بین پرایمرهای Forward و Reverse نباید بیش از 2-3 درجه سانتی‌گراد باشد.
- پرایمر با **Tm** مناسب تضمین می‌کند که اتصال بهینه در دمای PCR انجام شود.

2 - محتوای GC :

- درصد بازهای **G** و **C** در پرایمر باید بین **40-60%**باشد.
- پرایمرهایی با محتوای GC مناسب اتصال قوی‌تر و پایدارتری ایجاد می‌کنند.
- اگر محتوای GC خیلی زیاد باشد، ممکن است منجر به تشکیل ساختارهای ثانویه شود.

3 - ساختارهای ثانویه:

- پرایمر نباید ساختارهای ثانویه مانند **Hairpins** (ساختار حلقه‌ای) یا **Self-Dimers** ایجاد کند.
- برای بررسی این موارد می‌توان از ابزارهای آنلاین مانند **OligoAnalyzer** استفاده کرد.

4 - خودتکمیلی(Self-Complementarity) :

- پرایمرها نباید تمایل به جفت شدن با خود یا پرایمر مکمل (Reverse Primer) داشته باشند.
- این ویژگی می‌تواند باعث تشکیل **Primer-Dimer** شود و بازده PCR را کاهش دهد.

5 - اندازه پرایمر:

- طول پرایمرها باید بین **18-25نوکلئوتید** باشد.
- پرایمرهایی با این طول اتصال اختصاصی به توالی هدف را تضمین می‌کنند.

6 - جایگاه اتصال به توالی هدف:

- پرایمرها باید به صورت خاص به توالی هدف متصل شوند.
- از ابزارهای BLAST در **NCBI**استفاده کنید تا مطمئن شوید پرایمرها به نواحی غیرهدف متصل نمی‌شوند.

7 - همپوشانی در انتهای 3 ' (End '3) :

- ناحیه انتهایی **'3** باید به اندازه کافی اختصاصی باشد تا از اتصال به توالی‌های غیرهدف جلوگیری کند.
- پرایمرهایی که انتهای 3' مناسبی دارند، کارایی بالاتری دارند.

8 - جلوگیری از توالی‌های تکراری یا ساده:

- از پرایمرهایی که حاوی توالی‌های تکراری(مثل AAAAA یا TTTTT) هستند اجتناب می‌کنیم.
- این پرایمرها تمایل به اتصال غیراختصاصی دارند.

انتخاب نهایی:

پس از بررسی تمام معیارها، بهترین پرایمر جفتی است که:

- Tmمناسب و نزدیک به پرایمر دیگر داشته باشد.
- درصد GC مناسب داشته باشد.
- فاقد ساختارهای ثانویه و خودتکمیلی باشد.
- به توالی هدف با بیشترین اختصاصیت متصل شود.

در نهایت، آزمایش PCR برای تأیید عملکرد پرایمر ضروری است.

حال باید بهترین پرایمر و چهار مورد بعد از آن را به عنوان مپ شده انتخاب کنیم که خود سایت بر اساس بهترین بودن و به صورت مرتب شده از اول تا دهم را به ما داده و بهترین همان اولی است و چهار مپ بعدی جانشین همان شماره های دوم تا پنجم هستند که در ادامه تصاویر مربوطه الصاق‌شده است:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/primertool.cgi?ctg_time=1736087630&job_key=Mjjs1BXgGEg_dh1zEBM5QWoIKHNHGzNuRg&CheckStatus=Check

Primer-BLAST » JOB ID:Mjjs1BXgGEg_dh1zEBM5QWoIKHNHGzNuRg

Primer-BLAST Results

Edit search NEW

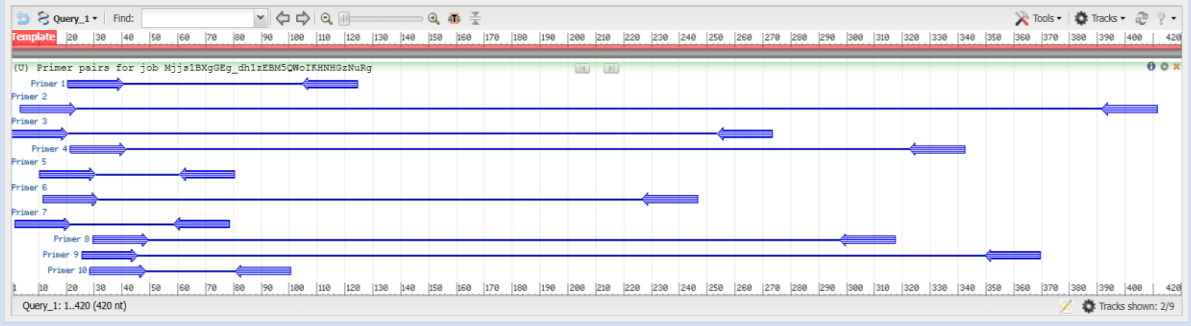
Input PCR template lcl|Query_1

Range 1 - 420

Specificity of primers Primers may **not** be specific to the Input PCR template as targets were found in selected database:Refseq mRNA (Organism limited to Homo sapiens)...help on specific primers

Other reports ▸Search Summary

Graphical view of primer pairs



Detailed primer reports

You can re-search for specific primers by accepting some of the unintended targets, check the box(es) next to the ones you accept and try again to re-search for specific primers Submit

Download primer pairs

Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GACAGTCAGCCGCATCTTCT	Plus	20	21	40	60.11	55.00	5.00	0.00
Reverse primer	GCGCCCAATACGACCAAATC	Minus	20	124	105	59.97	55.00	4.00	0.00
Product length	104								

Primer pair 2

	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CTCTGCTCCTCCTGTTCGAC	Plus	20	4	23	59.83	60.00	4.00	2.00
Reverse primer	AAATGAGCCCCAGCCTTCTC	Minus	20	411	392	60.03	55.00	3.00	0.00
Product length	408								

Primer pair 3

	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GCTCTCTGCTCCTCCTGTTC	Plus	20	1	20	59.82	60.00	2.00	0.00
Reverse primer	TTCCCGTTCTCAGCCTTGAC	Minus	20	273	254	59.97	55.00	3.00	1.00
Product length	273								

Primer pair 4

	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	ACAGTCAGCCGCATCTTCTT	Plus	20	22	41	59.68	50.00	3.00	0.00
Reverse primer	TCGCCCCACTTGATTTTGGA	Minus	20	342	323	59.89	50.00	3.00	0.00
Product length	321								

Primer pair 5

	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CCTCCTGTTCGACAGTCAGC	Plus	20	11	30	60.39	60.00	6.00	3.00
Reverse primer	CCATGGTGTCTGAGCGATGT	Minus	20	80	61	60.11	55.00	6.00	1.00
Product length	70								

7- مراجع

[1] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/

برای واکشی توالی:

[2] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/

برای شناسایی آلودگی:

[3] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen/

برای طراحی PCR:

[4] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/

معرفی دستی این آلودگی ها:

[5] https://bioedit.software.informer.com/download/

گلیسرآلدئید-۳-فسفات دهیدروژناز:

[6] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2597

[7] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen/about/#aboutvecScreen

[8] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen/univec/

[9] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen/uvcurrent/#Statistics

[10] https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pub/UniVec/UniVec

[11] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/primertool.cgi?ctg_time=1736087630&job_key=Mjjs1BXgGEg_dh1zEBM5QWoIKHNHGzNuRg&CheckStatus=Check