# BSA引物设计说明

### 001.基于BSA标记过滤提取位点(比如亲本差异)

此时获得vcf为过滤过的vcf

### 002.基于BSA定位结果获得bed区域

### 003.使用primer3进行sanger引物设计

目前参数：

**r|range:** 产物片段大小,目前600-800

**T1**: 最低退火温度，目前为57.0

**T2:** 最高退火温度，目前为63.0

**pair:** 设计几对引物，目前为3

GC含量没考虑

### 004.对于CAPs，dCAPS，KASP引物设计需要先做个预处理

(1).在一个位点上游100bp，下游100bp内没有其他变异位点的位点保留（过滤）(自己写的脚本100bp参数可调整)

(2).使用bcftools软件的norm命令对过滤完的vcf进行归一化 (校正)（主要是indel的左对齐）

(3).为了加快速度，使用SnpSift软件每1000个vcf位点拆分成一个文件（拆分）

### 005.运行CAPS，dCAPS和KASP设计流程

(1).根据参考基因组取变异位点上游50bp，下游50bp的侧翼生成fa文件

(2).和参考基因组blast去同源

首先获得一个pct\_identity=100-(alignment length+mismatches/identity)\*100(为了避免过大的gaps，阈值为88)

align\_length取max(50, align\_length \* 0.9) （为了去除不是很好的比对）

如果一个位点比对到超过6个地方去除

(3).取变异位点上游500bp，下游500bp设计引物

### 006.KASP设计引物参数

**max\_Tm:** 最大退火温度，在高GC的区域可以增加，目前为63

**max\_size：**最大长度，在低GC的区域可以增加，目前为25

**pick\_anyway：** 无论如何挑选引物，即使它违反了特定的限制

### 006.CAPS设计引物参数

**max\_price：**最大酶价，目前为200U

**max\_Tm:** 最大退火温度，在高GC的区域可以增加，目前为63

**max\_size：**最大长度，在低GC的区域可以增加，目前为25

**pick\_anyway：** 无论如何挑选引物，即使它违反了特定的限制