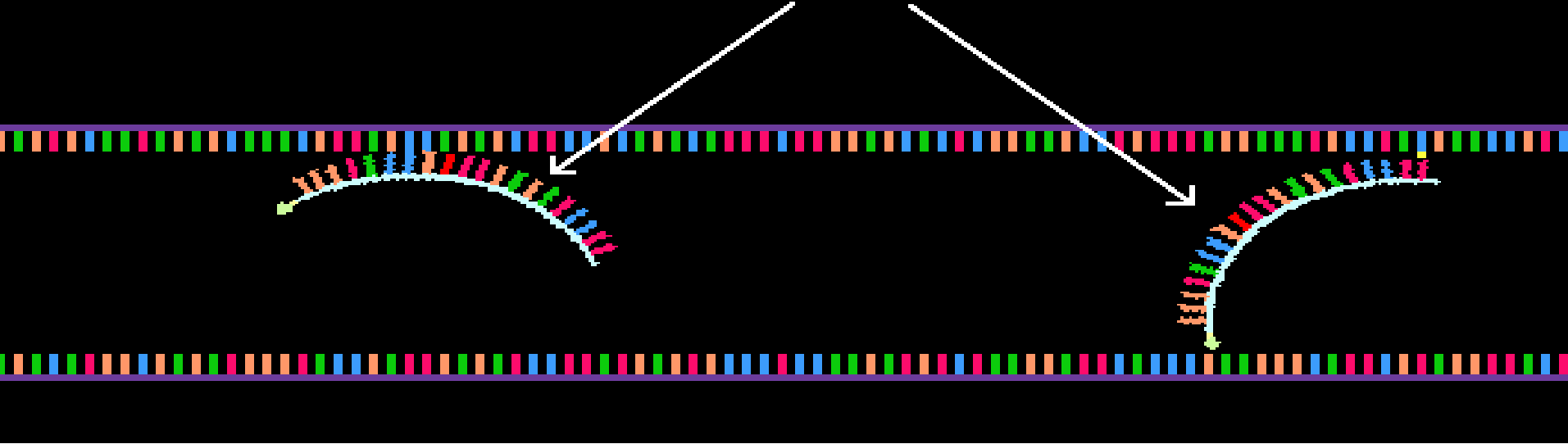


Oligonucleotide Primers



S.SHOBEIRI, PH.D

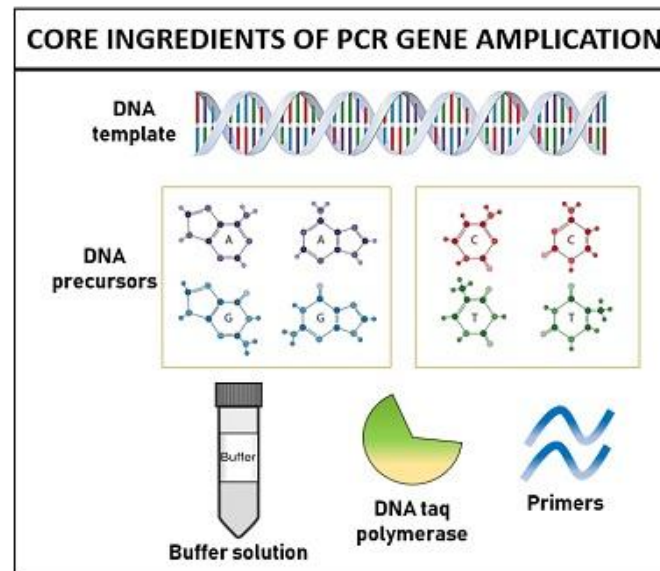
PRIMER DESIGN

تاریخچه PCR

- اوایل دهه ۱۹۷۰ ایده ساخت قطعات کوتاه DNA در محیط آزمایشگاه، توسط H.G. Khorana و همکاران
- ۱۵ سال بعد Kary Mullis و همکاران با استفاده از قطعه Klenow آنزیم DNA پلی مرز باکتری E.coli و دو پرایمر که در دو طرف قطعه مورد نظر قرار می گرفت این ایده را عملی کرد
- سال ۱۹۸۸ Saiki و همکاران، استفاده از DNA پلی مرز مقاوم به حرارت را پیشنهاد نمودند، به سبب تحول ایجاد شده توسط Taq DNA Polymerase در سال ۱۹۸۸ بعنوان ملکول سال معرفی شد.

Polymerase chain reaction; PCR

برای اینکه بتوان قطعه ای از یک توالی بلند DNA را در محیط آزمایشگاه تکثیر داد و از آن قطعه میلیون ها کپی ساخت، باید فرآیندی نظیر همانند سازی DNA در باکتری را تقلید نمود و بارها در یک تیوپ کوچک این فرایند تکرار شود



اجزای PCR

آنزیم Taq پلیمراز
پرایمرها

DNA الگو
نوکلئوتیدها (واحدهای ساختاری DNA)



مولکول الگو



پرایمرها



Taq پلیمراز



نوکلئوتیدها

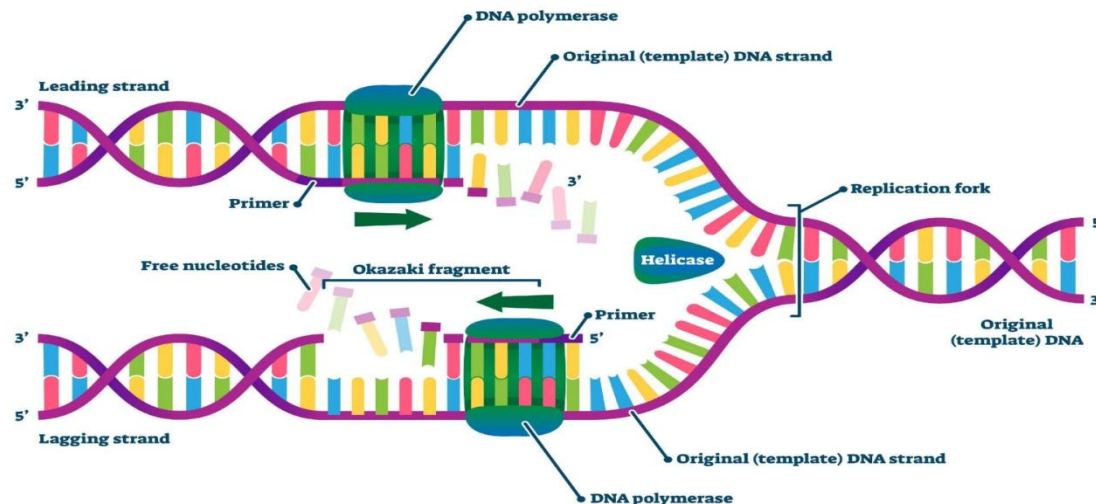


بافر و کوفاکتورها

DNA پلیمراز

واکنش PCR نیز مانند فرایند همانندسازی DNA به آنزیم DNA پلیمراز وابسته است. این آنزیم، فرایند ساخته شدن رشته جدید را از روی رشته قدیمی (الگو) کاتالیز می کند. آنزیم DNA پلیمرازی که معمولاً در واکنش PCR به کار گرفته می شود، Taq پلیمراز نام دارد.

DNA POLYMERASE



Taq پلیمراز

این آنزیم از یک باکتری مقاوم به گرما به نام «ترموس آکوآتیکوس» *Thermus aquaticus* گرفته شده است.

باکتری ترموس آکوآتیکوس در چشمه‌های آب داغ و دریاچه‌های گرمابی زندگی می‌کند.

این دریاچه‌ها در بستر دریا و اقیانوس، در نزدیکی مکان‌های فعال آتشفشانی قرار دارند و محل خروج هوای گرم هستند.

آنزیم‌های مختلف این باکتری، از جمله DNA پلیمراز، نسبت به گرما بسیار مقاوم هستند.

این آنزیم، در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد، در فعال‌ترین حالت خود قرار دارد، دمایی که در آن، بیشتر آنزیم‌های انسانی، غیرفعال خواهند شد.



Taq پلیمر از (ویژگی ها)

پایداری گرمایی (Heat-Stability)

توانایی آنزیم در حفظ ساختار سه بعدی و عملکرد خود در دماهای بالاتر از محیط مناسب خود.

قدرت پردازش (Processivity)

توانایی آنزیم در حفظ اتصال به سوبسترا تا پایان واکنش.

✓ بالاتر بودن قدرت پردازش، به معنای آن است که آنزیم می تواند تعداد بیشتری واکنش را تا مرحله نهایی به پیش ببرد و پیش از آن که واکنش به پایان برسد، سوبسترا را رها نخواهد کرد.

صحت عملکرد (Fidelity)

توانایی اتصال مولکول صحیح، در جای صحیح.

✓ در مورد پلیمرازها، این ویژگی، به معنای آن است که در مقابل هر نوکلئوتید، مولکول مکمل آن قرار خواهد گرفت. همانطور که مشخص است، این ویژگی در PCR دارای اهمیت فراوانی است چراکه هرگونه اشتباه در جایگذاری نوکلئوتیدها، به تغییرات قابل توجهی در نتیجه نهایی آزمایش می انجامد.

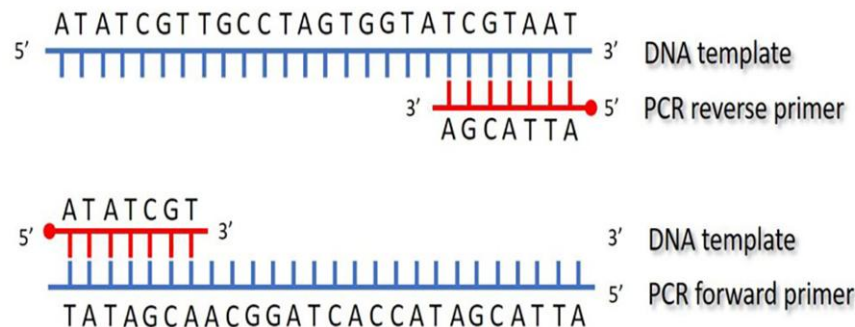
اضافه کردن باز به انتهای محصول

پرایمرهای PCR

آنزیم Taq پلیمراز نیز، مانند پلیمرازهای دیگر، تنها در صورتی می‌تواند سنتز رشته جدید را کاتالیز کند که مولکول «پرایمر» را در اختیار داشته باشد.

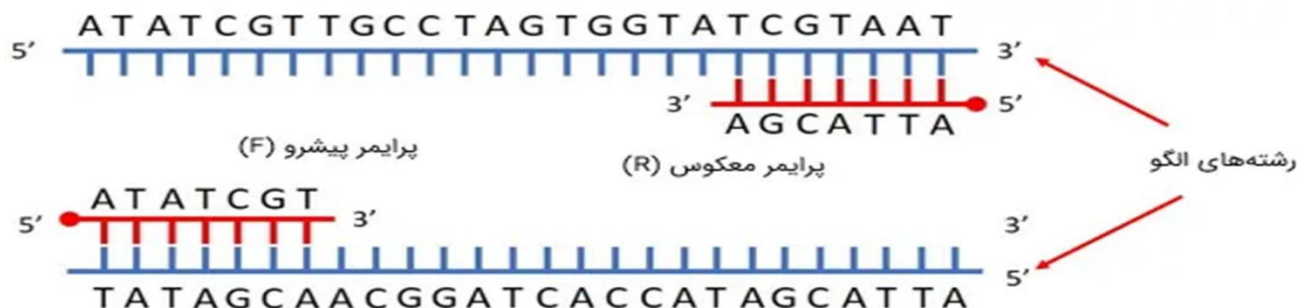
پرایمر، در واقع، مولکول نوکلئوتیدی کوچکی است که یک نقطه آغاز را در اختیار آنزیم قرار می‌دهد.

این نقطه آغاز، همان گروه هیدروکسیل آزاد موجود در انتهای ۳' آخرین نوکلئوتید مولکول پرایمر است.



پرایمرهای PCR

- ✓ پرایمرها قطعه‌های کوتاهی از یک DNA تک-رشته‌ای هستند که معمولاً حدود ۲۰ نوکلئوتید طول دارند.
- ✓ این قطعه‌ها طوری طراحی می‌شوند که ناحیه هدف (Target Region) را در بر بگیرند.
- ✓ این اتصال، از طریق پیوندهای هیدروژنی بین پرایمر و الگو صورت می‌گیرد.
- ✓ در هر قطعه از ژنوم انسان، تنها یکی از دو رشته DNA، حاوی ژن رمزکننده و فعال هستند.
- ✓ پرایمری که برای اتصال به این رشته طراحی می‌شود، پیشرو Forward و پرایمری که برای اتصال به رشته مکمل طراحی می‌شود، معکوس Reverse نام دارد.



پرایمرهای PCR

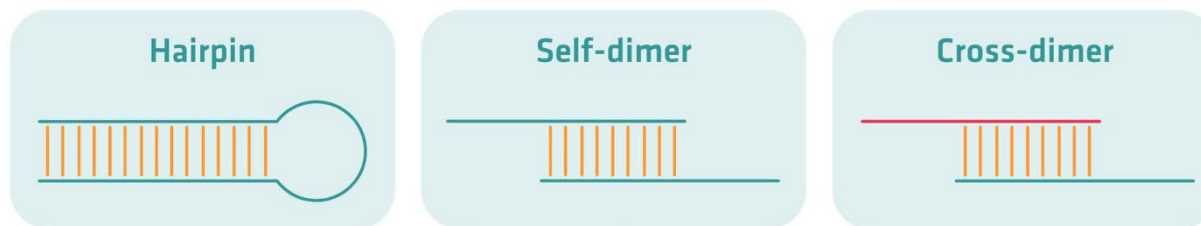
✓ طول مناسب پرایمر ۱۸ تا ۲۲ باز می‌باشد.

✓ دمای ذوب پرایمر T_m – Primer melting temperature موید ثبات ساختار دو رشته ای DNA است. دمای ذوب ۵۲ تا ۵۸ بهینه است و بهتر است اختلاف دمای دو پرایمر از ۵ درجه بیشتر نشود.

✓ در دمای اتصال پرایمر T_a – Primer annealing temperature، پرایمر به طور خیلی اختصاصی به تارگت اصلی خود می‌چسبد. ۵۵-۶۵ درجه

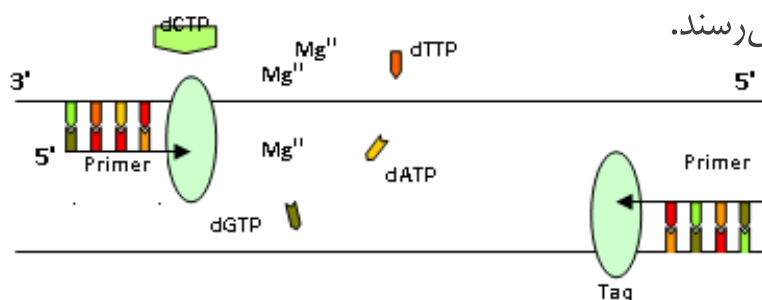
✓ محتوای GC پرایمرها بهتر است بین ۴۰ تا ۶۰ درصد باشد.

✓ قابلیت اتصال بازها درون یک پرایمر primer self-complementarity موجب تولید ساختارهای ثانویه Secondary structures نامناسبی می‌شود که روی موفقیت واکنش PCR اثر سوء دارند.

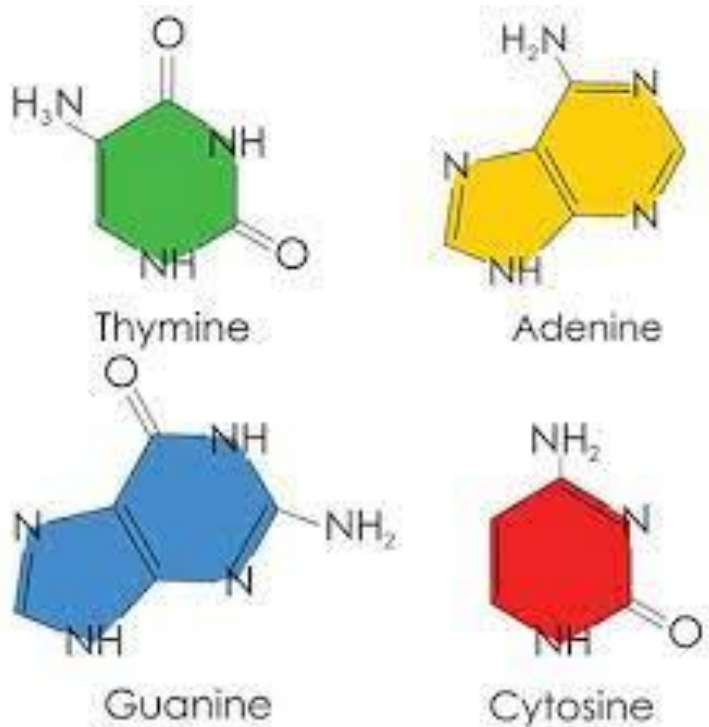


بافر PCR

- هر آنزیم در یک شرایط PH و قدرت یونی خاص، بیشترین فعالیت را نشان می‌دهد.
- بافرها این شرایط را ایجاد و تا پایان واکنش، حفظ می‌کنند.
- در مورد Taq پلیمراز، بیشتر این بافرها حاوی تریس-HCl، نمک کلرید پتاسیم KCl و نمک $MgCl_2$ هستند.
- تریس-HCl به حفظ PH بین ۸ تا ۹/۵ کمک می‌کند.
- یون پتاسیم موجود در این بافرها، موجب تقویت فرایند اتصال پرایمرها به الگو، طی مرحله آنیلینگ می‌شود.
- یون منیزیم، به عنوان کوفاکتور آنزیم پلیمراز، به آن متصل خواهد شد تا آن را به فعال‌ترین حالت ساختاری خود در آورد.
- بافرهای PCR، معمولاً در غلظت 10X به فروش می‌رسند.

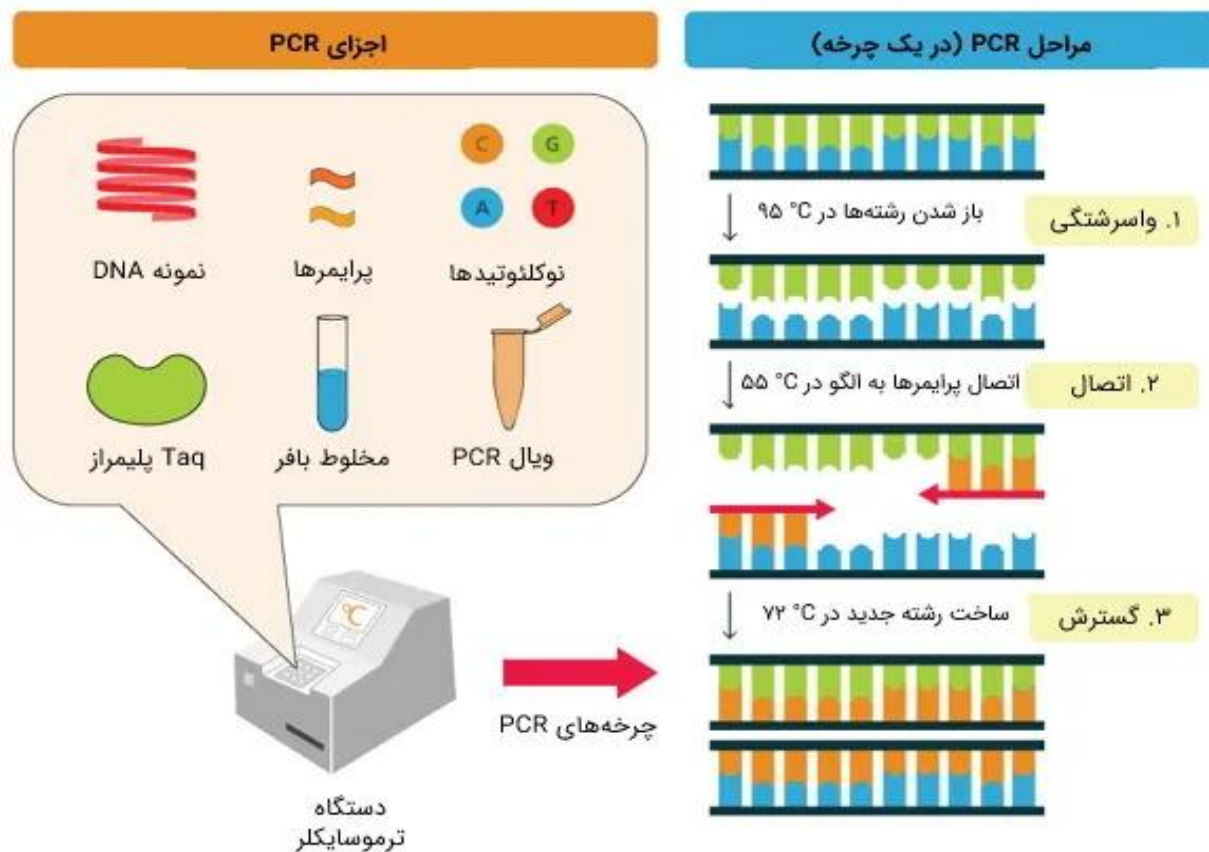


دزو اکسی نوکلئوتید تری فسفات (dNTP)



- در یک واکنش PCR استاندارد، از مخلوطی از dNTP ها که حاوی میزان مساوی از هر چهار نوع (dATP , dCTP , dGTP , dTTP) dNTP است، استفاده می شود.
- آنزیم DNA Taq پلی-مراز با توجه DNA هدف در جهت $5' \rightarrow 3'$ واحدهای dNTP را به پرایمر می افزاید و رشته DNA کپی را می سازد.

مراحل PCR



✓ واسرشتگی Denaturation

✓ اتصال Annealing

✓ گسترش Extension

مراحل PCR

✓ دناتوراسیون اولیه

✓ پیش از آغاز اولین چرخه دمایی، ویال حاوی اجزای واکنش، تا رسیدن به دمای ۹۵ درجه سانتیگراد، گرم می‌شود و حدود ۵ دقیقه در این دما باقی می‌ماند.

✓ هرگونه ساختارهای ثانویه یا پیچ و تاب خوردگی‌های مولکول الگو، کاملاً حذف می‌شوند و مولکول، به صورت یک تک‌رشته‌ای خالص در معرض آنزیم قرار می‌گیرد.

✓ طویل سازی نهایی

✓ پس از انجام آخرین چرخه دمایی، ویال نمونه برای مدت حدود ۵ تا ۱۰ دقیقه دیگر در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد، باقی می‌ماند و زمان لازم را فراهم می‌کند تا آنزیم Taq پلیمراز، کار ساخت رشته‌های ناقص را تکمیل کند.

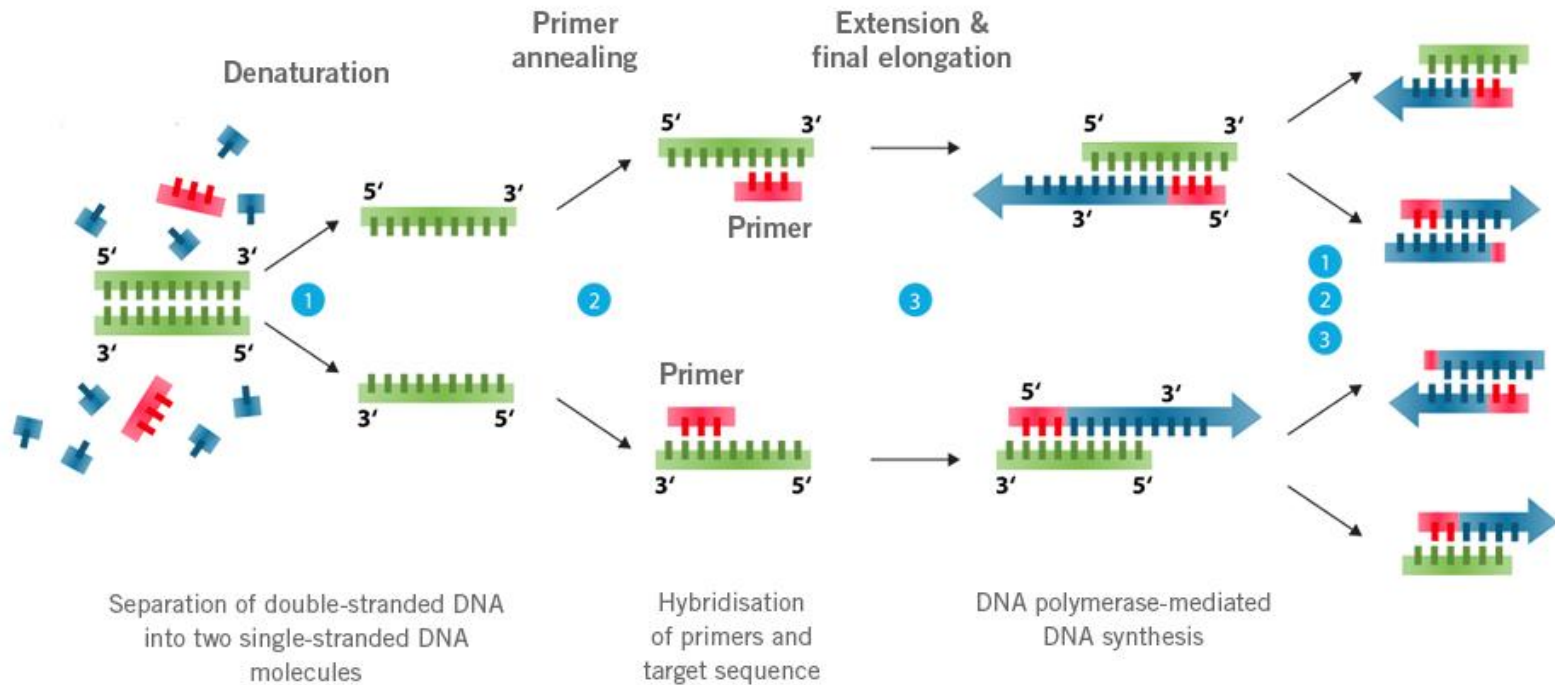
مراحل یک واکنش PCR

واکنش زنجیره ای پلیمرز در دستگاهی به نام ترموسایکلر انجام می شود. هر واکنش ساده، بین ۲ تا ۴ ساعت طول می کشد و طی آن، مراحل سه گانه فوق، بین ۲۵ تا ۳۵ بار تکرار خواهند شد.

تکرار	مرحله	دما	زمان
1	واسرشتگی اولیه	95°C	۵ دقیقه
25-30	واسرشتگی	95°C	۳۰ ثانیه
	اتصال	55°C	۳۰ ثانیه
	گسترش	72°C	۳۰ ثانیه
1	گسترش نهایی	72°C	۱۰ دقیقه
1	نگهداری نهایی	10°C	تا خاموش کردن دستگاه

پرایمر

PCR primer



کاربردهای پرایمر

طراحی پرایمر برای تعیین توالی ژنوم یا ژنوتایپینگ

برای تکنیک‌های توالی‌یابی ژنوم مانند NGS یا Sanger به کار می‌روند. همچنین برای تعیین پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلوتیدی

طراحی پرایمر در تکنیک CRISPR-Cas9

می‌توانند جهش‌ها یا تغییرات هدفمند را در ژنوم با استفاده از سیستم CRISPR-Cas9 ایجاد کنند.

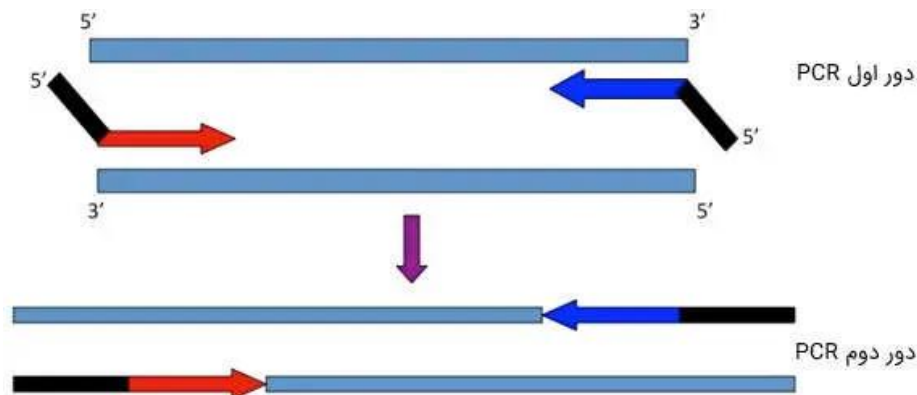
طراحی پرایمر در انگشت نگاری DNA fingerprinting

پزشکی قانونی، تعیین ابوت (پدری) یا تبارشناسی ژنتیکی استفاده می‌کنیم.

طراحی پرایمر برای کلونینگ ژن

برای تکثیر یک ناحیه هدف در وکتور دو طرف آن

با ایجاد ناحیه برش در پرایمر تکثیر می‌شود



طول پرایمر

- پرایمرهای ۱۸ تا ۲۵ نوکلئوتیدی تعادل مناسبی بین کارایی و اختصاصیت ایجاد می کنند.
- پرایمرهای کوتاه تر ممکن است منجر به اتصال های غیراختصاصی شوند.
- پرایمرهای بلندتر کارایی کمتری دارند زیرا فرآیند اتصال کندتر انجام می شود.



دمای ذوب پرایمر T_m

- دمای ذوب پرایمر T_m – Primer melting temperature موید ثبات ساختار دو رشته ای DNA است.
- در اینجا منظور از ساختار DNA دو رشته ای، باند شدن و اتصال پرایمر به مولکول الگو می باشد.
- دمای ذوب پرایمر، دمایی است که در آن نیمی از مولکول های پرایمر، تک رشته ای هستند و نیمی دیگر به مولکول DNA متصل شده و دو رشته ای شده اند. لذا این دما به یک شرایط تعادل اشاره می کند که در این تعادل مولکول های پرایمر تک رشته ای، مولکول های تارگت تک رشته ای، مولکول های تارگت دارای پرایمر متصل شده، و مولکول های تارگت دارای پرایمرهای در حال جدا شدن همگی در حال تعادل می باشند.
- دمای ذوب ایده آل بین ۵۵ تا ۶۵ درجه سانتی گراد است.
- اختلاف دمای ذوب پرایمرهای Forward و Reverse نباید بیشتر از ۵ درجه باشد.
- T_m خیلی بالا باعث کاهش کارایی و T_m خیلی پایین باعث کاهش اختصاصیت می شود.
- دمای ذوب (T_m) در طراحی پرایمر با فرمول های مختلفی محاسبه می شود، اما یکی از رایج ترین فرمول های دمای ذوب برای پرایمرهای کوتاه تر از ۲۰ نوکلئوتید، فرمول والاس است:

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

دمای اتصال پرایمر Ta

❖ معمولاً ۳ تا ۵ درجه کمتر از T_m انتخاب می شود.

❖ در دمای اتصال پرایمر **Primer annealing temperature – Ta**، پرایمر به طور خیلی اختصاصی به تارگت اصلی خود می چسبد.

❖ هر چقدر دمای Ta بیشتر باشد، اتصال ویژه و اختصاصی از احتمال بیشتری برخوردار است. این در حالی است که امکان باقی ماندن این اتصال از لحاظ زمانی کوتاهتر است.

❖ هر چقدر این اتصال از ثبات کمتری برخوردار باشد، آنزیم فرصت کمتری برای ساخت محصول پیدا می کند و لذا کل تکثیر در واکنش PCR کم می شود.

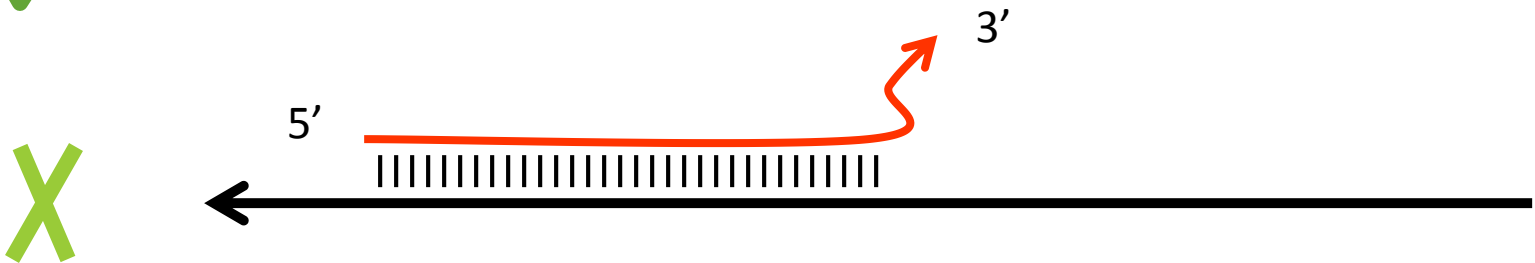
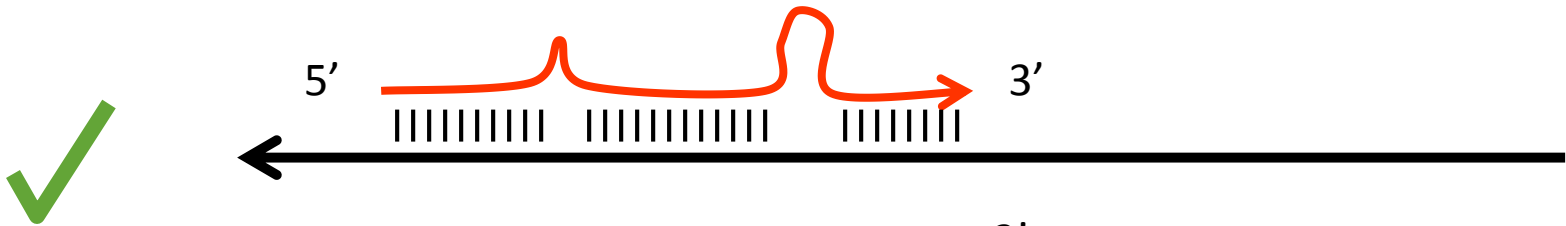
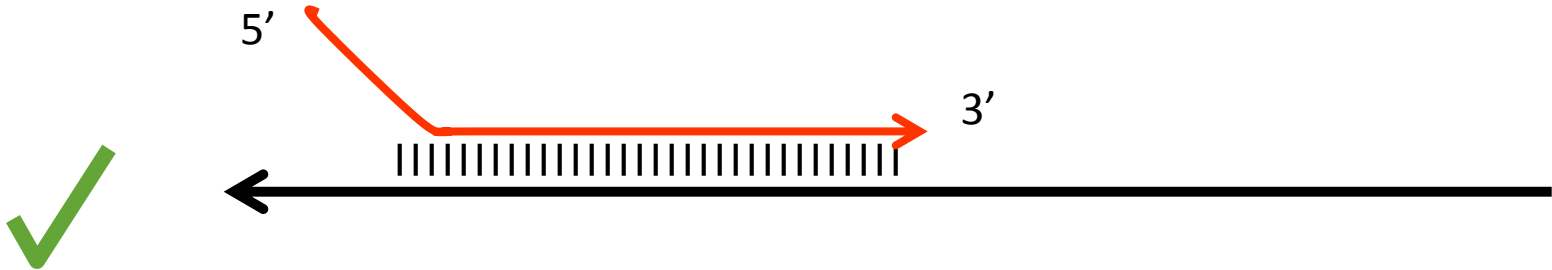
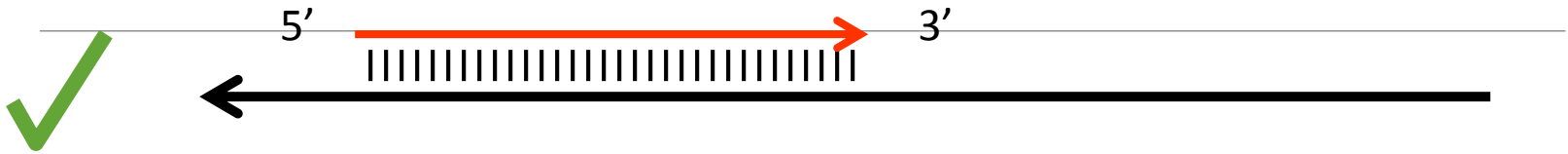
❖ لذا دمای Ta بسیار بالا منجر به هیبریدیزاسیون ناکافی پرایمر با الگو شده و در نتیجه محصول PCR کاهش می یابد. در مقابل، Ta بسیار پایین ممکن است منجر به ایجاد محصولات غیراختصاصی شود.

درصد GC در توالی پرایمر GC-Content

- مقدار مطلوب ۴۰ تا ۶۰ درصد است.
- مقدار بالای ۶۰ درصد پایداری اتصال را افزایش می دهد اما می تواند موجب تشکیل ساختارهای ثانویه شود.
- مقدار پایین ۴۰ درصد باعث کاهش اختصاصیت پرایمر می شود.

گیره GC (GC Clamp)

- وجود ۱ (تا ۳) باز G یا C در انتهای ۳' موجب افزایش پایداری اتصال پرایمر به الگو می‌شود.
- این ویژگی به آنزیم DNA پلیمراز کمک می‌کند که فرآیند سنتز را با دقت بیشتری آغاز کند.
- با این حال، پرایمرهایی با توالی ... NNCG یا NNGC در انتهای ۳' خود توصیه نمی‌شوند.
- تعداد بالای غیرمعمول بازهای GC انتهایی، تشکیل ساختارهای سنجاق سری را افزایش می‌دهد و ممکن است دایمرهای پرایمر ایجاد کند.



ساختارهای ثانویه Secondary Structures

تشکیل دایمرهای پرایمر و سنجاق سر Hairpin می تواند کارایی PCR را کاهش دهد.
بررسی و حذف ساختارهای نامطلوب در نرم افزارهای طراحی پرایمر ضروری است.

دایمرهای پرایمر Primer Dimer:

پرایمرها نباید مکمل یکدیگر باشند تا از تشکیل دایمرهای پرایمر جلوگیری شود.

حلقه های سنجاق سری Hairpin Loops:

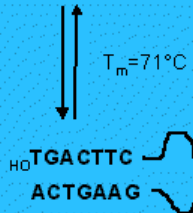
نباید درون پرایمر، توالی های مکملی وجود داشته باشد که موجب تا خوردن و تشکیل Hairpin شود.

توالی‌های تکراری و خودمکمل

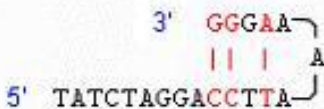
Self Complementarity

♦ hairpin formation

ACTGAAGCACTGAAGATACTTCAGT_{OH}



Hairpin

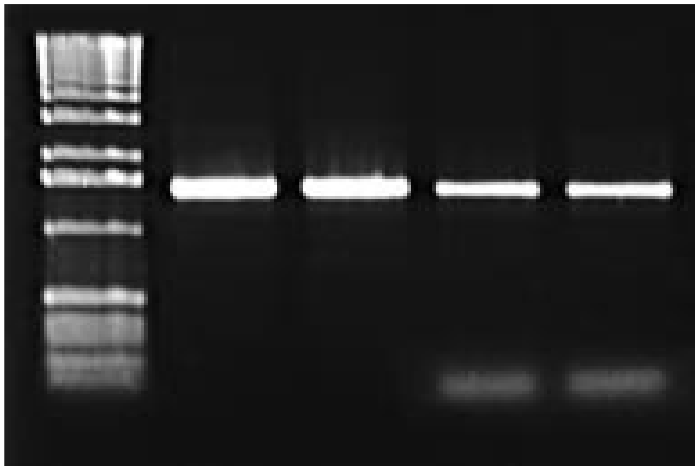


✓ هیچ توالی تکراری معکوس یا توالی‌های خودمکمل با طول بیش از ۳ جفت باز نباید وجود داشته باشد. (از قرار گرفتن توالی‌های تکراری مانند **AAAA** یا **GGGG** در پرایمر اجتناب کنید.)

✓ این موارد می‌توانند باعث لغزش آنزیم پلیمراز و تولید محصولات نامشخص شوند.

✓ توالی‌هایی از این نوع تمایل به تشکیل ساختارهای سنجاق سری دارند که در شرایط PCR پایدار هستند.

توالی‌های تکراری و خودمکمل



Primer Complementarity

♦ primer dimer formation

U. GAACTACCATAGACACACTGAAGGC_{OH}

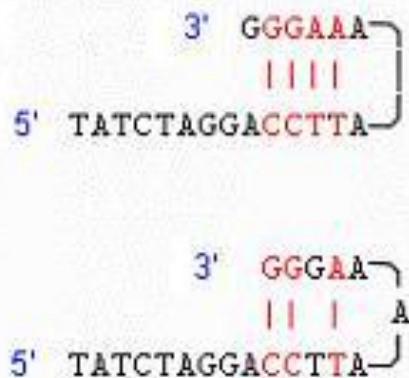
L. CTTCAGGTCAAGAACTCCTTCAGT_{OH}



به عنوان یک قاعده کلی، بیش از سه نوکلئوتید متوالی روی یک پرایمر نباید مکمل پرایمر دیگر باشند.

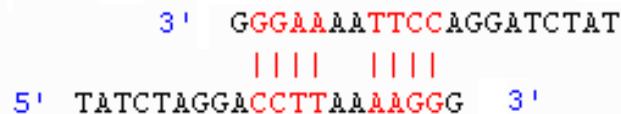
سه مورد عدم تطابق در طراحی پرایمر

Hairpin

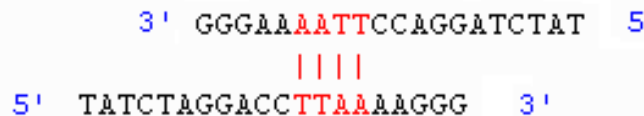


Self-Dimer

8 bp

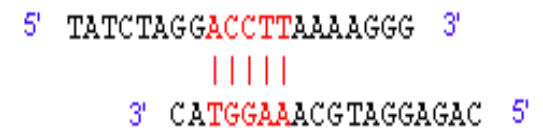


4 bp

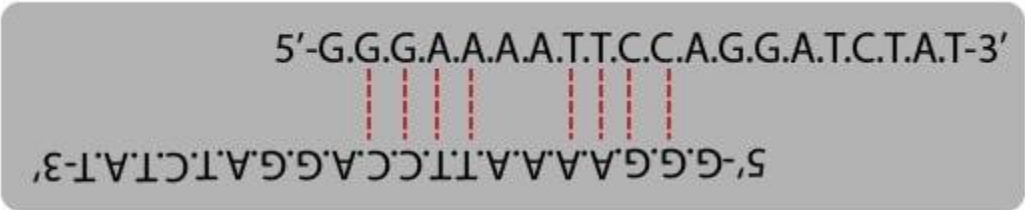


Dimer

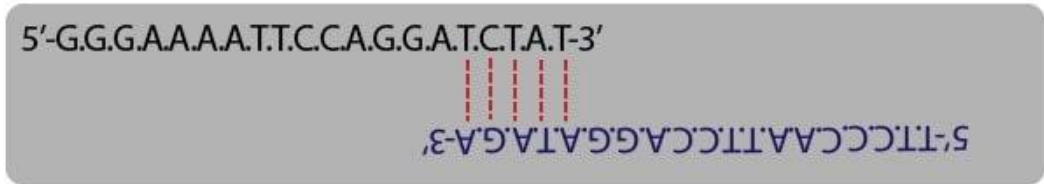
forward primer



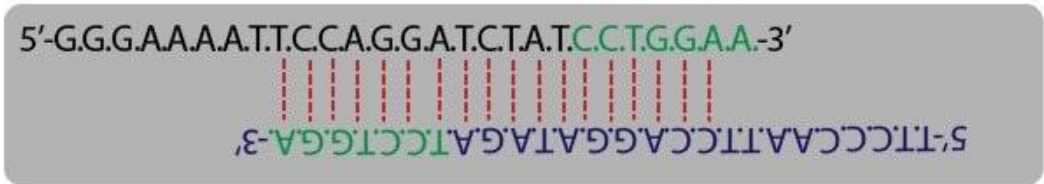
reverse primer



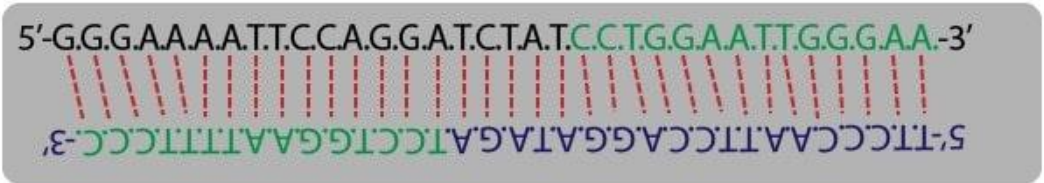
Primer self-dimer



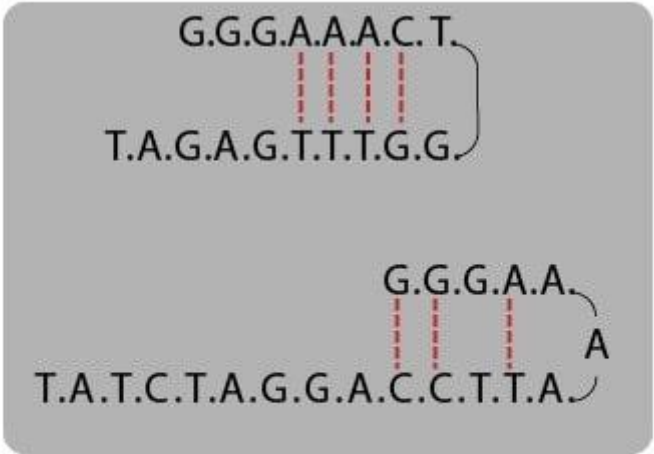
Primer heterodimer



Partial extension by DNA polymerase



Full extension by DNA polymerase



Primer self-complementarity
(hairpin structures)

نکات طلایی برای طراحی بهینه

- ❖ اجتناب از توالی‌های تکراری: از قرار دادن توالی‌های تکراری یا پلی‌نوکلئوتیدی مانند AAAA یا GGGG در پرایمر خودداری کنید، زیرا می‌توانند منجر به اتصال غیراختصاصی شوند.
- ❖ بررسی همولوژی: پرایمرها را با استفاده از ابزارهایی مانند BLAST بررسی کنید تا از عدم اتصال آن‌ها به نواحی غیراختصاصی در ژنوم اطمینان حاصل شود.
- ❖ طراحی پرایمرهای اختصاصی: برای افزایش اختصاصیت، پرایمرها را به گونه‌ای طراحی کنید که ناحیه هدف را به طور کامل پوشش دهند و از اتصال به نواحی مشابه جلوگیری شود.
- ❖ استفاده از نرم‌افزارهای طراحی پرایمر: ابزارهایی مانند Primer3 و OligoAnalyzer می‌توانند در طراحی پرایمرهای بهینه به شما کمک کنند.
- ❖ دمای اتصال : دمای اتصال باید حدود ۵ درجه سانتی‌گراد کمتر از T_m پرایمرها باشد تا اتصال اختصاصی به الگو تضمین شود.
- ❖ طول محصول PCR : طول محصول نهایی PCR را در نظر بگیرید و پرایمرها را به گونه‌ای طراحی کنید که محصول با طول مطلوب تولید شود.

Web-based primer design service

Gene Fisher (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/genefisher/>)

GeneWalker (<http://www.cybergene.se/primerdesign/>)

Web Primer (<http://genome-www2.stanford.edu/cgi-bin/SGD/web-primer>)

Primer 3 (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)

CODEHOP (<http://www.blocks.fhcrc.org/codehop.html>)

Net Primer

(<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html>)

.....and many others

Primer3Plus

pick primers from a DNA sequence

[More...](#)[Source Code](#)[Help](#)[About](#)

Load server settings:

Task:

Select primer pairs to detect the given template sequence. Optionally targets and included/excluded regions can be specified.

[Main](#)[General Settings](#)[Advanced Settings](#)[Internal Oligo](#)[Penalties](#)[Advanced Seq.](#)

Sequence Id:

Paste template sequence below or upload sequence file: No file chosen

Primer3 plus

Mark selected region:

Excluded Regions:

Targets:

Included Region:

Primer overlap positions:

Pair OK Region List:



ncbi



All Images Videos News Short videos Forums Web More Tools

See detailed insights & Compare multiple related Papers for : "ncbi"

Compare insights



National Institutes of Health (.gov)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

National Center for Biotechnology Information

Welcome to **NCBI**. The **National Center for Biotechnology Information** advances science and health by providing access to biomedical and genomic information. About ...

Primer-BLAST

Account · Enable search for primer pairs specific to the intended ...

Gene

Gene. Gene integrates information from a wide range of species. A ...

BLAST

Access keys NCBI Homepage MyNCBI Homepage Main ...

Nucleotide

Nucleotide. The Nucleotide database is a collection of



Sider



Sider Fusion



GPT-5



information, is a key resource for biomedical and genomic information. It is part of the NIH and provides access to databases and bioinformatics tools. NCBI's mission is to advance science and health. It is a valuable source for researchers and healthcare professionals alike, offering a wide range of data and services to support their work.

Related questions:

What specific databases does NCBI host?

How does NCBI support bioinformatics research?



Gene sources

[Genomic](#)
[Plasmids](#)

Categories

[Alternatively spliced](#)
[Annotated genes](#)
[Non-coding](#)
[Protein-coding](#)
[Pseudogene](#)

Sequence content

[CCDS](#)
[Ensembl](#)
[RefSeq](#)
[RefSeqGene](#)

Status

[Current](#)[Clear all](#)[Show additional filters](#)

Tabular ▾ 20 per page ▾ Sort by Relevance ▾

Send to: ▾

[Hide sidebar >>](#)See detailed insights & Compare multiple related Papers for :
"gapdh "[Compare insights](#) 

GENE

Was this helpful?

[GAPDH – glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase](#)[Homo sapiens \(human\)](#)

Also known as: G3PD, GAPD, HEL-S-162eP

Gene ID: 2597

[RefSeq products](#)[Orthologs](#)[Genome Data Viewer](#)**New** - [Visualize gene across multiple species](#)

RefSeq Sequences



Search results

Items: 1 to 20 of 2524

 [See also 1545 discontinued or replaced items.](#)

<< First < Prev Page 1 of 127 Next > Last >>

Name/Gene ID	Description	Location	Aliases	MIM
--------------	-------------	----------	---------	-----

Filters: [Manage Filters](#)

Results by taxon

Top Organisms [\[Tree\]](#)[Homo sapiens \(783\)](#)
[Rattus norvegicus \(131\)](#)
[Mus musculus \(121\)](#)
[Saccharolobus solfataricus \(12\)](#)
[Arabidopsis thaliana \(11\)](#)
[All other taxa \(1466\)](#)
[More...](#)

Find related data

Database: [Select](#) ▾[Find items](#)

Search details

gapdh[All Fields] AND alive[prop]

[Search](#)[See more...](#)

Recent activity

[Turn Off](#) [Clear](#) gapdh AND (alive[prop]) (2524)

Gene

GAPDH - glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase BETA

Homo sapiens

Summary Transcripts and proteins Orthologs Gene ontology

Transcripts and proteins

Download ▾ Select columns									6 Transcripts	
☐	Gene ID	Symbol	Transcript	Length (nt)	Protein	Length (aa)	Protein na	Action		
☐	2597	GAPDH	NM_001256799.3	1,386	NP_001243728.1	293	glyceralde	⋮		
☐	2597	GAPDH	NM_001289745.3	1,377	NP_001276674.1	335	glyceralde	⋮		
☐	2597	GAPDH	NM_001289746.2	1,525	NP_001276675.1	335	glyceralde	⋮		
☐	2597	GAPDH	NM_001357943.2	1,231	NP_001344872.1	317	glyceralde	⋮		
☐	2597	GAPDH	NM_002046.7 MANE Select	1,285	NP_002037.2	335	glyceralde	⋮		
☐	2597	GAPDH	NR_152150.2	763				⋮		

FOLLOW NCBI

Nucleotide

Nucleotide

Advanced

Search

Help

GenBank

Send to:

Change region shown

Customize view

Homo sapiens glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), transcript variant 2, mRNA

NCBI Reference Sequence: NM_001256799.3

[FASTA](#) [Graphics](#)

Save

Chat with paper

Go to: ☒

LOCUS NM_001256799 1386 bp mRNA linear PRI 29-APR-2025

DEFINITION Homo sapiens glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), transcript variant 2, mRNA.

ACCESSION NM_001256799

VERSION NM_001256799.3

KEYWORDS RefSeq.

SOURCE Homo sapiens (human)

ORGANISM [Homo sapiens](#)
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1386)

AUTHORS Jeon,H.Y., Lee,A.J., Moon,C.H. and Ha,K.S.

TITLE Regulation of AMPK and GAPDH by Transglutaminase 2 Plays a Pivotal Role in Microvascular Leakage in Diabetic Retinas

JOURNAL Diabetes 73 (10), 1756-1766 (2024)

PUBMED [39024127](#)

REMARK GeneRIF: Regulation of AMPK and GAPDH by Transglutaminase 2 Plays a Pivotal Role in Microvascular Leakage in Diabetic Retinas.

REFERENCE 2 (bases 1 to 1386)

AUTHORS Sun,X., Ye,G., Li,J., Yuan,L., Bai,G., Xu,Y.J. and Zhang,J.

TITLE The tumor suppressor Parkin exerts anticancer effects through regulating mitochondrial GAPDH activity

JOURNAL Oncogene 43 (44), 3215-3226 (2024)

PUBMED [38885888](#)

Analyze this sequence

Run BLAST

Pick Primers

Highlight Sequence Features

Find in this Sequence

Show in Genome Data Viewer

Articles about the GAPDH gene

Human protein interaction networks of ancestral and variant SARS-CoV-2 in [Nat Commun. 2025]

EndoMAP.v1 charts the structural landscape of human early endosome complexes [Nature. 2025]

The solute carrier superfamily interactome. [Mol Syst Biol. 2025]

See all...

Reference sequence information

RefSeq alternative splicing

See 5 reference mRNA sequence splice variants for the GAPDH gene.

More about the GAPDH gene

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001256799.3?report=fasta

Search results

Items: 1 to 20 of 10416

<< First < Prev Page 1 of 521 Next > Last >>

See also 3230 discontinued or replaced items.

Name/Gene ID	Description	Location	Aliases	MIM
☐ BAX ID: 581	BCL2 associated X, apoptosis regulator [<i>Homo sapiens</i> (human)]	Chromosome 19, NC_000019.10 (48954875..48961798)	BCL2L4	600040
Related Papers				
Chat with paper				
☐ Bax ID: 12028	BCL2-associated X protein [<i>Mus musculus</i> (house mouse)]	Chromosome 7, NC_000073.7 (45111124..45116332, complement)		
Related Papers				
Chat with paper				
☐ Bax ID: 24887	BCL2 associated X, apoptosis regulator [<i>Rattus norvegicus</i> (Norway rat)]	Chromosome 1, NC_086019.1 (105076472..105081906, complement)		
Related Papers				
Chat with paper				
☐ BAX ID: 280730	BCL2 associated X, apoptosis regulator [<i>Bos taurus</i> (domestic cattle)]	Chromosome 18, NC_037345.1 (55530787..55534997)		
Related Papers				
Chat with paper				
☐ BAX ID: 100355675	BCL2 associated X, apoptosis regulator [<i>Oryctolagus cuniculus</i> (rabbit)]	Chromosome 18, NC_091449.1 (8289697..8295993, complement)		
Related Papers				
Chat with paper				
☐ bax ID: 948089	putative glycoside hydrolase Bax [<i>Escherichia coli</i> str. K-12	NC_000913.3 (3736353..3737177, complement)	b3570, ECK3559	

Search

See more...

Recent activity

[Turn Off](#) [Clear](#)

bax AND (alive[prop]) (10416)

Gene

Homo sapiens glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), transcript variat Nucleotide

Homo sapiens glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), transcript variat Nucleotide

gapdh AND (alive[prop]) (2524)

Gene

The Role of Lipids and Lipoproteins in Atherosclerosis - Endotext

See more...

BAX BCL2 associated X, apoptosis regulator [*Homo sapiens* (human)]

Ask Copilot: Save time, read 10X faster with AI

- Save
- Biases or Limitations
- Points Discussed
- Evidence/Examples Used
- Summarize
- Purpose
- Key Takeaways

Gene ID: 581, updated on 23-Aug-2025

Download Datasets

Summary

Official Symbol	BAX provided by HGNC
Official Full Name	BCL2 associated X, apoptosis regulator provided by HGNC
Primary source	HGNC:HGNC:959
See related	Ensembl:ENSG00000087088 MIM:600040 ; AllianceGenome:HGNC:959
Gene type	protein coding
RefSeq status	REVIEWED
Organism	Homo sapiens
Lineage	Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo
Also known as	BCL2L4
Summary	The protein encoded by this gene belongs to the BCL2 protein family. BCL2 family members form hetero- or homodimers and act as anti- or pro-apoptotic regulators that are involved in a wide variety of cellular activities. This protein forms a heterodimer with BCL2, and functions as an apoptotic activator. The association and the ratio of BAX to BCL2 also determines survival or death of a cell following an apoptotic stimulus. This protein is reported to interact with, and increase the opening of, the mitochondrial voltage-dependent anion channel (VDAC), which leads to the loss in membrane potential and the release of cytochrome c. The expression of this gene is regulated by the tumor suppressor P53 and has been shown to be involved in P53-mediated apoptosis. Multiple alternatively spliced transcript variants, which encode different isoforms, have been reported for this gene. [provided by RefSeq, Dec 2019]
Expression	Ubiquitous expression in colon (RPKM 24.0), spleen (RPKM 21.8) and 25 other tissues See more
Orthologs	mouse all
NEW	Try the new Gene table
	Try the new Transcript table

Table of contents

- Summary
- Genomic context
- Genomic regions, transcripts, and products
- Expression
- Bibliography
- Phenotypes
- Variation
- HIV-1 interactions
- Pathways from PubChem
- Interactions
- General gene information
- Markers, Homology, Gene Ontology
- General protein information
- NCBI Reference Sequences (RefSeq)
- Related sequences
- Additional links

Genome Browsers

- Genome Data Viewer
- Variation Viewer (GRCh37.p13)
- Variation Viewer (GRCh38)
- Ensembl
- UCSC

Related information

[Go to reference sequence details](#)

[FASTA](#) [GenBank](#)

Nucleotide FASTA report

Variation Viewer

HuGE Navigator

Nucleotide

Nucleotide

Advanced

Search

Help

FASTA

Send to:

Homo sapiens chromosome 19, GRCh38.p14 Primary Assembly

NCBI Reference Sequence: NC_000019.10

[GenBank](#) [Graphics](#)

Ask Copilot: Save time, read 10X faster with AI

Save

Key Takeaways

Purpose

Conclusions

Biases or Limitations

Summarize

Evidence/Examples Used

>NC_000019.10:48954875-48961798 Homo sapiens chromosome 19, GRCh38.p14 Primary Assembly

```
GCCTGCGGCGCCGCGCGGACCCGCGAGAGCGGCGGAGCGGCGGTGATGGACGGGTCCGGGG
AGCAGCCAGAGGCGGGGTGAGGCGGGAGGAGAGCGGCGGAGGCGAGCCCCCTCGCCGGCCCG
TCCGGGATCCTTCTACCAGGCTGGGGCTGTGCGATCTCCAAGCACTGAGGGGAGAAATCCCGGATCG
GGCGCTGCCAGCTCCAGTCCCCCTCGTCTCGGAGGTTCTGGCTCTCTGATCCCCGTGTCCCGATCCC
TGCTCTCTGGCGCTCTCGGACCCTCGAGAACCAGGGGATCTCGGAAGCCAAGCCCCGGGCGAGGCCGG
GCTTGTCGCCCGCACCCTCTGCTCTGGCACTGGTGGGAGGGGCGGGTCTCGCTCTGCCCTCTGCCCCCTCAG
GCCAGGGGTCTGGATGCATATAGCGTTCCCTAGCTCTTTCCCCGGGAGAATGTAGGATACAGGCCCA
GCCTCTCTGGCTTTCTCCATCAGGGAAGTGTGTCTGGGCCCCCGCTCACTTTATCTGCTAGGGTCCC
AGAAGTCCAGGGTCCCCAGCTCTGTCTCCCTCAGGGGCCGTGAGTCTCCACAGTCTCTGATCCCCTAG
AACCCAAGAGTCCAGGTACCTCTTCCCTTCTCTCTCTAGGGCCACCAAGCTCTGAGCAGATCATGA
AGACAGGGGCCCCCTTTGCTTCAGGGGTGAGTTTGAAGTCTGATTATTGTGGCACAGATTTGAGGAGTGAC
ACCCCGTTCTGATTCTGCACCCTCACTCCATCCCCACTCTAGTTTCACTCAGGATCGAGCAGGGCGAATG
GGGGGGGAGGCACCCGAGCTGGCCCTGGACCCGGTGCCTCAGGATGCGTCCACCAAGAGCTGAGCGAGT
GTCTCAAGCGCATCGGGGACGAAGTGGACAGTAACATGGAGCTGCAGAGGTGTGGGCCCTCGAGGACCCA
GAAGTCCAGCCACTGGGCTCTCTCAGGACACAGGACTCTCAGCCCCGATTTCTCTCTCTCCCTAAGAAC
TAGGAGTCTGGGCCCCCAAGCTCAGCGCAACATTCGGGACTCCAGCCCTCCTCTCTGCGCAGGATCTTA
AAACCTCTCTCAGGGAGTCATTTTCCACCTTCTCTAAATGTCTGTCTTGTCCCTTCCCTTGTCCCCC
GTTGGCTGTGTCTTTTCAATTCAGCTGGCTGGGGCTCAGTCTCCTTATCTTATGTGTGCGGTGGATG
CGGGAATTTTCCACCATCAGCCTGATGCCTGCTCCCCGGCACTGGTTCTCTCTCTGCAAGGATGATT
GCCGCTGTGGACACAGACTCCCCCGAGAGGTCTTTTCCGAGTGGCAGTGCATGTTTCTGACGGCA
ACTTCAACTGGGGCCGGGTGTGCGCTTTTCTACTTTGCCAGCAAACTGGTGTCTCAAGGTGGGAGCTG
CAGGGCAGTGAGCCAGGAGTGCTCCCCCTCAGATCTGTGAGGACTGGGGATCGTGGTATCAACCCCT
GCAGTGGCCAGTGACACAGAGGGCATGGAGAGAGATGGCTGTGCACTGGGTGTCTGCTCTCTTTTA
TTCATTCAACAAGCATTTACTGAGCTGCTATGTGCCAGGCTATACCTGGCACCTGGGACACAGCACTG
```

Change region shown

☐ Whole sequence

☒ Selected region

from: 48954875 to: 48961798

Update View

Customize view

Analyze this sequence

Run BLAST

Pick Primers

Related information

Assembly

BioProject

Protein

PubMed

Taxonomy

Components (Core)

Full text in PMC

Gene

Identical GenBank Sequence

PubMed (Weighted)

RNA

Primer3Plus

pick primers from a DNA sequence

[More...](#)[Source Code](#)[Help](#)[About](#)

[Load server settings:](#)

Task:

Select primer pairs to detect the given template sequence. Optionally targets and included/excluded regions can be specified.

[Main](#)[General Settings](#)[Advanced Settings](#)[Internal Oligo](#)[Penalties](#)[Advanced Seq.](#)

[Sequence Id:](#)

[Paste template sequence below](#) or upload sequence file:

No file chosen

Mark selected region:

[Excluded Regions:](#) < >

[Targets:](#) []

[Included Region:](#) { }

[Primer overlap positions:](#) -

[Pair OK Region List:](#)

☒ [Pick left primer](#)

☐ [Pick hybridization probe](#)

☒ [Pick right primer](#)

or use [left primer](#) below.

(internal oligo) or use [oligo](#) below.

or use [right primer](#)

11/2/2025

41

Primer3Plus

pick primers from a DNA sequence

[More...](#)[Source Code](#)[Help](#)[About](#)

[Load server settings:](#) Default

Task: generic

Select primer pairs to detect the given template sequence. Optionally targets and included/excluded regions can be specified.

[Main](#)[General Settings](#)[Advanced Settings](#)[Internal Oligo](#)[Penalties](#)[Advanced Seq.](#)

[Sequence Id:](#)

[Paste template sequence below](#) or upload sequence file: No file chosen

```
CCCCATGTTTCGTCATGGGTGTGAACCATGAGAAGTATGACAACAGCCTCAAGATCATCAGCAATGCCTCC
TGCACCACCAACTGCTTAGCACCCCTGGCCAAGGTCATCCATGACAACCTTTGGTATCGTGGAAGGACTCA
TGACCACAGTCCATGCCATCACTGCCACCCAGAAGACTGTGGATGGCCCCCTCGGGAAACTGTGGCGTGA
TGGCCGCGGGGCTCTCCAGAACATCATCCCTGCCTCTACTGGCGCTGCCAAGGCTGTGGGCAAGGTCATC
CCTGAGCTGAACGGGAAGCTCACTGGCATGGCCTTCCGTGTCCCACTGCCAACGTGTCAAGTGGTGGACC
TGACCTGCCGCTAGAAAAAAGCTGCCAAATATGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGGCGTCGGAGGG
CCCCCTCAAGGGCATCCTGGGCTACACTGAGCACCAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAACAGCGACACCCAC
TCCTCCACCTTTGACGCTGGGGCTGGCATTGCCCTCAACGACCACTTTGTCAAGCTCATTTCCTGGTATG
ACAACGAATTTGGCTACAGCAACAGGGTGGTGGACCTCATGGCCACATGGCCTCCAAGGAGTAAGACCC
CTGGACCACCAAGCCCCAGCAAGAGCACAAGAGGAAGAGAGACCTCACTGCTGGGGAGTCCCTGCCAC
ACTCAGTCCCCCACCACACTGAATCTCCCTCCTCACAAGTGGCATGTAGACCCCTTGAAGAGGGGAGGG
GCCTAGGGAGCGGCACCTTGTATGTACCATCAATAAAGTACCCTGTGCTCAACCA
```

Mark selected region: < Excluded > [Target] { Included } Regions from Seq.

[Excluded Regions:](#) < >

[Targets:](#) []

[Included Region:](#) { }

[Primer overlap positions:](#) -

[Pair OK Region List:](#)

☒ [Pick left primer](#)☐ [Pick hybridization probe](#)☒ [Pick right primer](#)

or use [left primer](#) below.

(internal oligo) or use [oligo](#) below.

or use [right primer](#)

Primer3Plus

pick primers from a DNA sequence

[More...](#)[Source Code](#)[Help](#)[About](#)

[Load server settings:](#)

[Task:](#)

Select primer pairs to detect the given template sequence. Optionally targets and included/excluded regions can be specified.

[Main](#)[General Settings](#)[Advanced Settings](#)[Internal Oligo](#)[Penalties](#)[Advanced Seq.](#)

[Product Size Ranges](#)

Primer Size [Min:](#) [Opt:](#) [Max:](#)

Primer Tm [Min:](#) [Opt:](#) [Max:](#) [Max Tm Difference:](#)

Primer Bound% [Min:](#) [Opt:](#) [Max:](#) [Annealing Temp:](#)

Primer GC% [Min:](#) [Opt:](#) [Max:](#)

[Concentration of monovalent cations:](#) [ANNEALING Oligo Concentration:](#)

Not the concentration of oligos in the reaction mix!

[Concentration of divalent cations:](#) [Concentration of dNTPs:](#)

[DMSO Concentration:](#) [Formamide Concentration:](#)

[DMSO Factor:](#)

[Mispriming/Repeat Library:](#)

Load and Save

To upload or save a settings file from your local computer, choose here:

Load only Settings from file: No file chosen

Primer3Plus ~ [Primer3-GitHub](#) · [GEAR-Genomics](#) · [Contact](#) · [Datenschutzerklärung](#) · [Impressum](#)

Supported by [EMBL](#)

Primer3Plus

pick primers from a DNA sequence

[More...](#)[Source Code](#)[Help](#)[About](#)

[Load server settings:](#) Default

[Activate Settings](#)

Task: generic

Select primer pairs to detect the given template sequence. Optionally targets and included/excluded regions can be specified.

[Pick Primers](#)

[Reset Default](#)

[Main](#)[General Settings](#)[Advanced Settings](#)[Internal Oligo](#)[Penalties](#)[Advanced Seq.](#)

[Max Poly-X:](#)

[Max #N's:](#)

[CG Clamp:](#)

[Max End GC:](#)

[Number To Return:](#)

[5 Prime Junction Overlap:](#)

[Min Left Primer End Distance:](#)

[Max Self Complementarity:](#)

[TH: Max Self Complementarity:](#)

[Max End Self Complementarity:](#)

[TH: Max End Self Compl.:](#)

[TH: Max Hairpin:](#)

[Max Template Mispriming:](#)

[TH: Max Template Mispriming:](#)

[Max Library Mispriming:](#)

[Primer Must Match 5 Prime:](#)

[Left Primer Acronym:](#)

[Right Primer Acronym:](#)

[Table of thermodynamic parameters:](#)

SantaLucia 1998

[Salt correction formula:](#)

SantaLucia 1998

[Use Thermodynamic Primer Alignment:](#)

☒ Activates Settings Starting with TH:

[Use Thermodynamic Template Alignment:](#)

☐ Activates TH: Settings-VERY SLOW

[Max End Stability:](#)

[3 Prime Junction Overlap:](#)

[Min Right Primer End Distance:](#)

[Max Pair Complementarity:](#)

[TH: Max Pair Complementarity:](#)

[Max Pair End Complementarity:](#)

[TH: Max Pair End Complementarity:](#)

[Pair Max Template Mispriming:](#)

[TH: Pair Max Template Mispriming:](#)

[Pair Max Library Mispriming:](#)

[Primer Must Match 3 Prime:](#)

[Internal Oligo Acronym:](#)

[Primer Name Spacer:](#)

Product Tm

[Min:](#)

[Opt:](#)

[Max:](#)

☒ [Show Secondary Structures](#)

Primer3Plus

pick primers from a DNA sequence

[More...](#)[Source Code](#)[Help](#)[About](#)

[Load server settings:](#) Default

Activate Settings

Task: generic

Select primer pairs to detect the given template sequence. Optionally targets and included/excluded regions can be specified.

Pick Primers

Reset Default

[Main](#)[General Settings](#)[Advanced Settings](#)[Internal Oligo](#)[Penalties](#)[Advanced Seq.](#)[Results](#)

☐ Select all Primers

Send Selected Primers to Primer3Manager

Go to Primer3Manager

First Primer Pair

Previous Primer Pair

Next Primer Pair

Last Primer Pair

☒ Pair 1: gapdh

Left Primer 1: TCCTCCGGGTGATGCTTTTC

[Start:](#) 172 [Length:](#) 20 bp [Tm:](#) 60.0 C [B:](#) 94.722 % [GC:](#) 55.0 % [Any:](#) 0.0 [End:](#) 0.0 [TB:](#) 7.0 [HP:](#) 0.0 [3' Stab:](#) 2.3 [Penalty:](#) 0.035

Right Primer 1: AGTGATGGCATGGACTGTGG

[Start:](#) 723 [Length:](#) 20 bp [Tm:](#) 60.0 C [B:](#) 94.655 % [GC:](#) 55.0 % [Any:](#) 3.8 [End:](#) 0.0 [TB:](#) 8.0 [HP:](#) 0.0 [3' Stab:](#) 4.2 [Penalty:](#) 0.035

[Self Any Secondary Structure:](#)

Tm: 3.8°C dG: -5919 cal/mol dH: -44200 cal/mol dS: -123 cal/mol*K
5' AGTGATGGCATGGACTGTGG 3'
 ||| |||
3' GGTGTCAGGTACGGTAGTGA 5'

Pair: [Product Size:](#) 552 bp [Tm:](#) 88.5 C [Any:](#) 0.0 [End:](#) 0.0 [TB:](#) 15.0 [Penalty:](#) 0.070

First Primer Pair

Previous Primer Pair

Next Primer Pair

Last Primer Pair

1	GTCCGGATGC	TGCGCCTGCG	GTAGAGCGGC	CGCCATGTTG	CAACCGGGAA
51	GGAAATGAAT	GGGCAGCCGT	TAGGAAAGCC	TGCCGGTGAC	TAACCCTGCG
101	CTCCTGCCTC	GATGGGTGGA	GTCGCGTGTG	GCGGGGAAGT	CAGGTGGAGC
151	GAGGCTAGCT	GGCCCGATTT	CTCCTCCGGG	TGATGCTTTT	CCTAGATTAT

Left Primer 6: ATCACTGCCACCCAGAAGAC

Start: 718 Length: 20 bp Tm: 59.7 C B: 93.949 % GC: 55.0 % Any: 0.0 End: 0.0 TB: 7.0 HP: 44.6 3' Stab: 3.0 Penalty: 0.326

Hairpin Secondary Structure:

Tm: 44.6°C dG: -536 cal/mol dH: -22300 cal/mol dS: -70 cal/mol*K
5' ATCACTGCC
||| A
3' CAGAAGACCC

Right Primer 6: ACATGGCAACTGTGAGGAGG

Start: 1308 Length: 20 bp Tm: 60.0 C B: 94.526 % GC: 55.0 % Any: 0.0 End: 0.0 TB: 7.0 HP: 37.6 3' Stab: 4.3 Penalty: 0.037

Hairpin Secondary Structure:

Tm: 37.6°C dG: -24 cal/mol dH: -12300 cal/mol dS: -40 cal/mol*K
5' ACATGGC
|
3' GGAGGAGTGTCAA

Pair: Product Size: 591 bp Tm: 91.6 C Any: 10.8 End: 0.0 TB: 14.0 Penalty: 0.364

Compl Any Secondary Structure:

Tm: 10.8°C dG: -5510 cal/mol dH: -61900 cal/mol dS: -182 cal/mol*K
5' ATCAC---TGCCACCCAGAAGAC 3'
||||| |||||
3' GGAGGAGTGTCAACGGTACA 5'

First Primer Pair Previous Primer Pair Next Primer Pair Last Primer Pair

1	GTCCGGATGC	TGCGCCTGCG	GTAGAGCGGC	CGCCATGTTG	CAACCGGGAA
51	GGAAATGAAT	GGGCAGCCGT	TAGGAAAGCC	TGCCGGTGAC	TAACCCTGCG
101	CTCCTGCCTC	GATGGGTGGA	GTCGCGTGTG	GCGGGGAAGT	CAGGTGGAGC
151	GAGGCTAGCT	GGCCCGATTT	CTCCTCCGGG	TGATGCTTTT	CCTAGATTAT
201	TCTCTGATTT	GGTCGTATTG	GGCGCCTGGT	CACCAGGGCT	GCTTTTAACT
251	CTGGTAAAGT	GGATATTGTT	GCCATCAATG	ACCCCTTCAT	TGACCTCAAC

Primer3Plus

pick primers from a DNA sequence

[More...](#)[Source Code](#)[Help](#)[About](#)

[Load server settings:](#) Default

Task: generic

Select primer pairs to detect the given template sequence. Optionally targets and included/excluded regions can be specified.

[Main](#)[General Settings](#)[Advanced Settings](#)[Internal Oligo](#)[Penalties](#)[Advanced Seq.](#)[Results](#)

[Sequence Id:](#) gapdh

[Paste template sequence below](#) or upload sequence file: No file chosen

```
GTCCGGATGCTGCGCCTGCGGTAGAGCGGCCGCCATGTTGCAACCGGGAAGGAATGAATGGGCAGCCGTTAGGAAAGCCTGCCGGTGAC
TAACCCCTGCGCTCCTGCCTCGATGGGTGGAATCGCGTGTGGCGGGGAAAGTCAGGTGGAGCGAGGC TAGCTGGCCCGATTCTCTCCGGG
TGATGCTTTTCTAGATTATTCTCTGATTTGGTGTGATTGGGCGCCTGGTCACAGGGCTGCTTTAACTCTGGTAAAGTGGATATTGTT
GCCATCAATGACCCCTTCATTGACCTCAACTACATGGTTTACATGTTCCAATATGATTCCACCCATGGCAAATTCATGGCACCGTCAAG
GCTGAGAACGGGAAGCTTGTCAATGAAATCCCATCACCATCTTCCAGGAGCGAGATCCCTCCAAATCAAGTGGGGCGATGCTGGC
GCTGAGTACGTCGTGGAGTCCACTGGCGTCTTACCACCATGGAGAAGGCTGGGGCTCATTGACGGGGGGAGCCAAAAGGGTCATCATC
TCTGCCCCCTCTGCTGATGCCCCCATGTTCTGTCATGGGTGTGAACCATGAGAAATGACAAACAGCCTCAAGATCATCAGCAATGCCTCC
TGACCAACCAACTGCTTAGCACCCCTGGCCAAGGTATCCATGACAACCTTGGTATCGTGGAAAGGACTCATGACCACAGTCCATGCCATC
ACTGCCACCCAGAAAGACTGTGGATGGCCCCCTCCGGGAAACTGTGGCGTGATGGCCGCGGGGCTCTCCAGAACATCATCCCTGCCTCTACT
GGCGCTGCCAAGGCTGTGGGCAAGGTATCCCTGAGCTGAACGGGAAGCTCACTGGCATGGCCTTCCGTGTCCCACTGCCAACGTGTCA
GTGGTGGACCTGACCTGCCGTCTAGA[AAAACCTGCCAAATATGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGGCGTCGGAGGGCCCCCTCAA
GGGCATCCTGGGCTACACTGAGCACCAGGTGGTCTCTCTGACTTCAACAGCGACACCCACTCTCCACCTTTGACGCTGGGGCTGGCAT
```

Mark selected region: < Excluded > [Target] { Included } Regions from Seq.

[Excluded Regions:](#) < >

[Targets:](#) [927,318]

[Included Region:](#) { }

[Primer overlap positions:](#) -

[Pair OK Region List:](#)

☒ [Pick left primer](#)☐ [Pick hybridization probe](#)☒ [Pick right primer](#)

or use [left primer](#) below.

(internal oligo) or use [oligo](#) below.

or use [right primer](#)


```

351  CACCGTCAAG  GCTGAGAACG  GGAAGCTTGT  CATCAATGGA  AATCCCATCA
401  CCATCTTCCA  GGAGCGAGAT  CCCTCCAAAA  TCAAGTGGGG  CGATGCTGGC
451  GCTGAGTACG  TCGTGGAGTC  CACTGGCGTC  TTCACCACCA  TGGAGAAGGC
501  TGGGGCTCAT  TTGCAGGGGG  GAGCCAAAAG  GGTTCATCATC  TCTGCCCCCT
551  CTGCTGATGC  CCCCATGTTC  GTCATGGGTG  TGAACCATGA  GAAGTATGAC
601  AACAGCCTCA  AGATCATCAG  CAATGCCTCC  TGCACCACCA  ACTGCTTAGC
651  ACCCCTGGCC  AAGGTCATCC  ATGACAACCT  TGGTATCGTG  GAAGGACTCA
701  TGACCACAGT  CCATGCCATC  ACTGCCACCC  AGAAGACTGT  GGATGGCCCC
751  TCCGGGAAC  TGTGGCGTGA  TGGCCGCGGG  GCTCTCCAGA  ACATCATCCC
801  TGCCTCTACT  GGCGCTGCCA  AGGCTGTGGG  CAAGGTCATC  CCTGAGCTGA
851  ACGGGAAGCT  CACTGGCATG  GCCTTCCGTG  TCCCCACTGC  CAACGTGTCA
901  GTGGTGGACC  TGACCTGCCG  TCTAGAAAAA  CCTGCCAAAT  ATGATGACAT
951  CAAGAAGGTG  GTGAAGCAGG  CGTCGGAGGG  CCCCCTCAAG  GGCATCCTGG
1001  GCTACACTGA  GCACCAGGTG  GTCTCCTCTG  ACTTCAACAG  CGACACCCAC
1051  TCCTCCACCT  TTGACGCTGG  GGCTGGCATT  GCCCTCAACG  ACCACTTTGT
1101  CAAGCTCATT  TCCTGGTATG  ACAACGAATT  TGGCTACAGC  AACAGGGTGG
1151  TGGACCTCAT  GGCCCACATG  GCCTCCAAGG  AGTAAGACCC  CTGGACCACC
1201  AGCCCCAGCA  AGAGCACAAG  AGGAAGAGAG  AGACCCTCAC  TGCTGGGGAG
1251  TCCCTGCCAC  ACTCAGTCCC  CCACCACACT  GAATCTCCCC  TCCTCAGAGT
1301  TGCCATGTAG  ACCCCTTGAA  GAGGGGAGGG  GCCTAGGGAG  CCGCACCTTG
1351  TCATGTACCA  TCAATAAAGT  ACCCTGTGCT  CAACCA

```

Link to the results (valid 3 days): <https://www.primer3plus.com/index.html?UUID=52c5c2e6-1480-4eba-a42e-6a157ca52598>

Statistics:	
Left Primer:	considered 4160, GC content failed 2577, GC clamp failed 285, low tm 513, high tm 291, high hairpin stability 1, long poly-x seq 2, ok 481
Right Primer:	considered 569, GC content failed 342, GC clamp failed 38, low tm 78, high tm 36, high hairpin stability 2, ok 71
Primer Pair:	considered 815, unacceptable product size 796, primer in pair overlaps a primer in a better pair 346, ok 19

Primer-BLAST

A tool for finding specific primers

Finding primers specific to your PCR template (using Primer3 and BLAST).

Primers for target on one template

Primers common for a group of sequences

PCR Template

Enter accession, gi, or FASTA sequence (A refseq record is preferred) ?

Clear

Or, upload FASTA file

Choose File

No file chosen

Range ?

Clear

From

To

Forward primer

Reverse primer

Primer Parameters

Use my own forward primer
(5'→3' on plus strand)

CTGCCACCCAGAAGACTGTG

?

Clear

Use my own reverse primer (5'->3' on minus strand)

AGGGGTCTACATGGCAACTG

?

Clear

PCR product size

Min

70

Max

1000

of primers to return

10

Primer melting temperatures
(T_m)

Min

57.0

Opt

60.0

Max

63.0

Max T_m difference

3

?

Primer Location Preference

☐ Prefer primers at 3' side of the template ?

Exon/intron selection

Exon junction span

No preference

?

Exon junction match

Min 5' match

7

Min 3' match

4

Max 3' match

8

Minimal and maximal number of bases that must anneal to exons at the 5' or 3' side of the junction ?

Intron inclusion

☐ Primer pair must be separated by at least one intron on the corresponding genomic DNA ?

Intron length range

Min

Max

Intron inclusion
Intron length range

Minimal and maximal number of bases that must anneal to exons at the 5' or 3' side of the junction ?

☐ Primer pair must be separated by at least one intron on the corresponding genomic DNA ?

Min

Max

1000

10000 ?

Primer Pair Specificity Checking Parameters

Specificity check

☒ Enable search for primer pairs specific to the intended PCR template ?

Search mode

Automatic ?

Database

Refseq mRNA ?

Refseq mRNA

Refseq representative genomes

Genomes for selected eukaryotic organisms (primary assembly only)

core_nt

Refseq RNA (refseq_rna)

Custom (use your own sequence accession, assembly accession, etc.)

nt

Exclude uncultured/environmental sample sequences ?

organism

(Accession, RefSeq ID, taxid, etc.), taxonomy id or select from the suggestion list as you type. ?

Entrez query (optional)

Primer specificity stringency

including

Ignore targets that have 6 or more mismatches to the primer. ?

Max target amplicon size

4000 ?

Allow splice variants

☐ Allow primer to amplify mRNA splice variants (requires refseq mRNA sequence as PCR template input) ?

Get Primers

☐ Show results in a new window ☒ Use new graphic view ?

+ Advanced parameters

FOLLOW NCBI

Primer-BLAST » JOB ID:j4VQCyB3Ld8K4Tfk0oQT1kCfAuRtjBn5bA

Primer-BLAST Results ?

Input PCR template none

[Edit search](#) **NEW**

Specificity of primers Target templates were found in selected database: NCBI Messenger RNA Reference Sequences (Organism limited to Homo sapiens)

Other reports [► Search Summary](#)

— Detailed primer reports

Download primer pairs ▾

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CTGCCACCCAGAAGACTGTG	20	60.60	60.00	3.00	2.00
Reverse primer	AGGGGTCTACATGGCAACTG	20	59.38	55.00	4.00	2.00

Products on target templates

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

product length = 595

Forward primer 1 CTGCCACCCAGAAGACTGTG 20
Template 621 640

Reverse primer 1 AGGGGTCTACATGGCAACTG 20
Template 1215 1196

>NM_001256799.3 Homo sapiens glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), transcript variant 2, mRNA

product length = 595

Forward primer 1 CTGCCACCCAGAAGACTGTG 20
Template 722 741

Reverse primer 1 AGGGGTCTACATGGCAACTG 20



*Believe in
Yourself*