

# DNA 解链温度( $T_m$ ) 不同预测方法的比较

技术方法

张艳春<sup>#</sup>, 屈武斌<sup>#</sup>, 卢一鸣, 周 扬, 张成岗

[摘要] 目的 寻找最优的 DNA 解链温度(  $T_m$  ) 预测方法。方法 使用 12 种  $T_m$  值预测方法计算来自文献中 348 个实测数据的  $T_m$  值, 将每种方法预测值与实验标准值的差值进行四分位法作图, 并计算各方法残差平方和的自然对数, 排序后比较 12 种预测方法的优劣。结果 使用最邻近法并结合 SantaLucia 1998 热力学参数表和 Schildkraut 1965 盐浓度校正公式所预测的  $T_m$  值最接近实测数据。结论 最邻近法是最准确的  $T_m$  值预测方法, 而且当 PCR 引物的 GC 含量越接近于 50% 时, 其预测准确率越高。

[关键词] 解链温度; 最邻近法; 引物; 探针; 热力学

[中图分类号] Q523

[文献标志码] A

[文章编号] 1674-9960(2011)03-0231-05

## A comparison of different melting temperature ( $T_m$ ) prediction methods for DNA

ZHANG Yan-chun<sup>#</sup>, QU Wu-bin<sup>#</sup>, LU Yi-ming, ZHOU Yang, ZHANG Cheng-gang<sup>\*</sup>

(State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China)

<sup>\*</sup> Corresponding author, Tel: 010-66931590; E-mail: zhangcg@bmi.ac.cn

[Abstract] **Objective** To find the optimal method for predicting the melting temperature (  $T_m$  ) of DNA. **Methods** The  $T_m$  value of 348 experiment-derived data from literature was calculated by the 12  $T_m$  prediction methods. The interquartile figure was drawn to show the difference between the predicted  $T_m$  values and the experimental benchmark data set, before the natural logarithm of the sum of square (SSQ) was compared between each prediction method and experiment-derived data. **Results** Our data indicated that the SSQ value obtained by using the "Nearest Neighbor" (NN) model in combination with the thermodynamics table of "SantaLucia 1998" and the salt correction formula of "Schildkraut 1965" was the minimum one among the 12  $T_m$  prediction methods. **Conclusion** The NN model is the most accurate and robust method for  $T_m$  prediction, especially for the primers with a GC content close to 50%.

[Key words] melting temperature; Nearest Neighbor; primer; probe; thermodynamics

解链温度( melting temperature,  $T_m$  )是指双链 DNA 分子在变性过程中, 有 50% 的碱基对变为单链时的温度。现代分子生物学中的许多技术都依赖于解链温度的精确预测, 如 Affymetrix 公司的短探针芯片杂交平台<sup>[1]</sup>、定量 PCR 技术<sup>[2]</sup> 以及多重 PCR 技术等。如果不能准确预测  $T_m$  值, 将导致严重的非特异扩增和较低的杂交效率<sup>[3]</sup>。因此, 在以往半个世纪中已报道了数十种  $T_m$  预测方法。然而, 这

些方法预测的精确度各异, 并且迄今为止, 没有相关的工作对  $T_m$  的计算方法进行系统比较, 导致难以选择最准确的  $T_m$  值计算方法用于研究。为此, 本文以文献报道的实验数据为基础, 对 12 种不同的  $T_m$  值计算方法进行精确性比较, 结果显示最邻近法(同时使用 Breslauer 1986 和 SantaLucia 1998 的热力学参数表和盐浓度校正公式)是最精确的  $T_m$  值预测方法; 同时发现 GC 含量越接近于 50%, 预测准确率越高。

### 1 $T_m$ 值的影响因素

影响  $T_m$  值的因素主要有: ①寡核苷酸长度; ②寡核苷酸中 4 个碱基的排列顺序及各碱基的含量, 尤其是 GC 含量<sup>[4]</sup>; ③生化反应条件, 如底物浓度、pH 值、盐离子浓度等<sup>[5]</sup>。

[基金项目] 国家科技重大专项资助项目(2009ZX09503-002, 2009ZX09301-002, 2009ZX09103-616); 国家自然科学基金资助项目(30900862, 30900830, 30800196); 蛋白质组学国家重点实验室课题(SKLP-K201004, SKLP-O201002)

[作者简介] 张艳春, 女, 硕士研究生, 研究方向为生物化学与分子生物学; 屈武斌, 男, 主要研究方向为生物信息学; #共同第一作者

[作者单位] 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 蛋白质组学国家重点实验室, 北京 100850

[通讯作者] 张成岗, Tel: 010-66931590; E-mail: zhangcg@bmi.ac.cn

2 Tm 值计算方法

2.1 基于序列组成的 Tm 值计算公式

Wallace-Ikatura(为了叙述方便,简称为 WI)公式<sup>[6]</sup>(式 1)是目前使用较为普遍的 Tm 值计算公式,虽然其初衷是用来估计杂交探针的变性温度。

Tm = 2(A + T) + 4(G + C) (1)

Wu 等<sup>[7]</sup>提出了另外一套完全基于序列组成的公式(式 2)。

Tp = 22 + 1.46Ln (2)

式中 Ln = 2(G + C) + (A + T)。

1962 年,Marmur 和 Doty( MD)提出了一个在给定离子浓度下针对较长二聚体的 Tm 值计算公式,并增加了 GC 含量校正系数,即公式 3。Chester 和 Marshak( CM) <sup>[8]</sup>对公式 3 进行了修正,提出了公式 4,其中 n 为碱基对的数目(比序列长度少 1)。

Tm = 64.9 + 41.0(G + C - 16.4) / n (3)

Tm = 69.3 + 0.41(%GC) - 650/n (4)

2.2 基于盐浓度校正的 Tm 值计算公式

Owen 等<sup>[9]</sup>通过观察 log [Na<sup>+</sup>]与 Tm 的趋势曲线,发现不仅 Na<sup>+</sup>对 Tm 值有影响,而且 GC 含量对该曲线有显著影响,遂提出公式 5,增加了对盐浓度的校正。其中,溶液 Na<sup>+</sup>浓度为 50 mmol/L,寡核苷酸浓度为 50 nmol/L,pH 接近 7.0。

Tm = 87.16 + 0.345(%GC) + log [Na<sup>+</sup>] × [20.17 - 0.066(%GC)] (5)

Howley 等<sup>[10]</sup>同时考虑了盐浓度以及碱基对数目对 Tm 值预测的影响,提出公式 6。

Tm = 100.5 + 41.0(G + C - 16.4) / n - 820.0/n + 16.6 × log [Na<sup>+</sup>] (6)

2.3 基于最邻近法的 Tm 值计算公式

近年来使用最多的预测公式是最邻近法( Nearest-Neighbor, NN),见公式 7。最邻近法最早是由 Crothers 等<sup>[11]</sup>首先用于核酸热力学研究的,该模型指出一个给定的碱基对的稳定性依赖于其邻近碱基对的稳定性,其主要思想是将 DNA 分子杂交反应过程的标准焓变和熵变计算转化为由组成 DNA 分子的 4 个碱基 A、C、G、T 所形成的 10 个二聚体( Duplex)的标准焓变和熵变的累加和,再加上 DNA 分子的起始或结束碱基对为 GC、AT 及序列对称性等因素的影响<sup>[12]</sup>。其中,标准焓变 ΔH°和标准熵变 ΔS°都可直接在热力学参数表中查得。目前较广泛使用的热力学参数表有两种,分别是由 Breslauer<sup>[4]</sup>于 1986 年和 SantaLucia<sup>[13]</sup>于 1998 年提出,见表 1 和表 2。

表 1 Breslauer 提出的寡核苷酸最邻近法热力学参数 (1 mol/L NaCl, 37℃)

Sequence	ΔH° ( kcal/mol)	ΔS° ( cal/mol)	ΔG° ( kcal/mol)
AA/TT	-9.1	-24.0	-1.9
AT/TA	-8.6	-23.9	-1.5
TA/AT	-6.0	-16.9	-0.9
CA/GT	-5.8	-12.9	-1.9
GT/CA	-6.5	-17.3	-1.3
CT/GA	-7.8	-20.8	-1.6
GA/CT	-5.6	-13.5	-1.6
CG/GC	-11.9	-27.8	-3.6
GC/CG	-11.1	-26.7	-3.1
GG/CC	-11.1	-26.6	-3.1
Init. w/term. GC	0.0	-16.77	0.98
Init. w/term. AT	0.0	20.13	1.03
Symmetry correction	0.0	-1.34	0.4

注: Init. w: initial weight; term: terminal

表 2 SantLucia 提出的寡核苷酸最邻近法热力学参数 (1 mol/L NaCl, 37℃)

Sequence	ΔH° ( kcal/mol)	ΔS° ( cal/mol)	ΔG° ( kcal/mol)
AA/TT	-7.9	-22.2	-1.00
AT/TA	-7.2	-20.4	-0.88
TA/AT	-7.2	-21.3	-0.58
CA/GT	-8.5	-22.7	-1.45
GT/CA	-8.4	-22.4	-1.44
CT/GA	-7.8	-21.0	-1.28
GA/CT	-8.2	-22.2	-1.30
CG/GC	-10.6	-27.2	-2.17
GC/CG	-9.8	-24.4	-2.24
GG/CC	-8.0	-19.9	-1.84
Init. w/term. GC	0.1	-2.8	0.98
Init. w/term. AT	2.3	4.1	1.03
Symmetry correction	0.0	-1.4	0.00

Tm = ΔH° / ( ΔS° + RlnCt ) (7)

式中,ΔH°和ΔS°分别为杂交反应的标准焓变和熵变,R为气体常数,值为 1.987 cal/kmol,Ct为 DNA 分子的摩尔浓度(当 DNA 分子为非对称序列时,其摩尔浓度取 Ct/4)。该公式的假定是:杂交反应中的两条核酸单链起始浓度相同;核酸杂交反应满足二态模型,即解链和形成双链始终处于动态平衡;杂交后的核酸双链为单一的双螺旋结构。

在热力学中,有“system”和“surroundings”的概念,“system”指反应管中的核酸、缓冲液、离子等一系列化学试剂,“surroundings”指整个反应管中剩余的试剂。热力学反应最终要达到平衡状态,达到平

衡状态的过程就促使“system”向“surroundings”释放热量,这种热量的改变就定义为焓变“ $\Delta H$ ”<sup>[14]</sup>,“ $\Delta H^\circ$ ”指标准焓变,即标准状态下的能量值。试剂中的分子、抗平衡离子结合到寡核苷酸链上,衡量这种效应的指标定义为熵变“ $\Delta S^\circ$ ”<sup>[14]</sup>。通过 $\Delta H^\circ$ 和 $\Delta S^\circ$ 可得出形成 DNA 双链的自由能 $\Delta G^\circ$ 。

以寡核苷酸序列 CGTTGA/TCAACG 为例,在 37℃ 时使用最邻近法计算其  $T_m$  值,利用表 2 的热力学参数,具体计算过程为:

$$\begin{aligned} \Delta H^\circ = & \Delta H^\circ(\text{CG/GC}) + \Delta H^\circ(\text{GT/CA}) + \Delta H^\circ \\ & (\text{TT/AA}) + \Delta H^\circ(\text{TG/AC}) + \Delta H^\circ(\text{GA/CT}) + \Delta H^\circ(\text{init}) + \Delta H^\circ(\text{sym}) = -10.6 \\ & -8.4 -7.9 -8.5 -8.2 +0.1 +2.3 +0 = \\ & -41.2 \text{ kcal/mol} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \Delta S^\circ = & \Delta S^\circ(\text{CG/GC}) + \Delta S^\circ(\text{GT/CA}) + \Delta S^\circ \\ & (\text{TT/AA}) + \Delta S^\circ(\text{TG/AC}) + \Delta S^\circ(\text{GA/CT}) + \Delta S^\circ(\text{init}) + \Delta S^\circ(\text{sym}) = -27.2 -22.4 \\ & -22.2 -22.7 -22.2 -2.8 +4.1 -1.4 = \\ & -116.8 \text{ kcal/mol} \end{aligned}$$

假设寡核苷酸浓度为 0.1 mmol/L,则  $T_m$  值为:

$$T_m = \Delta H^\circ / (\Delta S^\circ + R \ln C_T) = -41200 / (-116.8 + 1.987 \ln(10^{-4})) = 330.27 \text{ K} = 57.12^\circ \text{C}$$

在使用最邻近法计算  $T_m$  值时,盐离子浓度对  $\Delta S$  的影响较大,进而会影响  $T_m$  值的计算,当  $\text{Na}^+$  浓度不是 1 mol/L 时,就需要对其校正。目前广泛使用的针对 NN 的盐浓度校正公式有 3 种,分别来自于 Schildkraut<sup>[12]</sup> (1965)、SantaLucia<sup>[13]</sup> (1998) 和 Owczaray 等<sup>[15]</sup> (2004)。

Schildkraut 于 1965 年提出的盐浓度校正 (correction) 见公式 8,对应的  $T_m$  值计算见公式 9。

$$\text{correction} = -273.5 + 16.6 \times \log [\text{Na}^+] \quad (8)$$

$$T_m = \Delta H / [\Delta S + 1.987 \times \log(C_T/4)] + \text{correction} \quad (9)$$

SantaLucia 于 1998 年提出的盐浓度校正见公式 10,当寡核苷酸为对称序列时, $T_m$  值计算采用公式 11;当寡核苷酸为非对称序列时, $T_m$  值计算采用公式 12。

$$\Delta S = \Delta S + 0.368 \times (n-1) \times \log [\text{Na}^+] \quad (10)$$

$$T_m = \Delta H / (\Delta S + 1.987 \times \log C_T) - 273.15 \quad (11)$$

$$T_m = \Delta H / [\Delta S + 1.987 \times \log(C_T/4)] - 273.15 \quad (12)$$

Owczaray 等于 2004 年提出盐浓度校正公式 13,当寡核苷酸为对称序列时, $T_m$  值计算采用公式 14;当寡核苷酸为非对称序列时, $T_m$  值计算采用公式 15。

$$\begin{aligned} \text{correction} = & (4.29 \times \text{GC}\% - 3.95) \times 10^{-5} \times \log [\text{Na}^+] + \\ & 9.40 \times 10^{-6} \times (\log [\text{Na}^+])^2 \quad (13) \end{aligned}$$

$$T_m = 1 / \{ 1 / [\Delta H / (\Delta S + 1.987 \times \log C_T)] + \text{correction} \} - 273.15 \quad (14)$$

$$T_m = 1 / \{ 1 / (\Delta H / [\Delta S + 1.987 \times \log(C_T/4)]) + \text{correction} \} - 273.15 \quad (15)$$

对于最邻近法计算  $T_m$  值,本文主要研究两种标准焓变、标准熵变热力学参数表 (Breslauer, 1986 和 SantaLucia, 1998) 与 3 种盐浓度校正公式 (Schildkraut, 1965, SantaLucia, 1998 和 Owczaray 等, 2004) 所组成的 6 种最邻近法  $T_m$  值计算方法。为便于比较,分别称为 NN-Bre-Sch、NN-Bre-San、NN-Bre-Owc、NN-San-Sch、NN-San-San、NN-San-Owc。

### 3 不同 $T_m$ 值计算方法的比较

#### 3.1 不同计算方法精确性比较

为了寻找最优的  $T_m$  值计算方法,我们对以上提到的 12 种不同方法进行了比较,所用的标准数据主要来源于 Owczarzy 等 3 篇文献<sup>[15~17]</sup>,共包括 348 个通过实验获得的  $T_m$  值记录,序列长度范围为 16~30 bp,GC 含量范围为 8.3%~80%。前述 12 种计算方法用 Python 脚本实现,分别针对全部 348 个数据计算  $T_m$  值,然后与实验数据逐个进行比较,计算其差值,并取其绝对值,采用四分位作图法 (图 1),以便直观看出不同计算方法的优劣。为了更为准确地分析,对 12 种预测方法的结果与实验数据参考曲线拟合的评价方式计算其残差平方和 (sum of square, SSQ) 的对数 (表 3),可见在 3 类方法中,准确度最差的是基于盐浓度校正的两个公式 (CM, Howley),其  $\ln(\text{SSQ})$  分别为 12.48 和 12.61;而总体上最邻近法比基于序列组成的方法表现较优,但在最邻近法中如果使用 Breslauer (1986) 参数表的方法,其准确度较差。综合而言, $T_m$  预测方法中准确度最高的是利用 SantaLucia (1998) 热力学参数表并同时使用 Schildkraut (1965) 提供的盐浓度校正公式,即 NN-San-Sch 方法,其  $\ln(\text{SSQ})$  为 7.61,在所有 12 种预测方法中为最小 (表 3)。

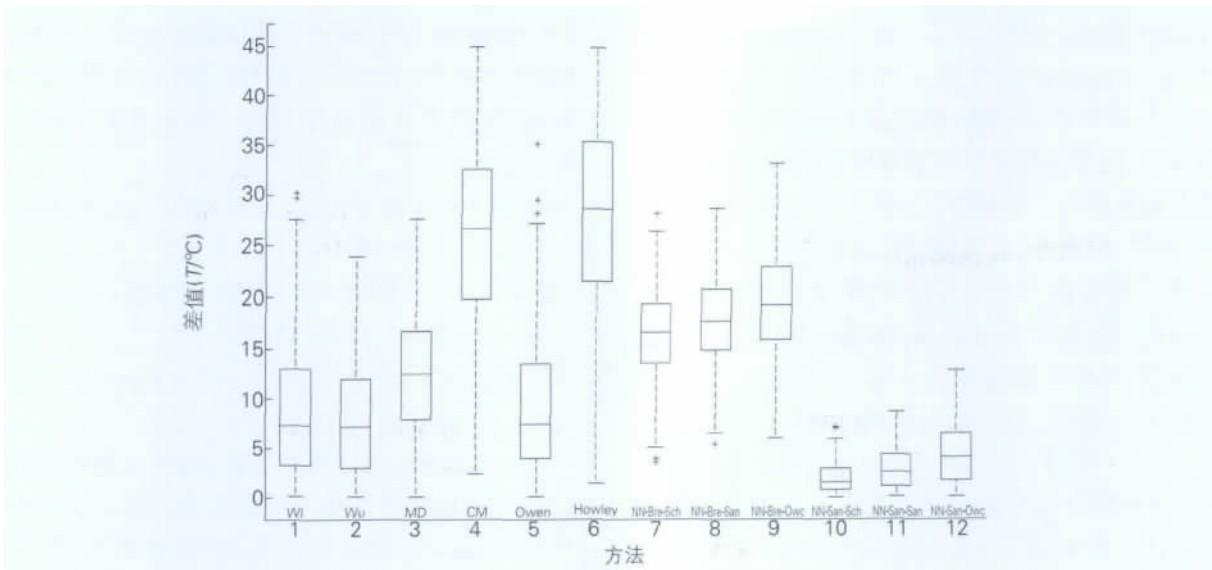


图1 不同  $T_m$  值计算方法比较

表 3 12 种 $T_m$ 预测方法的综合比较		
预测方法	SSQ	ln( SSQ)
WI	43 975	10.69
Wu	34 805	10.46
MD	62 335	11.04
CM	263 107	12.48
Owen	45 380	10.72
Howley	300 217	12.61
NN-Bre-Sch	100 762	11.52
NN-Bre-San	114 809	11.65
NN-Bre-Owc	137 452	11.83
NN-San-Sch	2023	7.61
NN-San-San	4647	8.44
NN-San-Owc	9434	9.15

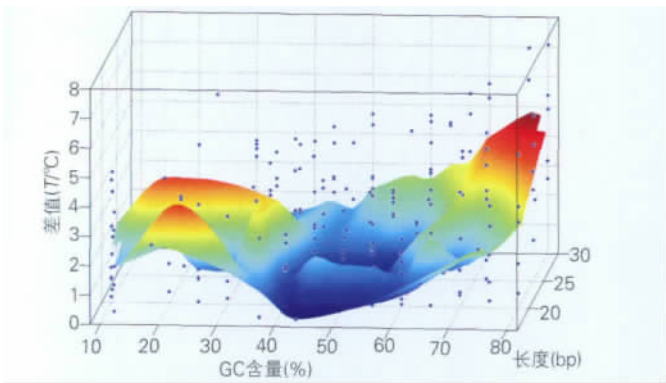


图2 GC 含量对  $T_m$  值预测精度的影响  
GC 含量在 40% ~ 60% 之间的蓝色部分表示误差很小、预测精度高; 而 GC 含量在 10% ~ 40% 和 60% ~ 80% 之间的绿色和红色部分表示误差很大、预测精度低

由于数据来源于 3 篇文献,为了进一步验证以上结论,我们对每篇文献中的数据均使用相同的方法对这 12 种  $T_m$  值预测方法进行了综合比较,同时还对数据按照长度和 GC 含量分类,分别对这 12 种方法进行比较。结果均显示最邻近法是最可靠的  $T_m$  值预测方法,且其中的 NN-San-Sch 又是相对更准确的方法。

3.2 GC 含量对预测精度的影响

由于 GC 含量对  $T_m$  值计算影响较大,尤其在基因芯片探针和引物的设计及评估中,GC 含量是一个非常重要的指标<sup>[18]</sup>,因此进一步分析了 GC 含量对  $T_m$  值预测精度的影响。使用预测精度最准确的 NN-San-Sch 方法所计算获得  $T_m$  数据的三维图(图 2),可见 GC 含量对  $T_m$  值计算影响显著,当 GC 含量越接近 50%,预测精度越高,反之越差。

4 结果

通过以上分析,可见在这 3 类共 12 种  $T_m$  值计算方法中,最邻近法是最可靠的,其中以 NN-San-Sch 为最佳,该方法中的熵、焓数据表是由 SantaLucia 在 1998 年提出的,盐浓度校正公式由 Schildkraut 在 1965 年提出。同时,热力学参数表对预测精度影响显著,而针对最邻近法的盐浓度校正公式对预测精度虽有影响但相对较小。因此,根据上述分析,应配合使用 SantaLucia(1998) 提出的热力学公式及 Schildkraut(1965) 提出的盐浓度校正公式计算  $T_m$  值。并且在引物和芯片探针设计时,应尽量保证其 GC 含量在 40% ~ 60% 之间。

## 5 讨论

本文利用实验所获得的 348 个数据记录为参考标准,对不同的  $T_m$  值计算方法的精确度进行比较,结果显示无论是单纯基于序列组成的方法还是基于盐浓度校正的方法,其预测精度都较差,差值甚至可达  $10^{\circ}\text{C}$  以上。而在相对预测精度较高的最邻近法中,热力学参数表对预测精度影响显著,使用 Breslauer(1986)等<sup>[4]</sup>参数表的方法表现较差。盐浓度校正公式对预测精度虽有影响但相对较小。因此,在杂交探针、PCR 引物特别是多重 PCR 引物设计时,需要预测精度较高的最邻近法,同时选用由 SantaLucia<sup>[13]</sup>在 1998 年提出的热力学参数表和由 Schildkraut<sup>[12]</sup>在 1965 年提出盐浓度校正公式。另外,尽量选择 GC 含量在 40% ~ 60% 之间的引物或者探针,因为在这个范围之外的引物或者探针, $T_m$  预测精度将显著降低,进而影响实验效率。

随着分子生物学技术的不断发展,PCR 技术也在不断向前推进,如多重 PCR、实时 PCR、定量 PCR 等,这就对 PCR 反应中的退火温度要求更为严格。而退火温度一般由  $T_m$  值推测而来,通常情况下,退火温度比  $T_m$  值低  $3^{\circ}\text{C}$  ~  $5^{\circ}\text{C}$ ,因此  $T_m$  值的预测对 PCR 技术、尤其是对多重 PCR 技术的成功极为关键。我们实验室自行设计的 PCR 引物评估软件 (MFEprimer)<sup>[19,20]</sup> 和多重 PCR 引物设计软件 (MPprimer)<sup>[21]</sup> 中均使用了最邻近法来预测引物  $T_m$  值,已为业界广泛使用。

## 【参考文献】

- [1] Pease CT. Insufficiency fractures of the distal tibia [J]. Br J Rheumatol, 1994, 33(11): 1056 - 1059.
- [2] Buck KJ, Harris RA, Sikela JM. A general method for quantitative PCR analysis of mRNA levels for members of gene families: application to GABAA receptor subunits [J]. Biotechniques, 1991, 11(5): 636 - 641.
- [3] Steger G. Thermal denaturation of double-stranded nucleic acids: prediction of temperatures critical for gradient gel electrophoresis and polymerase chain reaction [J]. Nucleic Acids Res, 1994, 22(14): 2760 - 2768.
- [4] Breslauer KJ, Frank R, Blocker H, et al. Predicting DNA duplex stability from the base sequence [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83(11): 3746 - 3750.
- [5] 李金松, 张强, 周士华. 双链 DNA 解链温度的最小二乘支持向量机预测方法 [J]. 计算机工程与应用, 2009, 45(5): 55 - 58.
- [6] Wetmur JG. DNA probes: applications of the principles of nucleic acid hybridization [J]. Crit Rev Biochem Mol Biol, 1991, 26(3-4): 227 - 259.
- [7] Wu DY, Ugozzoli L, Pal BK, et al. The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction [J]. DNA Cell Biol, 1991, 10(3): 233 - 238.
- [8] Chester N, Marshak DR. Dimethyl sulfoxide-mediated primer  $T_m$  reduction: a method for analyzing the role of renaturation temperature in the polymerase chain reaction [J]. Anal Biochem, 1993, 209(2): 284 - 290.
- [9] Owen RJ, Hill LR, Lapage SP. Determination of DNA base compositions from melting profiles in dilute buffers [J]. Biopolymers, 1969, 7(4): 503 - 516.
- [10] Howley PM, Israel MA, Law MF, et al. A rapid method for detecting and mapping homology between heterologous DNAs. Evaluation of polyomavirus genomes [J]. J Biol Chem, 1979, 254(11): 4876 - 4883.
- [11] Crothers DM, Zimm BH. Theory of the melting transition of synthetic oligonucleotides: evaluation of the stacking free energy [J]. J Mol Biol, 1964, 9: 1 - 9.
- [12] Schildkraut C. Dependence of the melting temperature of DNA on salt concentration [J]. Biopolymers, 1965, 3(2): 195 - 208.
- [13] SantaLucia J Jr. A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(4): 1460 - 1465.
- [14] SantaLucia J Jr. Physical principles and visual-OMP software for optimal PCR design [J]. Methods Mol Biol, 2007, 402: 3 - 34.
- [15] Owczarzy R, You Y, Moreira BG, et al. Effects of sodium ions on DNA duplex oligomers: improved predictions of melting temperatures [J]. Biochemistry, 2004, 43(12): 3537 - 3554.
- [16] Owczarzy R, Vallone PM, Gallo FJ, et al. Predicting sequence-dependent melting stability of short duplex DNA oligomers [J]. Biopolymers, 1997, 44(3): 217 - 239.
- [17] Chiu WL, Sze CN, Ma NT, et al. NTDB: Thermodynamic Database for nucleic acids, Version 2.0 [J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31(1): 483 - 485.
- [18] 磨美兰, 甘书钻. 动物传染病研究中 PCR 引物设计的技巧及相关软件介绍 [J]. 广西农业生物科学, 2008, 27(41): 72 - 75.
- [19] Qu W, Shen Z, Zhao D, et al. MFEprimer: multiple factor evaluation of the specificity of PCR primers [J]. Bioinformatics, 2009, 25(2): 276 - 278.
- [20] 屈武斌, 李稚锋, 杭兴宜, 等. TPM: 基于 Taverna 的 PCR 引物设计与评估 workflow 系统 [J]. 四川大学学报 (自然科学版), 2009, 46(6): 1685 - 1690.
- [21] Shen Z, Qu W, Wang W, et al. MPprimer: a program for reliable multiplex PCR primer design [J]. BMC Bioinformatics, 2010, 11: 143.

(姜晓舜 编辑 2011-01-12 收稿)