

## Oligo 使用方法介绍

作为目前最好、最专业的引物设计软件，Oligo 的功能很强，在这里我们介绍它的一些主要功能：如：普通引物对的搜索、测序引物的设计、杂交探针的设计以及评估引物对质量等等。

在正式进行引物设计前，我们首先面临的一个任务就是向 Oligo 程序导入模板序列，根据不同的实验情况，导入模板有三种方法：

1, 直接用键盘输入：

- a, 点击 file 菜单中的 New Sequence 浮动命令，或直接点击工具栏中的 New Sequence 命令，进入序列展示窗口；
- b, 此时即可键入 DNA 序列；
- c, 如果需要的话，Oligo 提供碱基回放功能，在边键入时边读出碱基，防止输入错误。点击 Edit 菜单中的“Readback on”即可。

2, 利用复制和粘贴：当我们序列已经作为 TXT 文件存在或其它 oligo 不能直接 open 的文件格式，如 word 文件.html 格式，这个功能就显得很有用了。在相应文件中复制序列后在序列展示窗口粘贴，oligo 会自动去除非碱基字符。当序列输入或粘贴完成后，点击 Accept/Discard 菜单中的 Accept 浮动命令，即可进入引物设计模式。

3, 如果序列已经保存为 Seq 格式或者 FASTA，GenBank 格式时，oligo 就可以直接打开序列文件。

点击 File 菜单中的“Open”浮动命令，找到所需文件，打开即可。

进入引物设计模式后，oligo 一般会弹出三个窗口，分别是 6-碱基频率窗口，碱基退火温度窗口以及序列内部碱基稳定性窗口，其中的退火温度窗口是我们引物设计的主窗口，其它的两个窗口则在设计过程中起辅助作用，比如 6-碱基频率窗口可以使我们很直观地看到所设计引物在相应物种基因组中的出现频率，如果我们的模板是基因组 DNA 或混合 DNA 时，该信息就显得很有用了，而内部稳定性窗口则可以显示引物的 5' 端稳定性是否稍高于 3' 端等。

一、普通引物对的搜索：

以 Mouse 4E (cDNA 序列) 为例。我们的目的是以 Mouse 4E (2361 bp) 为模板，设计一对引物来扩增出 600-800bp 长的 PCR 产物。

1, 点击“Search”菜单中的“For Primers and Probes”命令，进入引物搜索对话框；

2, 由于我们要设计的是一对 PCR 引物，因此正、负链的复选框都要选上，同时选上 Compatible pairs。

在 Oligo 默认的状态下，对此引物对的要求有：a, 无二聚体；b, 3' 端高度特异，GC 含量有限定，d, 去除错误引发引物等。

3, 剩下的工作是确定上、下游引物的位置及 PCR 产物的长度以及引物设计参数。

①单击：“search Ranges”按钮，弹出“Search Ranges”对话框。输入上游引物的范围：1-2000，下游引物的位置：100-2300；PCR 产物的长度 600-800bp。

②单击“Parameters”按钮进入“Search Parameters”对话框，对话框分三个活页，分别是：不同设定，参数以及更多参数。

③在“普通设定”窗口，为我们提供了对引物非常直观的设置方法，从高到低分六个等级，最后还有一个用户定制选项。

④当我们对引物的各种参数的含义及应该设定多大值并不是特别清楚时，就可以直接设定 Very high/High 等来完成对引物设计参数的设定。

⑤当我们选中“Automatically Change String”后，Oligo 会在引物搜索过程中：如果在高等级设定中无法

找到引物对时自动降低一个定级来进行搜索，知道找到引物对。在设计反向 PCR 引物对时，就选中“Inverse PCR”复选框。

⑥我们还可以让引物的长度可以改变，以适应设定的  $T_m$  值或 PE? (Prime Effitions, 引发效率)。也可以限定所选引物对的最大数目。

⑦在“Parameters”窗口中，实际上需要我们改动的只有引物的长度，根据试验的要求作相应的改变，如 23nt。其他参数就使用 Oligo 的默认值，一般无需改变。在“More Parameters”窗口中，一般也无需作任何改变，直接用 Oligo 的默认值。

4. 点击“确认”—“Ok”进入搜索窗口，再次单击“OK”后，Oligo 自动完成引物对的搜索，并出现一个搜索结果窗口。显示出得到的引物对数目。

5. 点击“Ok”，出现“PrimerPairs”窗口，在窗口中列出了 7 对引物的简单信息，引物位置，产物长度，最佳退火温度及 GC 含量。单击“Sort”按钮，可以按产物长度，最佳退火温度及 GC 含量从小到大或从大到小的顺序排列。

6. 点击任意一对引物，在旁边马上弹出一个叫“PCR”的窗口，在窗口中我们可以看到这对引物在模板中的大概位置，最佳退火温度（该温度可以直接应用于我们实际 PCR 中的第二步退火）。另外还有引物的  $T_m$  值，GC 含量，引发效率，同时还计算出了产物的  $T_m$  值于引物  $T_m$  值的差异以及引物间  $T_m$  值的差异。一般我们尽量保持前者在 20 度以内，后者在 5—6 度以内。点击不同的引物对时，PCR 窗口内容同时作相应的改变。

7. 要想了解引物的详细信息，如二聚体，发卡结构形成情况、组成、 $T_m$  值和错误引发位点等，这时只需点击“Analyze”菜单中的相应命令，就可以分别得到相关信息。例如点击“Duplex Formation”，我们就可以得到上游引物间，下游引物间及上下游引物间形成二聚体的情况。同理，“Hairpin Formation”，“Composition and  $T_m$ ”，“False Priming Sites”等命令就可以显示出相关信息。所有这些分析的结果都有助于我们从 Oligo 搜索得到的多对引物中选择最佳的引物对。

需要说明的是，1，如果一次搜索得到的引物对太多时，我们可以适当提高选定的条件和规定更合适的搜索范围来减少引物对数；2，引物一般尽量不要在 3' 端或是离 3' 端太近的位置形成二聚体，同时二聚体的自有能绝对值尽量小于 10；3，对于错误引发，在普通 PCR 中，如果引发效率在 160 points 以上时，就可能出现杂带，在测序反应中，错误引发效率则应该严格控制在 120 points 以下。

8. Oligo 中每对引物的详细信息可以直接导出为一个文本文件：

首先点击“File”菜单中的“Print/Save Options”，在出现的对话框中的普通设定选中“Selected”；在“Analyze I”中选择需要保存的信息，在“Analyze II”中选中 PCR。

单击确定按钮退出，这时再次点击“File”菜单，Save 浮动命令中的“Data Save as”，选择路径及文件名即可。

二，测序引物的设计：

在 oligo 中，测序引物设计过程与普通引物设计大部分都很相似。

还是以 Mouse 4E 为例，假如我们要在 600—800bp 的位置设计一条测序引物。

Open—Search

在“Search”窗口中，选中“Sequece Primer”，同时去除负链 Search 的选中

在“Search Range”窗口，输入正链的 600—800bp

在“Parameters”中选定 very high，引物长度改为 18bp

结果得到 11 条测序引物，与普通引物同理，根据其详细信息就可以挑选到一条最佳的测序引物。

### 三，探针的设计：

探针的设计与测序引物设计基本相同，只需使“Search”窗口的探针设计选中，改变探针的长度就可以。

### 四，评估引物对：

我们在各种文献中查到的引物，如果直接进行 PCR，往往很难重复别人的实验结果。这时就想到，是不是引物的质量有问题？能不能用软件来对这些问题引物进行一些分析呢？答案是肯定的。

- 1， 点击 File 菜单中的 New 命令；
- 2， 在“Edit New Sequence”的窗口中用键盘输入上游引物；
- 3， 如果该引物的首位置不是 1 的话，可以在“Edit”窗口中输入新的 5’ 端位置数字，如 20；
- 4， 点击 Accept/Discard 菜单的 Accept 命令；
- 5， 如果引物序列长度不同于当前的引物的话，可以从“Change”菜单中改变当前的引物长度；
- 6， 选取当前序列为上游引物（点击“upper”按钮）；
- 7， 从 Edit 菜单中选取“Lower Primer”命令，在 Edit Lower 窗口中输入下游引物的序列；
- 8， 在 Edit 窗口的上角处，输入相应的 5’ 位置；
- 9， 选取“Accept and Quit”命令；  
如果想让程序给出最佳退火温度，在此时的对话框中输入 PCR 产物的长度以及 GC 含量所占百分比，一般哺乳动物的 cDNA 序列中 GC 大约占 44%。
- 10， 点击 OK 就可以在“Analyze”菜单中完成各种分析了。

例子：上游引物 TTGGCAAGCAAACCTTCGATTGA  
下游引物 GTACAAGACAAAGGCAGAATGAG

## Winplas 2.7

Winplas 作为一个质粒绘图的专业软件，功能强大，而且极易上手，它可以绘制出具有发表质量的质粒图谱。可广泛应用于论文、教程的质粒插图，它的特性包括：

- 1， 无论是否知道质粒的原始序列都能绘制质粒图，像 Vector NTI 等综合软件也能绘制质粒图，但有一个前提就是首先得知道质粒得原始序列；
- 2， 可读入各种流行得序列格式文件，能方便地导入各种序列信息；
- 3， 可自动在识别序列中的限制性酶切位点；
- 4， 可对序列进行各种编辑，如：从文件插入序列、置换序列、序列编辑、部分序列删除等
- 5， 绘图功能强大，如：位点标签、任意位置文字插入、生成彩图、线性或环形质粒图谱，可输出到剪贴板或图像文件。

### 一，在不知道序列结构时绘制质粒图：

- 1， 点击 File 菜单中的 New 命令，出现一个 MapView 窗口，同时工具栏中的绘图命令显亮。
- 2， 点击“Insert”菜单中的“Blank Segment”命令，出现一个“Create New Plasmid”对话框。  
—在 Title 栏中填入质粒名称，如 pUC18。  
—在 Base Pairs 栏中填入质粒大小，如 3000。  
—在 Type 单选框中设质粒图谱为线型还是环形。
- 3， 点击 OK 后，在 Map View 窗口就会出现一个圆环，其中有质粒名称及质粒大小。
- 4， 下面的工作就是向圆环上添加文字描述、标记及弧。

①点击“Insert”菜单中的“Text”命令，或直接点击工具栏中的“Text”按钮，出现“Edit Text object”对话框。

- 在“Text”书签中填入“Text”的内容，如：This is PUB 18's map，选择左右对齐及居中。
- 选定相应字符可以加黑、斜体等。
- 在Font 书签中改变字体格式、大小及颜色。
- 文字就出现在 Map View 窗口中，使用鼠标左键，就可以随意拖动其位置。

②点击“Insert”菜单中“Maker”命令或直接点击工具栏中的“Maker”按钮，出现“Edit Maker Object”对话框。

- 此时，在 Maker 书签中的 Base Pair 填入添加 Maker 的位置，如 800。
- 在 Label 栏中，填入 Maker 的名称，如 HindIII。同样可以改变 HindIII 的字体样式：加黑，斜体等。
- 同样在 Font 书签中可以改变字体的样式、大小及颜色。
- 点击 OK，则在圆环 800bp 的相应位置出现 HindIII 的标记。

③点击“Insert”菜单中“Arc”命令，弹出“Edit Arc Object”对话框。

- 在 Arc 书签中的 Base Pair 栏中，填入 Arc 的起始位置，如 1000。
- 在 Length 栏中填入 Arc 的长度，如 400。在 Label 栏中填入 Arc 的名称，如 Amp。
- 在 Arc Style 书签中，首先确定该 Arc 是否有箭头以及箭头的方向。分别对应 none, 5'→3', 3'→5', 及双向。
- 通过 Width 来确定 Arc 的宽度
- 也可以调节箭头与 Arc 径宽度的比值
- 改变填充样式以区分不同的 Arc;改变 Arc 的颜色;同样也可以改变字体的样式、颜色等
- 点击 OK，则在图谱中 1000—1400bp 位置出现一个 Arc，名称叫 Amp。

5.相同的道理，我们可以随意加入其它的文字，标记及弧。下面，我们对初步得到的图谱进行编辑：

对于任何一个项目，如需要修改，我们只需用鼠标左键选中它，并双击，即可出现相应的编辑窗口，如：对于文字及质粒名称、大小，我们可以用鼠标在任意位置拖放。

其它的修饰，点击 Edit 菜单中“Plasmid Options”命令，出现“Plasmid Options”对话框，在此，我们可以改变：

- ①、质粒环的粗细、大小（半径）环的颜色以及背景颜色。
- ②、标记连线的粗细、颜色以及标出 Marker 的位置。
- ③、Arc 名称连线的粗细、颜色、Arc 边缘的颜色。是否标记 Arc 的位置，并且可以把 Arc 的名称放在圆环的外面。
- ④、当我们绘出自己满意的图形后：
  - 可以直接通过打印机打印出来。“File”菜单“Print”命令。
  - 保存为 Winplas 文件，以后可以直接用 Winplas 打开，“File”菜单中“Save as”命令，选则保存位置及文件名即可。
  - 直接复制并到 Word 文档中粘贴。
  - 导出为通用图形文件：“File”菜单“Export Graphic file”我们可以保存为 PCX GIF TIF 等文件。

二，对于从 GeneBank 下载的已知序列及功能区的序列，Winplas 可以根据要求生成质粒图谱。

- 1, 点击“File”菜单中“New”命令。
- 2, 点击“Insert”菜单，“GenBank file”

- 3, 选择要打开的文件: 如 PDR 322 GB\_。
- 4, 点击打开后出现环、质粒名称及大小。
- 5, 此时我们可以像画空白质粒一样添加文字、标记、Arc, 但更重要的是 Winplas 可以直接生成酶切位点和特征区, 方法是: 点击“Sequence”菜单中的“Restriction Enzyme”命令, 出现“Select Restriction Enzyme”对话框, 利用键盘上的 Ctrl 键及鼠标左键选中需要标记的酶, 如果觉得所列的酶太多, 也可以通过酶切位点数目来分类。
- 6, 点击 OK, 则在环上的相应位置出现酶的标记。
- 7, 点击“Sequence”菜单中的“Features”命令, 在“Select Features”对话框中列出所有特征功能区名称、位置、描述等。
- 8, 点击“OK”后, 完成 Features 的标记。
- 9, 这时与绘制空白质粒一样, 我们可以对它进行修饰、编辑并将结果保存或导出。

三, 对于普通的 Sequence 文件或保存成 TXT 格式的序列, Winplas 同样可以生成质粒图, 只是由于普通序列文件不包含功能区的信息, 因此不能自动生成质粒图。

- 1, 点击“File”——new 命令,
- 2, Insert 菜单, “Sequence file”命令, 打开一个普通的序列文件,
- 3, 其后的工作与前面所讲相似, 不再多述。

## Reference Manager 10.0

Reference Manager 是一个专门用来管理书目参考文献的数据库程序。任何需要收集参考文献来做研究或是写论文、书目的人都可以利用它来管理文献、数据。(特别是 Reference Manager 能够快速地从草稿中准备格式化地论文地论文引用文献和参考书目)。

一, 首先利用程序提供的模板数据库 (Sample database) 熟悉如何使用数据库

- 1, 运行 Reference Manager 后, 点击“File”菜单中的“Open Database”命令, 在 Open Reference Manager Database 对话框中, 找到相应的数据库——Sample Database ( Sample.rmd) 打开
- 2, 在出现的 Reference List 窗口中分为上、下两个部分, 上部分为当前激活的 Reference 的详细资料, 下部分是按一定条件排列的参考文献列表, 两部分的大小可以通过拖动中间横线改变。
- 3, 如何设定参考文献清单区

预设的参考文献清单中提供三个字符: Reference ID, Author 以及 Title: 当前您可以设定其他的字符, 并改变其栏宽

- ①在 Tools 菜单中, 选取 Reference List Display 命令, 并出现相应的对话框, 在对话框中列出了当前显示的 3 个字符
- ②当鼠标放在“File Order”上, 此时指针变为方向向下的箭头, 按下鼠标将此列选中。
- ③点击“Insert Col”钮, 在第三栏的前面会插入一个新的字段, 而原来的第三栏被移动到右边。新插入⑧⑨的一栏其 Header 和 Field Type 的默认值为 RefID。
- ④按下此栏的 Field Type 并从下拉的选单中选择 Date Primary。
- ⑤点击 Header 这以列的 Date Primary, 删除 Primary 这个字;
- ⑥点击 OK 存储这些改变, 在后面的提示框中点 Yes 同意复制格式到所有的 List, 这样日期一栏将出现在 List 中。

⑦改变栏宽，只需用鼠标拖动标题间的隔线即可。

### 3. 设定数据库排列：

①如果想按照日期来排序，按一下 Date 标题，参考文献就会按照日期作递增的排列，再按一下 Date 标题则递减排列。

②同理可以按照 ID，作者等来排序；

③当我们拖动 Reference List 右边的卷轴按钮时，在按钮的旁边会提示您目前所在清单的位置。

## 二、建立数据库：

建立自己的数据库时，可以先查询各种不同的资源。Reference Manager 可以直接查询因特网以及检索 ISI Web of Science Pubmed 或数百个 Z39.50 网站（例如学术或公共图书馆目录，国会图书馆等），那么有一个前提就是计算机必须能够连接网络（Internet）。

1， 点击 Reference 菜单中的 Internet Search 命令，在出现的查询窗口中的第一列会出现数据库的查询清单，并且选中“Internet Search”前面的复选框。

2， 在查询窗口的下拉选单中选择 Pubmed；

3， 输入检索条件：

假设您对人类生长激素基因感兴趣（human GH gene）这时在 All Fields 中填入 hGH，

而且想查 2001 年的相关文献，

点击逻辑关系，选 And，Keywords 中填入 mRNA，

4， 点击 Start Search 按钮或按下 F12 键开始查询，

5， 查询完毕，RM 会显示查询状态，包括一共找到多少条文献（此处为 49）

6， 关闭这个对话框，就得到这 49 条文献的列表，

7， 点击 File 菜单中的 Save as，保存文献到一个数据库中。

## 三、输入参考文献/编辑参考文献

利用查询的方法建立数据库可以节省时间，然而有些参考文献可能需要键盘输入。如论文，会议记录等，在 RM 中，输入或编辑参考文献可以使用相同的步骤：

1， 点击“Reference”菜单中的 New 命令，出现一个“Reference Edit”窗口，

2， 点击 Reference Edit 窗口上方的 Reference Type 字段，从出现的下拉选单中选择一种“Reference Type”。例如，选择 Journal 可以输入期刊文章。这时 Ref ID 会自动按照输入到数据库中的 References 顺序自动产生。

3， 在 Title 一栏输入篇名，使用 Font 工具栏可以增设斜体和拉丁字。

4， 在 Author: Primary 一栏，输入第一作者的姓氏，回车后继续输入第二，三.....作者；

5， 使用 Pub Date，设定年代或完整日期两种格式；

6， 使用 Web/ORL, Link to PDF, Link to Full-text, Related Records, Images 这些可以储存网页或其它储存在计算机中的文件连接；

7， 使用 Notes 一栏可以存储个人的注释或任何有关该笔参考文献的资料；

8， 使用 Keywords 一栏键入任意关键词，在检索您的 Database 时，关键词一栏可以协助您快速地找到数据；

9， 同样的道理，输入其他的相关信息；

10， 在 Abstract 一栏种，可以输入任意长度的摘要；

11， 储存该笔文献，选择 File 菜单下的 Save 命令，再将该编辑窗口关闭，回到 Reference List 窗口，即可看到刚输入的参考文献。

对于任何需要编辑的文献，在文献列表中双击该文献，即出现编辑窗口，其他步骤与新建文献相同。

#### 四，数据库中查询文献

查询 RM Database 以找到特定的参考文献做编辑或插入到论文的相关位置，此时您可以建立一个自定义的检索策略，来查询每个参考文献中的字段，或在限定在某个特定字段中查询。在建立检索策略后，可以利用不同的名称储存下来以便后来使用。

检索策略包括下列项目：

Field: 选择一个字段或一组字段，如作者；

Parameter: 输入的单字或词组；

Connector: 布尔逻辑 (And, Or 或 Not)

- 1, 打开一个目标数据库，点击 Reference 菜单中的“Search Reference”命令，出现检索窗口，Internet Search 前的方格是空白的；
- 2, 从下拉选单中选择一个数据库进行查询，如果有一个以上的数据库则可以选择 All Database；
- 3, 将鼠标移到 Field 下键入 K，找到 Keywords 一栏；
- 4, 在 Parameter 一栏键入 Dolphin，此时 RM 会出现一个动态的关键词窗口，您也可以在此找到与 Dolphin 相关的词或词组，对其双击左键即可选中；
- 5, 在下一列中的 AND，键入 Behavior 回车；
- 6, 再一列中 AND，Year: 1995—1996；
- 7, 按下 Search 按钮或 F12 键，开始检索；
- 8, 此时在 Results 一栏中会显示每个检索条件的资料笔数，要浏览检索结果，按一下任一列的 Results 一栏上的数字。

储存检索策略：

- 1, 从 Reference 菜单中选择 Search Reference 开启检索窗口，输入前面所建立的检索策略；
- 2, 点击窗口的右上方的 Strategy Files 按钮，出现 Search Strategy 对话框；
- 3, 按下 Save 并输入这个检索策略的名称，如 Dolphin，然后按下 OK 储存这个检索策略；
- 4, 同样在此窗口，选中需要的策略名称，选择 Load 就可以调出此策略，点选 Close 回到查询窗口。

#### 五，建立书目

建立书目分两个步骤：首先在 Word 文件中插入参考文献；然后格式化 Word 文件（插有参考文献）为特定格式的书目；

RM10.0 在安装后会在微软的 Word 程序中插入相应的工具栏，这些整合的工具让您可以方便地查询数据库，并快速地在文字处理器中插入参考书目及最终定稿。

- 1, 运行 RM，同时开启 Word，新建一个 Word 文档；  
检查 Word 工具栏，应该可以看到许多不同图示的 Rm 工具列，每一个图示都代表了不同的 RM 特殊功能。如果没有找到该工具栏，选择“视图”菜单中的“工具栏”，选中 Reference Manager10，其工具栏就可以出现，将鼠标移到任一图标上并停留片刻，会出现黄色的小标识告知您该图标的功能；
- 2, 开启 Reference Manager 数据库，其中包含有您所要引用的文献；
- 3, 在 Word 文档中，将鼠标定位到要插入参考文献的位置；
- 4, 找到工具栏中“Insert Citation”图标并点击，出现“Reference Manager Find Citation”对话框；
- 5, 在“Search for”后面的空白区键入 dolphin，1996（中间空格相隔），点击 Perform Search 查询；
- 6, 双击需要插入的文献即可在 Word 中插入此文献；

- 7, 还有一种方法是, 先运行 RM, 在 RM 数据中使用检索策略找到文献, 并将需要插入的一篇或几篇文献前的小方格打勾;
- 8, 回到 Word 文档中, 把指针放在插入的位置;
- 9, 点击工具栏中的第二个图标, “Insert Marked References “即可。

格式化 Word 文档, 建立书目, 即如何将文章格式化, 并改变其编排格式;

- 1, 在 RM10 工具栏中点选 “Generate Bibliography, 出现相应的对话框;
- 2, 在 Output Style 区域按下【...】浏览功能选中 Reference Manager 10 Styles 目录下的 Nature;
- 3, 还可以调整字型, 字号, 参考书目标题, 标号顺序, 空格等字段,
- 4, 点击 Ok, 您的草稿中的引文数据就会自动转换为 Nature 的论文引用格式。

## DNASTAR 5.0

DNASTAR 也叫 Lasergene, 是基于兼容机和苹果机平台的序列分析软件, 功能多且很容易上手, 主要有 7 个组件组成。

### 一, Editseq

Editseq 是 DNASTAR 的一个基本组件, 许多 word 文档和 TXT 格式的 DNA/蛋白质序列需要首先用 Editseq 来转换成 DNASTAR 所能识别的文件。它能迅速、正确地输入、修改 DNA 和蛋白质序列, 同时能读取大部分地序列格式, 如 FASTA、Genebank、ABI、GCG 等。序列被打开后, Editseq 能用标准或指定的遗传密码进行翻译或反翻译, 寻找开放阅读框等。

#### 1, 打开已有序列

由 File 菜单, 选择 Open, 打开文件夹 “Demo Sequence” 中的 tethis21.seq

打开一个序列后, 在出现的窗口中分为三部分, 上边一部分为序列, 中间为评论, 底部则是序列的注释。

#### 2, 寻找开放读框

“Search” 菜单中, 选择 Find ORF 命令——单击 Find Next, 寻找第一个 ORF, 继续点击 Find Next, 直到把 ORF 位置定在 232-504, ORF 的坐标会出现在 Editseq 的窗口顶端。

#### 3, DNA 序列翻译

①选定 ORF, 从 Goodies 菜单中选择 Translate DNA 命令

②翻译出来的蛋白质序列出现在一个新的未命名的窗口中, 此时, 它是使用标准的遗传密码翻译的。

#### 4, 使用其它的遗传密码

根据序列的来源, 可以选择使用非标准的遗传密码进行翻译

①从 Goodies 菜单中, 选择 Genetic Codes 命令, 出现选择 Code 的对话框

②单击 Ciliate Macronuclear, 实现遗传密码的转换

③可以将遗传密码转换为其它类型, 当然, 您也可以使用 Edit Selected Code 来对遗传密码进行编辑

#### 5, 序列的反向互补及反向转换

①选定序列

②从 Goodies 菜单中, 选反向互补序列 (Reverse Complement) 或者把序列颠倒过来 (Reverse Sequence) 命令。

#### 6, 序列的保存为 Editseq 文件

File 菜单——Save, 选定保存位置及文件名, 单击保存。

#### 7, 以 GenBank 或 GCG 格式保存

File 菜单——Export 命令, 选定保存位置, 为序列选格式, 给序列命名, 单击保存。

## 二, GeneQuest

GeneQuest 可以帮助您发现和注释 DNA 序列中的基因, 并帮助您操作生物学所关心的 DNA 其它功能区, 包括 ORFS、拼接点连接、转录因子结合位点、重复序列、限制性酶切位点等。序列的 feature 可以以图形的形式展示出来, 您也可以在序列上注解任何您发现的 feature。

### 1, 打开文件进行分析

- ①点击 File 菜单中 Open 命令来打开一个 GeneQuest 文件或直接打开一个序列文件;
- ②点击 Analysis 菜单中, “Show Available Methods” 命令, 此时在窗口的左侧打开方法列表;
- ③点击 More Methods 右边的下拉菜单就可以发现 GeneQuest 提供的所有分析方法  
例如: Repeats——Direct repeats 就是寻找正向重复序列;
- ④点击该方法, 则在下面的窗口出现该方法, 同时方法名称左边有一个三角形;
- ⑤点击此三角形, 下拉两个选项;
- ⑥将它们拉到右侧窗口的某一位置, 则展示出该分析的结果, 同时, 在方法的左侧出现一个数字, 该数字表示应用的项数。

### 2, 方法参数的改变

双击右侧窗口的任何一个结果, 将打开相应方法的参数对话框, 此时即可改变相应参数, 例如: 我们改变最少重复序列为 20bp。

### 注释 Features

当您使用 GeneBank 输入序列时, 序列中标注的 Features 会自动转换为图形命令显示在方法窗口中。

### 3, GeneQuest 也允许您为 DNA 序列制作新的 Features。

- ①单击窗口最左侧的箭头图标;
- ②选定一个 DNA 区域;
- ③从 sites and Features 菜单中的 “New Features” 命令, 在出现的 Editor 对话框中就可以输入 Title 等信息, 如: “Infor region”;
- ④点击 Description 按钮, 在 Note 中作标注;
- ⑤点击 Style 按钮, 选择字型、大小、颜色和您喜欢的图形用于新建的 feature;
- ⑥点击 OK 关闭编辑窗口, 一个图形化展示的 “Infor region” 就会出现在分析窗口的底部。

## 三, MaqDraw

MaqDraw 用来展示酶切图及序列的 feature、翻译结果; 您可以按照位置、酶切频率来排列您的酶切位点, 使用酶切位点过滤器来筛选酶; MaqDraw 还能规划酶切位点和克隆实验, 产生详细的实验过程和结果; 具体使用这里不详解, 您使用到的时候, 如果不明白, 可以查看软件的帮助文件。

## 四, MegAlign

MegAlign 可以进行 DNA 和蛋白质序列的配对和多序列比较。其中多序列比较可以在 worktable 中进行查看和编辑, 也可以制作进化树, 并且有关序列进化距离的数据和残基替代可以容易制作成表格。

- 1, 配对比较, 可以比较任何两个选定的序列的相似性。如果是 DNA 序列, 可以用的方法有: Wilbar—Lipman、Dotplot 等方法

由于我们推荐使用 Vector NTI 中的 AllignX 作配对比较, 所以具体使用这里不详述。

### 2, 多序列比较

为了在 MegAlign 中进行多序列比较, 我们选择一个含有 14 个相关的钙调蛋白质序列文件进行操作。

- ①File 菜单, Open “Demo MegAlign” 中的 “Calmodulin Alignment”, 在序列比较中, 有两种方法, Clustal 和 Iotun Hein 方法, 如果有关序列的相关背景未知, 可以选择 Clustal。这里我们用 Iotun Hein 方法;

- ②Align 菜单中选择 Iotun Hein Method;
- ③完成后, 窗口会显示比较结果;
- ④点击“View”菜单中的“Sequence Distance”查看序列的差别和相似性;
- ⑤点击“View”菜单中的“phylogenetic Tree”命令打开进化树展示窗口, 通过左侧的工具栏, 改变树的样式, 点击 File—Save as 命令;
- ⑥保存进化树为 dnd 文件, 再用 Treeview 程序来编辑、打印和引用。

## 五, Primer Select

Primer Select 能帮助您设计 PCR、测序和杂交实验中所使用的引物和探针。引物设计我们强烈推荐使用三剑客中的 Oligo, 因此, 此处不再详述。

## 六, Protean

Protean 可以使用各种方法分析、预测蛋白质结构, 并以图形化的方式展示出来。再 Protean 中, 可以预测蛋白质的二级结构、亲水区和疏水区、抗原决定簇、抗原位点、蛋白质骨架区的柔韧性等, 而且对每项预测都提供了几种不同的方法, 具体的操作方法(如应用方法、改变参数)与 GeneQuest 及其相似, 这里不再详述。

需要特别介绍的是, Protean 的二级结构模拟和滴定曲线的展示

1, Protean 能够展示如螺旋轮、螺旋网和 Beta 片层等基本元件的二级结构。

例如: 我们选定一个阿尔发区域后, 就能以螺旋轮展示其二级结构。

- a, 单击窗口左侧工具栏种的箭头工具;
- b, 点击分析结果中的一个阿尔发区域;
- c, 点击“Analysis”菜单中的“Medet Structure”选择 Helrcal Wheel 就回出现二级结构预测图。

2, 展示滴定曲线

点击“Analysis”菜单中的“Titration Curve”即打开序列的滴定曲线窗口, 同时 Protean 会在等电点处加一个蓝色的交叉线, 显示 PH 和所带电荷。

## 七, Seqman

Seqman 不仅能够将成千上万个序列装配成 Contigs, 而且在装配前, 可以修整质量差的序列以及从您的序列中清除污染数据。

装配过程从序列输入开始, 输入的序列可以是自动测序议输出的, 也可以是文本格式或 DNASTar 序列格式。

- 1, 点击“File”菜单下的 NEW 命令, 出现两个窗口, 左侧窗口为序列添加区, 右侧窗口展示所加入序列。
- 2, 点击“Add Sequence”按钮, 出现一个挑选 Sequence 的窗口, 此时, 找到序列所在目录后, 利用“Add”、“Remove”、“Add all”加入需要拼接的序列, 点击“Done”按钮。
- 3, 所选序列就出现在左边窗口的下部分, 点击“Assemble”按钮。
- 4, 一段时间后, 左侧窗口显示拼接报告, 右边窗口上也为装配好的一致序列, 下边为所有连续的序列, 在例子中, 14 个序列装配成为单一的 contig。
- 5, 点击“Contig I”, 将其选中, 点击“Contig”菜单中“Contig Infor”、“Alignment view”和“Strategy view”命令, 来查看 contig 的详细信息。
- 6, 例如, 点击“Strategy view”就可以查看其中矛盾, 碱基的数量和序列的覆盖程度, 在这个窗口中图形化地显示了每个片断在 contig 中的位置及方向。

去除矛盾碱基和缺口

- 1, 在 Contig 菜单中, 点击 “Alignment view” 命令, 打开 Alignment view 窗口, 上边为一致序列, 下边为连续序列。
- 2, 在每个样品的前面有一个三角形, 点击此三角形就会显示其测序图谱, 根据这些测序图谱, 我们就可以去除矛盾碱基, 修复缺口 (举例子)

## Prism 3.02

Prism 具有三个方面的功能, 它们分别是: 非线性回归分析、基础生物统计和科学绘图。该程序在分析过程能自动误差校对, 并能从重复估计值中计算出误差值, 能通过简单的一步法完成非线性回归分析。在分析过程中能直接从列表中选择统计方程式。具有自动更新的功能。能在数据输入的过程中修复错误, 自动更新结果、图标和版面。

### 一, 开始 Prism

- 1, 当您运行 Prism 后, 首先看到的是一个欢迎界面, 通过此窗口来选择是新建一个新的项目, 还是打开一个已经存在的项目。
- 2, 选择产生一个新的项目, 并独立工作。

在您正式使用 Prism 之前, 我们推荐您通过选择 Prism Assistant 来产生一个新的项目。这样, 在运行软件的过程中会有一个帮助窗口在屏幕的上方, 来指引您的操作。当然, 如果您对 Prism 有了比较详细的了解后, 也可以选择通过输入模板文件来开始项目, 这样程序就可以根据模板来自动对数据进行分析 and 绘图。

- 3, 在该欢迎窗口的下半部分则是提供一些对数据表格的格式选择。在 X Column 项中选择 numbers, 在 Clumms 项中选择了 replicates (triplicates)。
- 4, 点击 OK 按钮, 推出欢迎窗口, 这时, Prism 会弹出一个空的数据表格, 在表格的最上端出现 5 个黄色的制表符。这些制表符代表了每个 Prism 项目的 5 个组成部分, 而 Data 制表符在最上面, 是因为您正位于 “数据处理” 这一部分。

Date——输入或导出数据。

Results——展示统计分析结果, 调节曲线图标以及数据处理 (比如数据转换)。

Graphs——展示并编辑 Prism 自动生成的曲线图, 生成附加图标等。

Layout——对在同一页面上的多个曲线图、制图、表格和文本进行排列。

Notes——记录实验的流程和结论等。

- 5, 同时, 在 Prism 窗口的左侧面板的项目浏览窗口上就能找到者 5 个文件夹制表符。此时, 项目已经具有了一个空的数据表格、一个空曲线图、空版面及一个空的注释页面与之关联。

### 二, 导入数据

- 1, 在 X 轴的第一行中 (row1) 定位一个输入点;
- 2, 点击下拉菜单中的 “文件 (File)” 菜单, 并选择 “导入”;
- 3, 在 Prism 3 文件夹中选择文件: tutorial.txt;
- 4, 在接下来的对话框 “Formant Date Object” 中, 会给出多个选择。这里, 我们不做任何修改, 保持默认值, 最后点击 “Import” 按钮;
- 5, 于是就出现如下的一个数据表格:

如果出现空的单元格, 就表明其中出现了数据缺失。Prism 将对缺失的数据相应做最适处理; 您可以改变 Prism 中使用小数的位数, 点击 “Change” 按钮来选择数字格式 (Number Format); Prism 能自动地把这个数据表格命名为 “tutorial” (与导入时数据文件地名字相同)。

### 三，制作一个曲线图

点击黄色的 Graphs 制表符就可以看到 Prism 自动生成的曲线图。此时，无需使用特殊的命令来计算误差，Prism 会自动地完成对重复数据地均衡，以及计算平均值和平均值的标准方差等。在工具栏中的最上一排的右侧有一个按钮，是用来向 Prism 图表中输入其它程序所产生的对象。

### 四，定制图表

- 1, 偏移轴线：双击需要移动的轴线，从而得到一个轴线对话框，下移框架和轴线列表来对 X 和 Y 轴移动。
- 2, 加粗轴线：点击 Change 按钮，选择轴线和框架的粗细 ‘
- 3, 改变标记：双击需要修改的标记，得到一个格式化标记和线段的对话框，修改标记的大小和形态。
- 4, 改变轴线的编号方式：双击 X 轴弹出一个轴线对话框，点击 Auto 复选框取消选定。然后，改变编号范围和间隔大小，也可以添加次级编号。
- 5, 移动图例：点击 Control 图例来选定它，按住 Shift 键，同时选定 Treated 图例，这样就可以在图表中任意拖动两个图例了。
- 6, 设定图例：点击矩形工具，并在图例周围拖动将图例包围住，就可以对图例进行设定和修改了。
- 7, 添加标题：点击先前自动生成的标题，即可编辑并使之与下面的图表匹配。

### 五，通过数据来调节曲线

- 1, 点击黄色的 date 制表符，回到数据表格，点击 Analysis 按钮，弹出 Analysis date 对话框，浏览所有的选择，可以看到 Prism 提供了哪些分析方式。我们从曲线和衰减方式中选择“非线性衰减方式”。
- 2, 翻转经典方程式列表，选择“One phase exponential decay”，点击 OK，Prism 就会展示一个结果的表格，点击“Interpret”按钮，就可以领会如何评估非线性衰减的结果。
- 3, 点击黄色的 Graphs 制表符，就会发现图表变成了下面的模样：

### 六，拷贝和粘贴到 PowerPoint

直接“Edit”——“Copy”到 PowerPoint 粘贴即可

## Vector NTI 7.1

Vector NTI Suite 是一套功能强大、界面美观而又友好的分子生物学应用软件包。它主要包括四个组件，分别对 DNA、RNA 和蛋白质进行各种分析和操作。

### 一，Vector NTI

作为 Vector NTI Suite 的核心组成部分，它可以在各种分子生物学研究项目的全过程中提供数据组织、编辑和分析支持。

#### (一) 对分子序列的操作

我们以一个 DNA 序列为例，进行一系列的常规分析；最后将此 DNA 序列翻译成氨基酸序列，并对此氨基酸序列进行各种分析。

A, DNA 序列为猪生长激素的 cDNA 序列，长为 761bp。首先使用 Vector NTI 的 Create New 命令将此序列导入到 Vector NTI 的数据库中：

- 1, 第一种方法：如果只知道序列时，点击 Molecule 菜单中的 Create New——Using Sequence Editor (DNA/RNA……)；
- 2, 在出现的“New DNA/RNA Molecule”对话框中，首先在 General 填入导入序列的名称——PGH；
- 3, 在 DNA/RNA Molecule 活页中，选中 Linear DNA, Animal/other Eukaryotes, Replicon Type 中选

Chromosome;

4, Description 中填入: S.Scrofa Growth hormone mRNA;

5, 在 Sequence and Maps 中点击“Edit Sequence”按钮, 将 DNA 序列复制后, 点“Paste”按钮-点“OK”-确认后就可以完成序列导入。

B, 如果是一个从 GenBank 上下载的序列文件, 则: 点击“Molecule”菜单-Open-Molecule files 命令, 找到序列文件, 在 File format 中选中 GenBank Files; 点击 OK。

### (二) 常规操作:

当序列导入完成后, 在桌面出现三个窗口, 上左侧的窗口中显示的是该序列的常规信息, 上右侧窗口则以图形的格式展示序列的特征区及酶切图谱等。下面一个窗口显示的是序列: 默认状态下以双链形式出现, 也可以更改为单链显示。

1. 选择序列区域: 在图形区域或序列区域直接拖动鼠标左键, 同时在最下端的状态栏中显示出所选区域的范围。
2. 删除: 选中后直接点击键盘上的 Delete 键, 确认后即可删除。
3. 选中序列片段后, 点击 Edit 菜单, 用其中的命令可以完成对此片段的剪切、复制、删除、定义为新的特征区和用其它序列来代替等。
4. 当点在其一特定位置时, 我们也可以在此位置插入新的序列: Edit - New - Insert Sequence as
5. 当希望序列显示单链时, 点击 View - Show Both Strands

### (三) 常规分析:

1. 设计 PCR Sequence Primer, Hybridization, Probes:

选中设计引物的模板区或点击 Analyze 中的相应命令即可。

需要注意的是, 在设计前, 首先得将序列存入数据库中, 具体设计由于我们推荐使用 Oligo, 所以此处不详述。

2. 序列基本信息分析:

选中序列区段后, 选 Analyze - Oligo Analysis, 在 Oligo Analysis 对话框中, 点击 Analyze 按钮, 即可得到分子量、GC 含量、Tm 值、3'端的自由能、回文结构及重复序列等基本信息。

3. 酶切图谱分析

点击 Analyze 菜单中 Restriction Sites 命令, 出现“Restriction Map Setup”对话框, 点击 Add 按钮, 填入需要分析的位点, 不需要的位点可以选中后点 Remove 按钮移除。为了显示正确, 我们可以设定超过一定位点数量的酶不显示, 可以限定分析的区域等。点击 OK 后程序自动完成酶切分析。

4. Motif 查找

点击 Analyze 菜单中的 Motifs 命令, 在出现的 Motifs Setup 对话框中我们可以添加新的 Oligo 或从 Oligo Database 和 Oligo List 中选取; 选中后点击 OK 按钮, 程序完成 Motif 的查找, 同时给出相似性的百分比。

5. ORF 查找

点击 Analyze 菜单中的 ORF 命令, 在出现的 ORF Setup 对话框中, 填入 ORF 的最小长度(多少个密码子)以及其它一些设定后点击 OK, 程序自动完成 ORF 的查找。

## 6. 翻译

翻译前选中一个 ORF 或一个区域，这里我们希望把 pGH cDNA 基因完全翻译成蛋白质，因此选中最长的一个 ORF (7-657bp)。点击 Analyze 菜单中的 Translate 命令中的“Into New Protein”-“Direct Strand”，在出现的“New Protein Molecule”对话框中给出新蛋白质的名称后点击确定，程序完成翻译并打开一个新的窗口，显示氨基酸序列。

## 7. 反翻译

选中氨基酸序列片断，点击 Analyze 菜单中的 BackTranslate 命令，确认是“整个序列”还是“仅为选中的序列”后，即可设定简并度及组织特异性来完成反翻译。

### (三) 模拟电泳：

模拟电泳是指对 DNA 片段进行酶切分析后，通过电脑模拟电泳过程，将酶切片段分离。该功能有利于评估电泳时间，便于验证实际电泳结果的好坏。

1. 点击 Gel 菜单 - Create New 命令：出现 Gel Setup 对话框，首先选择电泳介质的类型 - “Agarose Gel”，以及胶的浓度、电压、胶长和 Buffer 种类。
2. 点击 OK 后即打开一个电泳界面，左侧是对电泳情况的描述，右侧则为胶板。
3. 首先配置一个 Marker：点 Gel 菜单 - Create Gel Marker，出现 New Gel Marker 对话框，首先输入 Marker 的名称：pGH-Marker，在 Gel Marker 活页中输入自己设定的片段，100, 200, 300, 400, 500, 600, 1000bp，点击确定。
4. 样品制备：点 Gel 菜单 - Create Gel Sample 命令出现 Create Gel Sample 对话框，选择来源分子 SSPGH，选中 *Ava*I 和 *Sma*I 两个酶，输入 Sample 的名称 SSPGH- AS。此时我们可以把酶切的片段直接加入到胶上，也可以加入到样品列表或保存为 Marker，我们点击 Add to Gel，则在胶上出现 1 号样品。
5. 点 Marker 到胶中：点击第二行工具栏中的 Add Marker Lane 图标，出现 Choose Database Gel Marker 对话框，选中 pGH - Marker，点击 OK，则 Marker 出现在 2 道
6. 电泳：用鼠标点击右侧窗口激活胶板，点击第二栏工具栏中的双箭头，开始电泳，同时在旁边显示电泳时间，再次点击双箭头，电泳停止。
7. 计算两条带分开时间：选中没有分开的条带，点工具栏中的计算器 Calculate Separation Time，即可得到所需信息。
8. 导出胶图：激活胶板，点击工具栏中的 Camera 工具，出现 Camera 对话框，选中需要导出的选项，结果可以到剪贴板，也可以保存成文件。到剪贴板后就可以在 Word 等文档编辑器中粘贴。

### (四) 图形操作

对于图形展示的序列信息，我们可以对图形进行各种修饰和改动，并最终导出需要的图形，如果序列是质粒，则可得到质粒图谱。

我们还是以 SSPGH 序列为例：

1. 激活图形栏，点击工具栏中的 Edit Picture。此时，点击任意一个需要改动的组件，则鼠标变为四方向箭头，按住左侧则可以任意拖动其位置。
2. 点击左键，选中 Properties 命令，则在 Properties 对话框中可以改变文字，字体，连线的粗细和颜色。
3. 对于特征序列，我们还可改变其填充方式，箭头方向等。
4. 加入注释：点击工具栏中的回形针按钮，出现 Annotation 对话框，输入注释文字（支持中、英文），如：“这是一个测试 Sequence”。点击确定后，文字就出现在图示窗口中，同样可以改变其位置、字体、颜色等。
5. 修改完成后，点工具栏中的命令，同样可以到剪贴板或文件。

## 二. 组件 AlignX

运行 AlignX 后出现四个窗口，从上到下，从左到右分别为序列信息窗口，进化树窗口，同源比较图示窗口和序列比较窗口。对于同源比较可以分为两类：一类是两个或几个序列（包括 DNA/RNA 和蛋白质序列）的比较，此时仅限于比较序列的相似性；另一类则是多个序列间的比较并得出系统进化树。

(一) 导入外源序列的方法：点击 Project 菜单中 Add Files 命令，选择需要比较的序列文件，点击打开按钮，确认是 DNA/RNA 还是 Protein Sequence 后，点击 Import 按钮就可以完成序列的导入任务。

(二) 我们以程序本身提供的演示 Project 来讲述 AlignX 的使用：

1. 选择 Project 菜单 Open 命令，找到 Vector NTI 的 Demo Projects 文件夹，打开 DNA.apr 文件；
2. 在文本窗口中，使用鼠标左键双击任一文件名，就可以得到该文件的所有基本信息；
3. 建立一个新的比较策略并进行比较：
  - ①在文本窗口中，按住 Ctrl 键选中四个序列：AF××××
  - ②点击 Alignment 菜单中 Alignment Setup 命令，出现 Alignment Setup 对话框，在此对话框中有 30 个选项来确定最终比较结果展示方式，这里我们使用默认值即可。
  - ③点击 Alignment 菜单中的 Align Selected Sequence 命令，片刻后程序完成比较并给出结果和进化树；
  - ④在 View 菜单中，我们可以通过 Edit Alignment 命令来编辑比较结果，使用 Display Setup 命令来改变结果的展示方式和颜色等。

4. 结果的导出：

①进化树的导出：激活进化树窗口，点击工具栏中的 Export Tree 按钮即可将进化树保存为 .Ph 文件，并可被其他树编辑软件所识别。或者点击 Edit 菜单中的 Camera 命令，将图像保存到剪贴板后在 Word 等文档编辑软件中粘贴；

②序列比较结果的导出：点击 Project 菜单中的 Export MSF Format 命令，将结果保存为 .msf 文件后，用 GeneDoc 打开进一步进行编辑和修饰。

## 三. Contig Express

该组件让您能够直接从测序仪或其它文件格式（如 GenBank 和 Fasta 等）中导入序列，并将这些阿序列片段拼接成一个长片段。在拼接的过程中可以显示测序图谱，可以自动去除载体序列及测序模糊序列。同时能在拼接的完成序列碱基的改动。

1. 点击 Project 菜单中的 Open 命令，找到 Demo Project 文件夹中的 DNA.cep 文件。当然我们也可以导入自己的序列，方法是点 Project 菜单中的 Add Fragments 命令，在此可以导入各种格式的文件。
2. 建立拼接策略：点击 Assemble 菜单中的 Assembly Setup 命令，出现 Assembly Setup 对话框，在此我们使用程序的默认值，不作改动。
3. 使用 Ctrl 键将 .abi 文件全部选中，并点击 Assemble 菜单中的 Assemble Selected Fragment 命令，程序自从完成拼接并出现一个 Contig1 的图标。
4. 双击 Contig1 图标，出现另一个窗口展示一个 8 片段拼接结果。
5. 激活序列窗口后，点击 View 菜单中的 Show All Chromatograms 命令，就可以显示每个序列的测序图谱。
6. 编辑图谱及序列：如果想改变图谱或序列上的某个碱基，就可以用框标点击该碱基，后输入新的碱基即可。同时，在图形窗口双击任一片段就可以打开一个新的窗口，在此窗口中可以对序列进行直接的改变了。
7. 拼接结果的导出：点击 Edit 菜单中的 Select All 命令选上拼接结果序列，在此点击 Edit 菜单，使

用 Copy 命令将拼接结果复制出来。

#### 四. BioPlot

该组件可以完成对 DNA、RNA 和氨基酸序列的各种理化特性的分析，实际上在 DNASTar 中有两个组件来分别完成对 DNA/RNA 和氨基酸序列的分析，其分析效果并不比 BioPlot 差，所以在此不再详述。

