



# БИОМИКА/BIOMICS

<http://biomics.ru>



## ДИЗАЙН ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ (КРАТКИЙ ОБЗОР КОМПЬЮТЕРНЫХ ПРОГРАММ И БАЗ ДАННЫХ)

Чемерис Д.А.<sup>1</sup>, Кирьянова О.Ю.<sup>2</sup>, Губайдуллин И.М.<sup>2</sup>, Чемерис А.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук  
Россия, Республика Башкортостан, 450054, Уфа, пр. Октября, 71, chemeris@anrb.ru

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт нефтехимии и катализа Российской академии наук  
Россия, Республика Башкортостан, 450075, Уфа, пр. Октября, 141,  
olga.kiryanova27@gmail.com

### Резюме

За три десятилетия своего существования полимеразная цепная реакция (ПЦР) стала практически вездесущей. Приблизительно в каждой восьмой работе, где анализируется ДНК, применяется имеющий огромное множество вариаций метод ПЦР. Олигонуклеотидные праймеры являются крайне важной составляющей любой полимеразной цепной реакции, и существует целый ряд требований к их дизайну. В настоящее время для этой цели в основном используются базирующиеся на различных алгоритмах специализированные компьютерные программы, число которых уже превышает полторы сотни. Многие программы для дизайна праймеров существуют в виде бесплатных web-сервисов, также их дистрибутивы могут быть получены от разработчиков или скачаны с соответствующих сайтов, нередко авторы открывают для всех желающих доступ к исходным кодам своих разработок. Ряд программ доступен из коммерческих источников. С накоплением информации о нуклеотидных последовательностях отдельных генов и целых геномов обязательным этапом подбора стала проверка праймеров с помощью программы BLAST на вероятность их неспецифического связывания с матрицей, что позволяет в дальнейшем избежать появления нецелевых продуктов полимеразной цепной реакции. Существующие программы позволяют вести дизайн праймеров для различных модификаций этого метода, среди которых мультиплексная, вырожденная, метабисульфитная ПЦР, ПЦР в реальном времени, ПЦР с последующим клонированием множественных фрагментов, в том числе безлигазным, ПЦР для проведения сайт-направленного мутагенеза, ПЦР, нацеленная на выявление мутаций, инделов, однонуклеотидного полиморфизма ДНК и др. Проводится многопараметрический анализ свойств олигонуклеотидов *in silico* (определение температуры плавления, выявление вторичных структур, димеров и т. п.). Разработаны программы, осуществляющие дизайн олигонуклеотидных праймеров с различными модификациями, например, содержащих рибонуклеотиды, LNA-нуклеотиды. В последнее время стали появляться программы дизайна праймеров, учитывающие уровень плоидности генома конкретного вида организма. В статье приведено большое число ссылок на web-сервисы компьютерных программ для дизайна праймеров. Кратко охарактеризованы некоторые базы данных, в которых накапливается информация о последовательностях хорошо зарекомендовавших себя праймеров. Цитированная литература составила более 240 источников. В данной работе рассматриваются программные комплексы, и отчасти некоторые алгоритмы, которые применяются для подбора праймеров. Основой любого современного программного комплекса, эффективного алгоритма является математическое описание в виде систем алгебраических, дифференциальных уравнений, интегрально-дифференциальных уравнений.

**Ключевые слова:** ПЦР, праймер, температура отжига праймеров, температура плавления, олигонуклеотид, дизайн праймеров, компьютерная программа, алгоритм, база данных, банк данных

### Введение

За три прошедших десятилетия после своего появления в середине 80-х гг. прошлого столетия ПЦР (Полимеразная Цепная Реакция) [Saiki et al., 1985] превратилась фактически в метод №1 для физико-химической биологии и смежных дисциплин. Проведенный нами анализ реферированных публикаций в базе данных PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), в том числе с помощью булевых операторов AND и NOT, позволил выявить, что практически в каждой восьмой статье, где анализируется ДНК, применяется метод ПЦР. Так, если задать поиск со словами «PCR» и «DNA» с булевым оператором AND, и ограничив временными интервалами с начала 1986 г. по настоящее время, то сервер выдаст информацию о 171858 таких статьях<sup>1</sup>, но из них необходимо вычестать статьи, где термин «PCR» не имеет отношения к полимеразной цепной реакции. Для получения более точных сведений необходимо принимать во внимание, что под аббревиатурой PCR могут скрываться и иные значения: Psychiatric Case Register (PCR), Phosphocreatine (PCr), Psychiatric Consultation Record (PCR), Platelet Count Ratio (PCR), Penicillin-resistant/ce (Pc<sup>r</sup>), predicting pathologic Complete Response (pCR) и некоторые другие. При этом в немалом числе публикаций (особенно в ранних), где с помощью ПЦР проводилась амплификация нуклеиновых кислот, сокращение PCR отсутствует, что также вносит свою лепту в дифференциацию статей. Тем не менее, можно считать, что из 1291283 статей, опубликованных после 1985 г., в которых встречается термин «DNA», около 170 тысяч содержат и аббревиатуру «PCR», относящуюся именно к полимеразной цепной реакции. И это в среднем за все эти годы, тогда как в последнее время вполне ожидаемо растет пропорция статей, в которых исследования ДНК без ПЦР уже не обходятся.

В настоящее время то, что называется ПЦР, даже в чисто методическом плане со всеми своими вариациями представляет собой поистине что-то гигантское. При этом можно считать, что по способам детекции целевых продуктов существует три вида этой реакции. В «ПЦР по конечной точке» целевые ампликоны регистрируются тем или иным способом по завершению реакции. Для ставшего практически самостоятельным методом «ПЦР в

реальном времени» контроль за накоплением целевых продуктов ведется в ходе всего процесса амплификации. Наконец, есть «цифровая ПЦР», которую все же правильнее считать разновидностью ПЦР по конечной точке. Способы детекции до некоторой степени определяют выбор размера ампликонов и особенности дизайна праймеров, но принципиальных отличий по предъявляемым требованиям к подбору праймеров для всех видов ПЦР практически нет.

Олигонуклеотидные праймеры являются крайне важной составляющей ПЦР, потому что именно от них зависит специфичность и эффективность реакции, да и сама возможность протекания реакции при наличии всех остальных ингредиентов. Существует целый ряд требований к подбору последовательностей нуклеотидов в праймерах и их протяженности, а также к образованию ими вторичных структур в зависимости от решаемых задач. Первоначально дизайн праймеров осуществлялся вручную, но уже со второй половины 80-х годов прошлого столетия стали появляться специальные компьютерные программы, облегчающие экспериментаторам задачу по составлению праймерных последовательностей. Нужно отметить, что и в настоящее время для ряда задач праймеры выбираются по месту без использования компьютерных алгоритмов поиска. В этих случаях требуется только анализ выбранных последовательностей на предмет установления их точных температур плавления, а также возможностей образования нежелательных вторичных структур и потенциального отжига на других местах генома. По мере увеличения общего количества секвенированных нуклеотидных последовательностей и их помещения в международные банки данных стало весьма актуальным и даже обязательным проверять вероятность неспецифического отжига подобранных праймеров, используя возможности программы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) по поиску гомологичных последовательностей ДНК, о чем ниже будет говориться подробнее.

Программы подбора праймеров можно подразделить на рассчитанные на дизайн праймеров *de novo* для любых последовательностей нуклеиновых кислот и на анализ уже предварительно выбранных праймеров с целью оценки определения их температур плавления/отжига и пригодности для успешной амплификации. Помимо них существует довольно внушительный ряд специализированных

<sup>1</sup> Здесь и далее количественные показатели приводятся по состоянию на начало июля 2016 г.

программ, преследующих в дизайне праймеров конкретные специфические цели. Большинство программ для дизайна праймеров доступны как web-сервисы, их дистрибутивы могут быть получены непосредственно от разработчиков или скачаны с соответствующих сайтов, а также авторы нередко открывают для всех желающих доступ к исходным кодам своих разработок, о чем сообщается в соответствующих публикациях. Приведенные в данной статье интернет-адреса программ проверены нами лично и оказались действующими на момент ее написания летом 2016 г.

На просторах интернета можно найти немало ресурсов, где содержится свод информации о компьютерных программах для дизайна различных праймеров. Одним из таковых является ресурс Omic tools (<https://omictools.com/primer-design-category>), где содержатся ссылки на программы подбора: обычных праймеров – 47 программ, вырожденных – 8, мультиплексных – 4, мутагенизирующих праймеров – 1 и 2 программы для подбора праймеров для полиплоидных организмов. На этом ресурсе также приводится техническая информация об операционных системах, языках программирования, условиях использования, требованиях к владению компьютером, а также литературные ссылки, если таковые по конкретным программам имеются. В данной статье нами будет рассмотрено или упомянуто большинство программ с этого ресурса, также внимание будет уделено еще более чем сотне других программ компьютерного дизайна праймеров.

#### **Компьютерные программы для дизайна праймеров для ПЦР общего назначения**

Выше упоминалось о подборе праймеров фактически по месту, вручную. Для таких пар нужно точно вычислить оптимальную температуру отжига, поскольку от этого параметра во многом зависит специфичность и эффективность ПЦР. Имеется немало программ, оценивающих температуру плавления/отжига праймеров, в том числе работающих в качестве web-сервисов и применяющих для этого различные алгоритмы [Chen, Zhu, 1997; Leber et al., 2005; Markham, Zuker, 2005; Panjkovich et al., 2005; Croce et al., 2008, Cheng, 2015]. В основном применяются эвристические алгоритмы, которые достаточно хорошо зарекомендовали себя при решении задач с высокой вычислительной сложностью. На сайтах некоторых фирм имеются специальные страницы, где в режиме on-line можно провести анализ нуклеотидных последовательностей, выбранных в качестве праймеров. Например, один из таких сайтов фирмы Promega <http://www.promega.com/a/apps/biomath/index.html?cal>

[c=tm](#) позволяет определить температуру плавления праймера в зависимости от концентраций катионов ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$  или  $\text{Mg}^{2+}$ ). На сайте фирмы Integrated DNA Technologies, Inc. <http://eu.idtdna.com/calc/analyser> можно проводить анализ не только обычных, но и модифицированных олигонуклеотидных праймеров, несущих в своем составе рибонуклеотиды, LNA-нуклеотиды и пр. Определение температур плавления/отжига праймеров с LNA-нуклеотидами может быть также проведено на сайте фирмы Exiqon <https://www.exiqon.com/ls/Pages/ExiqonTMPredictionTool.aspx>.

В общем случае для решения задач по дизайну праймеров необходима следующая информация, которая вводится в качестве начальных данных при работе с программой: исходная последовательность нуклеотидов, длина праймера, размер конечного продукта, температура плавления, GC-состав, состав 3'-конца и 5'-конца олигонуклеотидов. В результате работы программы определяется оптимальное множество праймеров, которые удовлетворяют заданным условиям (начальным данным). Также определяется оптимальное значение температуры плавления. Для решения более специфических задач, набор начальных данных и полученных выходных параметров может меняться.

Для выбора участков для отжига праймеров также применяют графы точечных матриц, позволяющие выявлять совпадающие последовательности у разных организмов [Kariko, 1995], или так называемый «жадный» алгоритм [Doi, Imai, 1999]. Показано также, что использование метода референсной точки в ряде случаев оказывается более удобным при дизайне праймеров для некоторых вариаций ПЦР [Kampke et al., 2001, Kampke, 2007]. Другими авторами при дизайне праймеров использовался метод Монте-Карло и цепи Маркова [Kitchen et al., 2012]. Алгоритм, заключающийся в логарифмической аппроксимации, также применялся для подбора праймеров [Konwar et al., 2008]. Рекомендовалось для дизайна праймеров использование эвристического [Pearson et al., 1995], иерархического подходов [Wei et al., 2003], статистического моделирования [Yuryev, 2007]. Целая серия статей посвящена использованию для дизайна праймеров алгоритмов самообучения [Cheng, 2014; 2016]. Во многих статьях для дизайна праймеров предлагалось использовать генетический или меметический алгоритмы [Chen et al., 2003; Wu et al., 2004; Png et al., 2006; Yang et al., 2009; 2009a; Chuang et al., 2012, Chuang et al., 2015]. В общем случае, меметический алгоритм является частным примером генетического алгоритма, который позволяет более точно определить праймеры,

удовлетворяющие условиям поиска. Недавно для дизайна праймеров предложено использовать алгоритм роя частиц [Garcia et al., 2015]. Имеются данные по качественному анализу применения генетического алгоритма, меметического алгоритма и алгоритма роя частиц для дизайна праймеров, проведено сравнение в быстродействии и точности работы каждого алгоритма. Даже представлены рекомендации по применению того или иного метода в решении конкретной задачи [Yang et al., 2009]. При разработке программ в последнее время применяются алгоритмы, которые в некотором роде являются комбинациями, усовершенствованными версиями вышеуказанных алгоритмов. Например, алгоритм FAPSO является усовершенствованной версией алгоритма роя частиц, который позволяет сократить время поиска [Chuang et al., 2013].

В последнее время стало уделяться значительное внимание не просто дизайну праймеров, а графическому отображению выдаваемых результатов, делая интерфейс таких программ как, например, PerlPrimer, VizPrimer, PrimerView, PrimerMapper значительно удобнее для экспериментатора [Marshall, 2007; Zhou, 2011; O'Halloran, 2015; 2016]. Графический интерфейс позволяет редактировать данные вручную, вести анализ полученных данных, наглядно отображает ошибки.

Распространявшаяся с 1986 г. бесплатно программа подбора праймеров в 1989 г. стала первой коммерчески реализуемой программой Oligo [Rychlik, Rhoades, 1989]. Это одна из первых универсальных программ, позволяющая решать целый класс задач в области биологии и молекулярной биохимии. Преимуществом данной разработки стало и наличие удобного пользовательского интерфейса, помимо режима командной строки. После ее появления вопросам компьютерного дизайна праймеров стало уделяться повышенное внимание [Lowe et al., 1990; Rozas, 1991; Rychlik, 1993; 1995]. Одна из ранних программ для дизайна праймеров OLGA, написанная еще для компьютера Atari ST, при подборе последовательностей учитывала наличие повторяющихся участков ДНК, вторичную структуру и возможные праймерные димеры [Bridges, 1990]. Программа OSP (Oligonucleotide Selection Program) также оказалась среди первых, где при подборе праймеров учитывались многие параметры [Hillier, Green, 1991]. Были написаны программы дизайна праймеров, рассчитанные на использование микрокомпьютеров и среды Mac [Lucas et al., 1991; Osborne, 1992]. Обычно праймеры подбираются исходя из полной гомологии матрице, но в некоторых случаях праймеры должны иметь в

своем составе неспаривающиеся нуклеотиды. С целью подбора таких праймеров была написана программа MISMATCH, сразу предлагающая дизайн праймеров с неспаренными нуклеотидами в 3'-области [Davidow, 1992]. В те же годы была написана программа OLIGSCAN, позволяющая при дизайне праймеров сканировать до 200 нуклеотидных последовательностей [Montpetit et al., 1992]. Ранние программы для подбора олигонуклеотидных праймеров с целью исключить образование ими шпилечных структур, типичных для молекул РНК, использовали алгоритмы для предсказания вторичных структур у РНК наподобие известной программы FOLD [Eberhardt, 1992]. Программа PrimerGen осуществляла дизайн праймеров по известным аминокислотным последовательностям [Nash, 1993].

Уже упоминавшаяся программа Oligo в настоящее время доступна из коммерческого источника – фирмы Molecular Biology Insights, Inc. (<http://www.oligo.net>) в виде версии 7.0, написанной еще в 2007 г. [Rychlik, 2007]. Другой популярной коммерческой программой для дизайна праймеров является PrimerSelect, входящая в пакет программ всестороннего анализа нуклеиновых кислот и белков LaserGene фирмы DNASTar, Inc. (<http://www.dnastar.com>) [Plasterer, 1997; Graham, Holland, 2005]. В сходный пакет программ Vector NTI (<https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/products-and-services/product-types/primers-oligos-nucleotides/invitrogen-custom-dna-oligos/primer-design-tools.html>) фирмы ThermoFisher Scientific входит модуль для подбора праймеров [Gorelenkov et al., 2001]. Бесплатный пакет прикладных программ Unipro UGENE (<http://ugene.net>) помимо прочих программ анализа нуклеотидных последовательностей предоставляет возможность дизайна праймеров для проведения ПЦР [Okonechnikov et al., 2012].

Дизайну праймеров, осуществляемому с помощью популярной программы Primer3, предшествует заложенный в нее многопараметрический анализ олигонуклеотидов (определение температуры плавления, выявление вторичных структур и др.) [Rozen, Skaletsky, 2000]. Данная программа доступна в сети интернет на множестве сайтов (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>; <http://simgene.com/Primer3>; [http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi)). Она неоднократно дорабатывалась и ей придавались новые возможности [van Baren, Heutink, 2003; Koressaar, Remm, 2007; von Ahlsen et al., 2011; Untergasser et al., 2012]. Усовершенствованная web-версия Primer3Plus [Untergasser et al., 2007] находится по адресам <http://primer3plus.com> и

[http://primer3plus.com/primer3web/primer3web\\_input.htm](http://primer3plus.com/primer3web/primer3web_input.htm). Программа PCRTiler (<http://pcrtiler.alaingervais.org:8080/PCRTiler>) [Gervais et al., 2010] представляет собой web-сервер, дробящий анализируемую последовательность ДНК на относительно мелкие фрагменты, для каждой из которых ведется автоматический подбор праймеров с помощью именно программы Primer3. В одной из работ было проведен анализ успешности подбора праймеров рядом компьютерных программ как для АТ- или GC-обогащенных участков, так и для фрагментов с их приблизительным равенством, в результате чего был сделан вывод, что испытанные ими одиннадцать программ (Primer3, Primer Design Assistant, PrimerQuest, GeneFisher и др.) несколько различаются по эффективности дизайна праймеров для ДНК с разными составами нуклеотидов [Chavali et al., 2005].

Программа FastPCR позволяет осуществлять дизайн праймеров не только для стандартной ПЦР, но и для мультиплексной, метабисульфитной ПЦР, вырожденной ПЦР, включая использование LNA-аналогов нуклеотидов, ПЦР в реальном времени, ПЦР с последующим безлигазным клонированием множественных фрагментов и др. [Kalendar et al., 2011; 2014]. FastPCR доступна с сайта <http://primerdigital.com/fastpcr.html>, при этом работа с ней возможна в сети по адресу <http://primerdigital.com/tools/pcr.html>.

Программа MFEprimer ориентирована на проверку специфичности праймеров, уделяя внимание их 3'-концам [Qu et al., 2012; 2015]. Эта программа доступна в сети интернет - <http://biocompute.bmi.ac.cn/CZlab/MFEprimer-2.0/>. Недавно написанная программа MRPrimer благодаря возможностям компьютерного подбора и анализа выбранных праймеров за счет выполняемого ранжирования рекомендует лучшую пару для конкретных целевых последовательностей [Kim et al., 2015].

Несмотря на то что выше нами говорилось об отсутствии принципиальных различий при подборе праймеров для разных видов ПЦР, тем не менее написано несколько программ, рассчитанных именно на дизайн праймеров для проведения количественной ПЦР в режиме реального времени. К таковым можно отнести программы QuantPrime (<http://www.quantprime.de>) [Arvidsson et al., 2008], MultiPriDe [Ziesel et al., 2008], PRaTo [Nonis et al., 2011], Edesign (<http://www.dnaform.com/edesign2>) [Kimura et al., 2016]. Также довольно широко для этих целей используется программа Primer Express (<http://primer-express.software.informer.com>), являющаяся коммерческим продуктом фирмы Life Technologies, Inc.

Следует отметить, что для современных разработок программного обеспечения применяются языки программирования высокого уровня. Важной особенностью большей доли программ является возможность согласованной работы с базами данных. Основные применяемые в разработке языки программирования: C++, C#, FORTRAN, Java Script, Python, Perl. Например, программа PrimerMapper разработана на языке Perl с поддержкой модуля Tk для создания графического интерфейса программы с применением специализированного набора модулей BioPERL.

В основном выходные файлы формируются в специализированном формате, что весьма удобно при работе с разными программами. Формат FASTA один из наиболее популярных форматов для предоставления последовательностей нуклеотидов и аминокислот. Данный формат может содержать названия последовательностей и сопутствующие комментарии. Сформированные файлы можно конвертировать в табличный формат CSV, что позволит работать с результирующими данными в большем количестве программ. Простота FASTA-формата позволяет легко производить различные действия с последовательностями при помощи инструментов редактирования текста и скриптовых языков программирования, таких как Python, Ruby, Perl. Более подробная информация хранится в файлах формата GenBank. Файл формата GenBank представляет собой текстовый документ, который формируется через поименованные записи. По соглашению, файлы формата GenBank имеют расширение GBK.

Прежде чем перейти к рассмотрению компьютерных программ для дизайна праймеров, используемых в вариантах ПЦР для решения специфических задач, коротко коснемся еще одного важного аспекта, а именно так называемой валидации праймеров. Под этим понимается получение дополнительной информации о том, на каких еще последовательностях могут отжигаться подобранные праймеры, что может привести к амплификации заключенного между ними нецелевого участка в геометрической прогрессии. Для этого предлагается проводить соответствующий поиск гомологичных участков с помощью программы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) по уже известным нуклеотидным последовательностям, выбор которых для такого анализа может задавать сам экспериментатор. Ряд компьютерных программ подбора праймеров таких как OligoFactory, Primique, QuantPrime, De-MetaST-BLAST, Primer-BLAST помимо собственно подбора праймеров для внесенных в них последовательностей нуклеотидов позволяют проводить валидацию

сконструированных праймеров по базе данных NCBI для исключения возможного фальш-праймирования, но все они имеют разные и весьма ощутимые ограничения [Schretter, Milinkovitch, 2006; Fredslund, Lange, 2007; Arvidsson et al., 2008; Gulvik et al., 2012; Ye et al., 2012]. Недавно написана программа для дизайна праймеров MRPrimerW (<http://mrprimerw.com>), по уверению авторов снимающая некоторые проблемы при обращении к BLAST-серверу и по целому ряду параметров превосходящая сходные программы, среди которых ими были испытаны, в том числе Primer3Plus, BatchPrimer3, Primique, QuantPrimer, Primer-BLAST [Kim et al., 2016].

### Компьютерные программы подбора праймеров для специализированных задач

Многие из рассмотренных в предыдущем разделе компьютерных программ для дизайна праймеров широкого профиля позволяют осуществлять подбор праймеров и для специализированных ПЦР-приложений. Но также написано и немало программ дизайна праймеров, решающих относительно узкопрофильные задачи, внимание которым будет уделено в данном разделе.

Одна из возможностей резкого увеличения общей производительности ПЦР заключается в проведении данной реакции одновременно с несколькими парами праймеров, что получило название мультиплексной ПЦР. При этом ввиду присутствия в реакционной смеси большого числа разных олигонуклеотидов резко увеличивается вероятность димеризации, и соответственно возрастают требования к дизайну праймеров. Целый ряд программ подбора праймеров написан специально для мультиплексной ПЦР. К таковым можно отнести, например, программы MuPlex [Rachlin et al., 2005], MultiPLX [Kaplinski et al., 2005; Kaplinski, Remm, 2007], MPCRPs designer [Chen et al., 2009], программу Multiplex manager 1.0 (<http://multiplexmanager.com>) [Holleley, Geerts, 2009], программу Matchup [Jang et al., 2010]. Специализированная программа PrimerStation (<http://ps.cb.k.u-tokyo.ac.jp/index.html>) позволяет избегать наличия в праймерах для мультиплексной ПЦР с ДНК человека однонуклеотидных замен, участков poly-A и CA-повторов [Yamada et al., 2006].

Существует немало компьютерных программ, предназначенных для подбора праймеров с целью выявления мутаций, инделов, а также однонуклеотидного полиморфизма ДНК [Vieux et al., 2002; Niu, Hu, 2004; Alexander et al., 2005; Ringquist et al., 2005; Weckx et al., 2005; 2007; Zhang et al., 2005; Wangkumhang et al., 2007; Yao et al., 2008; Yang et al., 2009a; Chang et al., 2009; You et al., 2009; Yang

et al., 2010a; 2012; Paneto, De Paula Careta, 2015]. Дизайн праймеров для амплификации промоторных участков, экзонов и выявления снипов в человеческих геномах осуществляется с помощью программы PrimerZ (<http://genepipe.ncgm.sinica.edu.tw>) [Tsai et al., 2007]. Аналогичные функции по недопущению на 3'-концах праймеров замен и исключения в амплифицируемых последовательностях структурных вариаций типа инделов и им подобным выполняет программа REXPrimer, доступная на сервере <http://www4a.biotec.or.th/rexprimer> [Piriyaongsa et al., 2009].

Во многих программах предварительно проводится множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей гомологичных генов с дальнейшим подбором праймеров к консервативным участкам – PRIMEGEN [O'Hara, Venezia, 1991]; PCRPROF [Dopazo et al., 1993]; GPRIME [Gibbs et al., 1998]; Amplicon [Jarman, 2004]; Primaclade (<http://primaclade.org>) [Gadberrry et al., 2005]; PriFi (<http://cgi-www.daimi.au.dk/cgi-chili/PriFi/main>) [Fredslund et al., 2005]; QPRIMER [Kim, Lee, 2007]; AlignMiner (<http://www.scbi.uma.es/bio/soft/alignminer>) [Guerrero et al., 2010]; PrimerIdent (<http://primerident.up.pt>) [Pessoa et al., 2010]; maxAlike (<http://rth.dk/resources/maxAlike/>) [Menzel et al., 2011]; Gemi (<http://sourceforge.net/projects/gemi>) [Sobhy, Colson, 2012]; PrimerDesign [Brodin et al., 2013]; SP-Designer [Villard, Malausa, 2013]. Программа GenoFrag помогает подобрать праймеры для сравнения близкородственных штаммов микроорганизмов путем амплификации всего генома в виде протяженных (около 10 т.п.н.) ампликонов [Ben Zakour et al., 2004; Ben Zakour, Le Loir, 2007]. Программа PrimerDesign-M [Yoon, Leitner, 2015] предназначена для множественного выравнивания небольших геномов и подбора праймеров для геномной «прогулки» и как web-сервис доступна на сайте [http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/PRIMER\\_DESIGN/primer\\_design.html](http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/PRIMER_DESIGN/primer_design.html). MEDUSA [Podowski, Sonnhammer, 2001], UniPrime [Bekaert, Teeling, 2008] и UniPrime2 [Boutros et al., 2009] фактически являются оболочками к ряду программ множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей и подбора праймеров, облегчая работу дизайнерам праймеров. Однако есть и иные взгляды на подбор праймеров, пригодных для амплификации сходных последовательностей у разных организмов. Так, авторы программы PriMux напротив подчеркивают, что при подборе праймеров для таких задач обходятся без множественного выравнивания, используя другой подход [Hysom et al., 2012].

Принимая во внимание важность использования в ПЦР вырожденных праймеров и сложность их дизайна, целый ряд теоретических работ посвящен этому вопросу [Kwok et al., 1994; Linhart, Shamir, 2002; 2005; Balla, Rajasekaran, 2007]. Написано немало компьютерных программ, облегчающих подбор вырожденных праймеров [Singh et al., 1998; Wei et al., 2003; Jabado et al., 2006; Linhart, Shamir, 2007; Souvenir et al. 2007; Najafabadi et al., 2008; 2008a; Contreras-Moreira et al., 2009; Gulvik et al., 2012; Kitchen et al., 2012; Gahoi et al., 2013; Gardner, Slezak, 2014; Lane et al., 2015]. Довольно популярная программа GeneFisher рассчитана на подбор вырожденных праймеров для амплификации фрагментов ДНК, исходя из анализа аналогичных известных участков у родственных организмов [Giegerich et al., 1996]. Он-лайн версия GeneFisher2 находится по адресу <http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/genefisher2>. Еще одной вариацией данной программы является GeneFisher-P [Lamprecht et al., 2008]. Отдельное внимание стоит уделить довольно широко используемым программам семейства CODEHOP (COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) [Rose et al., 1998; 2003; Stacheli et al., 2009] и ее интерактивного (i) варианта iCODEHOP [Boyce et al., 2009; Stacheli et al., 2011], находящегося по адресу <http://icodehop.cphi.washington.edu/i-codehop-context/Welcome>. Особенности сконструированных с помощью данных программ праймеров являются короткие участки вырожденных последовательностей на 3'-конце, и более консервативный 5'-конец большей протяженностью, фланкирующий таргетный мотив. Считается что достаточно 3-4 высококонсервативных аминокислотных остатка для создания хорошо работающих вырожденных праймеров. Таким образом, любой праймер, дизайн которого, произведен с помощью программ CODEHOP, представляет собой фактически пул праймеров с гетерогенными 3'-концами и одинаковыми 5'-участками.

В последние годы важное значение приобретает установление метилированного статуса цитозинового остатков, ответственных за различное функциональное состояние содержащих их генов, а также регуляторных участков. Одним из подходов выявления метилированных цитозинов является проведение бисульфитного секвенирования ДНК с помощью ПЦР со специальным образом подобранными праймерами, для чего написан ряд программ, например MethPrimer [Li, Dahiya, 2002; Li, 2007], PeriPrimer [Marshall, 2004]; BiSearch [Tusnady et al., 2005; Aranyi et al., 2006; Aranyi, Tusnady, 2007], MSPrimer [Brandes et al., 2007], Bisprimer [Kovacova,

Janousek, 2012]. Для выявления так называемых CpG-островков можно подбирать праймеры с помощью программы PRIMEGENS-v2 [Srivastava et al., 2008]. Программа MSRE-HTPrimer, основанная на Primer3, позволяет осуществлять дизайн праймеров для проведения метилчувствительной ПЦР [Pandey et al., 2016]. Подбор праймеров для этих целей ведется также с помощью программы Methyl Primer Express Software v1.0 (<https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=602121&tab=DetailInfo>), являющейся коммерческим продуктом фирмы Life Technologies, Inc.

Такие программы подбора праймеров как PrimeArray, GenomePRIDE, FindGPDs, G-PRIMER, DualPrime и ряд других предназначены для генерации большого числа пар праймеров при выполнении крупномасштабных проектов анализа кодирующих областей геномов эукариотических организмов путем микроэрежной амплификации [Raddatz et al., 2001; Fernandes, Skiena, 2002; Rouillard et al., 2002; 2003; Haas et al., 2003; Blick et al., 2003; Gordon, Sensen, 2004; Wang et al., 2004; Andersson et al., 2005; Penkett et al., 2006; Lee et al., 2008]. Программа GST-PRIME (Gene Sequence Tags) ориентирована на дизайн праймеров для амплификации кодирующих участков ДНК или кДНК арабидопсиса и дрозофилы [Varotto et al., 2001; Leister, Varotto, 2007]. Программа PRIMEGENS отчасти также ориентирована на подбор праймеров для конструирования микроэрежных чипов [Srivastava, Xu, 2007]. Авторы упомянутой выше программы GenomePRIDE гарантировали дизайн праймеров со скоростью до 1000 праймерных пар за один час, 99% которых оказывались успешными при выполнении ПЦР. Гораздо большей производительностью характеризуется программа для дизайна праймеров JCSC Primer Selection Tool, генерирующая до 1000 праймерных пар за одну минуту [Canaves et al., 2004]. Программа hybseek позволяет подбирать праймеры для твердофазной микроэрежной амплификации, акцентируя внимание на патогенных микроорганизмах [Frech et al., 2009].

Для секвенирования ПЦР-продуктов, в том числе при выполнении крупномасштабных проектов, написано несколько компьютерных программ подбора праймеров – PRIMO [Li et al., 1997]; PRIDE [Haas et al., 1998]; MutScreener [Yao et al., 2006]; BatchPrimer3 (<http://wheat.pw.usda.gov/demos/BatchPrimer3>) [You et al., 2008]; Optimus Primer (<http://op.pgx.ca>) [Brown et al., 2010]; PriSM (<http://www.broadinstitute.org/scientific-community/science/projects/viral-genomics/prism>) [Yu et al., 2011]. В случае мультиплексного

полногеномного секвенирования одновременно нескольких образцов необходимо использование баркодов, представляющих собой уникальные последовательности, по которым можно отличать одни риды от других, но поскольку они могут вносить нежелательную избирательность на стадии амплификации для исключения таких перекосов предлагается использовать программу подбора праймеров BARCRAWL, при дизайне сразу учитывающую последовательности баркодов [Frank, 2009]. Аналогичную задачу решает программа PrimerProspector (<http://pprospector.sourceforge.net>) [Walters et al., 2011]. Внимания также заслуживает недавно написанная программа STITCHER, доступная как web-ресурс по адресу <http://ohalloranlab.net/STITCHER.html> [O'Halloran, 2015]. Данная программа ориентирована на подбор праймеров, «сшитых» с различными перекрывающимися участками, расположенными на их 5'-конце. При этом такие дополнительные последовательности могут быть добавлены самим экспериментатором или выбраны из небольшой встроенной базы данных, где содержится информация о последовательностях адапторов для полногеномного секвенирования на платформе Illumina, а также генов маркерных белков GFP, YFP. Программа QDD [Megléc et al., 2010] позволяет подбирать праймеры для амплификации микросателлитных последовательностей по данным секвенирования из крупномасштабных проектов.

Для одного из способов клонирования ПЦР-продуктов путем безлигазного объединения множественных фрагментов ДНК написана специализированная программа подбора праймеров PHUSER (Primer Help for USER), где особое внимание должно уделяться выступающим на 5'-концах праймеров последовательностям ДНК [Olsen et al., 2011; Salomonsen et al., 2014]. Данная программа доступна на сайте <http://cbs.dtu.dk/services/phuser>. Программа для подбора праймеров для последующего клонирования продуктов ПЦР за счет включенных в состав праймеров сайтов рестрикции CloneAssistant 1.0 доступна на сайте <http://bis.zju.edu.cn/clone/> [Shao et al., 2010]. Ранее аналогичные задачи была призвана решать программа PCRCLNG, генерирующая праймеры с наличием на 5'-конце экстрапоследовательностей, несущих сайты рестрикции [Hou, 2002]. Для клонирования и последующей экспрессии генов в прокариотических системах можно подбирать праймеры с помощью программы Express Primer Tool [Yoon et al., 2002] или программы PrimerCE, включающей информацию о 30 наиболее часто используемых векторах [Cao et al., 2010].

Программа EC\_oligos осуществляет автоматический подбор консервативных праймеров к консервативным участкам экзонов двух различных аннотированных последовательностей какого-либо организма, в том числе и в полногеномном масштабе [Liu et al., 2004]. Сходные задачи была призвана решать программа ELXR (Exon Locator and Extractor for Resequencing) [Schageman et al., 2004]. Программа EXPrimer для дизайна праймеров для обратно-транскрипционной ПЦР выбирает участки с экзон-экзонными границами [Sandhu, Acharya, 2005]. Программа PrimerSeq рассчитана на дизайн праймеров для обратно-транскрипционной ПЦР с учетом возможного альтернативного сплайсинга [Tokheim et al., 2014]. Еще целый ряд программ AutoPrime, PUNS, Expeditor, Pythia, EasyExonPrimer, BatchPD [Wrobel et al., 2004; Boutros, Okey, 2004; Hu et al., 2005; Wu, Munroe, 2006; Mann et al., 2009; Lai, Love, 2012] также ориентирован на подбор праймеров к кодирующим участкам геномов. Недавно написана программа Scrimer (<http://scrimer.readthedocs.io/en/latest/>), нацеленная на дизайн праймеров из транскриптомных данных [Morkovsky et al., 2015].

Проведение сайт-направленного мутагенеза требует специально подобранных праймеров, что предлагается осуществлять с помощью программ Primer Generator [Turchin, Lawler, Jr., 1999] или *insilico. mutagenesis* [Krauss, Eggert, 2005]. Программа SDM-Assist позволяет создавать праймеры для сайт-направленного мутагенеза, при этом помечая праймеры особой меткой, что затем способствует нахождению мутагенизированных последовательностей [Karnik et al., 2013]. Праймеры для перетасовки генных последовательностей или ДНК-шаффлинга рекомендуется подбирать с помощью программы PrecisePrimer [Pauthenier, Faulon, 2014].

Программа PRIMROSE нацелена на подбор праймеров в генах 16S рРНК с целью амплификации специфичных фрагментов для установления филогенетического родства анализируемых бактерий [Ashelford et al., 2002]. Сходные задачи выполняет программа SPYDER (<http://people.uleth.ca/~selibl/Spyder/Spyder.html>) [Thomas et al., 2011]. Дизайн праймеров для амплификации генов рРНК грибов, выявляемых в окружающей среде, производился с помощью программ PRISE (PRImer SElect) [Fu et al. 2008] и PRISE2 [Huang et al., 2014].

WEB-сервер Primerize, находящийся в свободном доступе (<http://primerize.stanford.edu>), предназначен для подбора праймеров для амплификации участков, несущих информацию о некодирующих РНК [Tian et al., 2015]. В последние



годы растет число задач по выявлению и количественной оценке микроРНК, решить которые помогает специализированная программа подбора праймеров miPrimer [Busk, 2014]. Программа GeneUp была ориентирована на дизайн коротких (8-10 звеньев) праймеров, используемых обычно при анализе молекул РНК [Pesole et al., 1998].

Узкую направленность имеет программа PrimerHunter, поскольку рассчитана на подбор праймеров для идентификации различных субтипов вируса гриппа [Duitama et al., 2009]. Программа PhiSiGns предназначена для дизайна праймеров для изучения биоразнообразия бактериофагов [Dwivedi et al., 2012]. Программа AcePrimer также написана исключительно для дизайна праймеров для поиска делеций в геноме нематоды *Caenorhabditis elegans* [McKay, Jones, 2001]. Программа Primers-4-Yeast ориентирована на поиск праймеров для амплификации участков ДНК из генома дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [Yofe, Schuldiner, 2014]. Программа Primer Primer (http://www-nmr.cabm.rutgers.edu/bioinformatics/Primer\_Primer/) позволяет в автоматическом режиме подбирать праймеры для амплификации плазмидной ДНК. Она имеет небольшую библиотеку часто используемых плазмидных векторов, которая может дополняться самими экспериментаторами [Everett et al., 2004]. С помощью программы DNA-Fold осуществлялся дизайн праймеров для проведения SSCP-анализа одноцепочечных ампликонов [Nielsen et al., 1995]. При амплификации HLA-локусов для дизайна праймеров предлагалось использовать программу PCR-SSP (Sequence Specific Primers) Manager [Bunce et al., 1998]. Учитывая важность исключения гомо/гетеро праймерных димеров, была написана специальная компьютерная программа AutoDimer [Vallone, Butler, 2004]. Она предназначалась для подбора мультиплексных праймеров при ДНК-идентификации личности с помощью STR-локусов или SNP-маркеров. В виде web-версии она доступна на сайте - <http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/AutoDimerHomepage/AutoDimerProgramHomepage.htm>. Программа SeqState (http://bioinfweb.info/Software/SeqState) позволяет осуществлять дизайн праймеров для филогенетических исследований [Muller, 2005]. Особенностью программы PD5 является то, что она позволяет конструировать праймеры длиннее 32 звеньев [Riley et al., 2013]. Программа Primer Master имеет два режима – «универсальный» и «специфичный», с помощью последнего допускается анализировать неограниченное число нуклеотидных последовательностей длиной до 32 т.п.н. [Proutski, Holmes, 1996].

Дополняющие друг друга программы UniFrag и GenomePrimer рассчитаны на автоматический подбор праймеров из уникальных регионов генома [van Hijum et al., 2003]. Программа GENOMEMASKER маскирует в геномах эукариот повторяющиеся последовательности для ведения подбора праймеров только по уникальным последовательностям [Andreson et al., 2006; 2007; 2015]. Данную программу можно скачать здесь <http://bioinfo.ut.ee/download>, а ее web-версия доступна по этому адресу - <http://bioinfo.ut.ee/genometester>.

Еще одна программа RJPrimers (<http://probes.pw.usda.gov/RJPrimers/index.html>) призвана конструировать праймеры для разработки геномных маркеров и обнаружения мест внедрения транспозонов [You et al., 2010]. С ее помощью созданы маркеры для картирования генома эгилопса *Aegilops tauschii*, являющегося донором субгенома D мягкой пшеницы. Ранее этой же группой авторов написана программа ConservedPrimers 2.0 (<http://probes.pw.usda.gov/ConservedPrimers/index.html>), позволяющая конструировать праймеры для выявления в геноме пшеницы однонуклеотидных замен [You et al., 2009].

В одной из недавних статей [Ramiez-Gonzalez et al., 2015; 2015a] отмечается, что нынешние программы дизайна праймеров принимают во внимание все нуклеотидные последовательности генов и геномов как в действительности принадлежащие диплоидным организмам, тогда как для полиплоидных форм необходимо учитывать уровень пloidности генома у конкретного вида. Так, в этих цитированных статьях на примере гексаплоидной мягкой пшеницы, состоящей из трех субгеномов, показаны возможности программы PolyMarker (<http://polymarker.tgac.ac.uk>) по дизайну праймеров для выявления однонуклеотидных замен. Недавно была написана еще одна компьютерная программа GSP (Genome Specific Primer) для подбора праймеров для полиплоидных организмов, доступная как web-ресурс (<http://probes.pw.usda.gov/GSP>), где в качестве встроенной базы данных содержится информация о полиплоидных организмах – гексаплоидной хлебной пшенице *Triticum aestivum*, просе прутьевидном *Panicum virgatum* и тетраплоидном хлопчатнике *Gossypium hirsutum* [Wang et al., 2016].

#### Праймерные базы данных

Учитывая определенные сложности в подборе праймеров, а также тот факт, что разные экспериментаторы могут быть заинтересованы в амплификации одинаковых участков геномов у различных видов организмов, ученое сообщество вполне логично рассудило, что необходимо делиться

сведениями об успешно работающих праймерах. Поэтому по мере широкого распространения метода ПЦР стали появляться соответствующие базы данных, в которых накапливалась информация о последовательностях праймеров, хорошо себя зарекомендовавших. Приведем здесь информацию о некоторых таких базах данных.

Существует довольно крупный банк праймерных последовательностей PrimerBank (<https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>) [Wang, Seed, 2003; Spandidos et al., 2008; 2010; Wang et al., 2012] - по состоянию на ноябрь 2011 г. (о чем сообщается в последней из процитированных здесь статей и на самом сайте) содержал около полумиллиона праймеров для амплификации различных участков геномов мыши и человека. В этой же базе данных имеется информация о праймерах для количественной оценки транскриптов различных генов мыши и человека в ПЦР реального времени. Многочисленные праймеры для полных транскриптомов мыши и человека представлены в другой базе данных [Zeisel et al., 2013]. Информация о праймерах для проведения ПЦР в реальном времени содержится также в базе данных RTPrimerDB (<http://rtprimerdb.org>) [Pattyn et al., 2003; 2006; Lefever et al., 2009]. Аналогичные базы данных праймеров для количественной ПЦР расположены по адресам <https://primerdepot.nci.nih.gov> [Cui et al., 2006], <http://bbcftools.epfl.ch/getprime> [Gubelmann et al., 2011], <http://hpcilife.th-wildau.de:5984/rpc/design/rpc/view.html> [Silbermann et al., 2013].

Как уже говорилось выше, значительное внимание уделяется установлению статуса метилированности остатков цитозина в геномах эукариот. Поскольку применяемая для этого бисульфитная обработка ДНК превращает цитозины в урацилы, а метилированные цитозины остаются неизменными, то использовать для проверки потенциальных мест отжига специально подобранных для этой цели праймеров, например, программу BLAST становится практически невозможно. Чтобы облегчить эту часть экспериментов были организованы специализированные базы данных methBLAST и methPrimerDB [Pattyn et al., 2006a]. База данных methPrimerDB (<http://medgen.ugent.be/methprimerdb>) содержит 259 праймерных пар для анализа отдельных генов человека, мыши и крысы.

Для различных видов растений также были созданы базы данных праймерных последовательностей – AtRTPrimer, DATFAP, PIPEMicroDB [Han et al., 2006; Fredslund, 2008; Sarika et al., 2013]. Еще одна база данных в 2007 г. содержала свыше 700 последовательностей праймеров для амплификации с помощью ПЦР

различных фрагментов хлоропластных геномов 13 видов растений [Heinze, 2007]. 175 домен-специфичных праймеров для амплификации генов рРНК бактерий (по состоянию на сентябрь 2015 г.) имеется в базе данных probeBase (<http://www.probebase.net>) [Greuter et al., 2016]. Для детекции с помощью ПЦР патогенных микроорганизмов, среди которых возбудители чумы, сибирской язвы и других инфекций на случай биотеррористической атаки существовала база данных праймеров Patho-Genes [Gardes et al., 2012] (на данный момент недоступна). Ранее была создана и база данных по праймерам для детекции с помощью ПЦР различных вирусов [Onodera, Melcher, 2002].

Так как вышеописанную информацию удобнее и нагляднее представлять в виде таблиц, то для ее хранения используются реляционные базы данных. Во многих приложениях для разработки базы данных и грамотной организации запросов используются системы управления базами данных (СУБД) MySQL и Oracle. MySQL применяется для разработки малых и средних приложений. То есть данная СУБД применима к базам данных, хранящих специфическую информацию по дизайну праймеров. СУБД Oracle применима к крупномасштабным проектам. Например, RTPrimerDB реализована с помощью реляционной СУБД Oracle 8i. Веб-приложение, управляющее и формирующее запросы к БД, основано на PHP-скриптах, использующих интерфейс OCI (Oracle Call Interface). Полноценное приложение запускается на веб-сервере Apache в окружении операционной системы Windows 2000 [Pattyn et al., 2003; 2006; Lefever et al., 2009].

Базы данных, которые находятся в открытом доступе сети Интернет могут пополняться непосредственно исследователями с помощью автоматизированной системы пополнения баз данных.

### Заключение

В данной статье нами предпринята попытка собрать информацию практически обо всех компьютерных программах для дизайна праймеров, число которых превысило полторы сотни<sup>2</sup>. Тем не менее, несмотря на очень большое количество компьютерных программ для подбора праймеров, еще не все задачи моделирования праймеров решены.

Например, отсутствуют программы, позволяющие создавать некоторые сложные

<sup>2</sup> Будем признательны всем, кто пришлет нам указания на неизвестные нам компьютерные программы для дизайна праймеров.

олигонуклеотидные структуры, используемые в различных вариациях метода ПЦР, применимые и в ряде изотермических реакций.

#### Литература

- Alexander A.M., Pecoraro C., Styche A., Rudert W.A., Benos P.V., Ringquist S., Trucco M. 2005. SOP3: a web-based tool for selection of oligonucleotide primers for single nucleotide polymorphism analysis by Pyrosequencing. *Biotechniques*. 38, 87-94.
- Andersson, A., Bernander, R., Nilsson, P., 2005. Dual-genome primer design for construction of DNA microarrays. *Bioinformatics* 21, 325–32. doi:10.1093/bioinformatics/bti001
- Andreson R., Kaplinski L., Remm, M. 2006. Software Open Access GENOMEMASKER package for designing unique genomic PCR primers. *BMC Bioinformatics* 7, 172. doi:10.1186/1471-2105-7-172
- Andreson, R., Kaplinski, L., Remm, M., 2007. Fast masking of repeated primer binding sites in eukaryotic genomes. *Methods Mol. Biol.* 402, 201–18. doi:10.1007/978-1-59745-528-2\_10
- Andreson, R., Kaplinski, L., Remm, M., 2015. Fast masking of repeated primer binding sites in eukaryotic genomes. *Methods Mol. Biol.* 1275, 1–16. doi:10.1007/978-1-4939-2365-6\_1
- Arányi, T., Tusnády, G.E., 2007. BiSearch: ePCR tool for native or bisulfite-treated genomic template. *Methods Mol. Biol.* 402, 385–402. doi:10.1007/978-1-59745-528-2\_20
- Arányi, T., Váradi, A., Simon, I., Tusnády, G.E., Li, L., Dahiya, R., Marshall, O., Frommer, M., McDonald, L., Millar, D., Collis, C., Watt, F., Grigg, G., Molloy, P., Paul, C., Clark, S., Harrison, J., Paul, C., Frommer, M., Bird, A., Laird, P., Grunau, C., Clark, S., Rosenthal, A., Tusnády, G., Simon, I., Váradi, A., Arányi, T., Kämpke, T., Kieninger, M., Mecklenburg, M., Herman, J., Graff, J., Myohanen, S., Nelkin, B., Baylin, S., Wetmur, J., Sninsky, J., Down, T., Durbin, R., Fernandez-Suarez, X., Flicek, P., Graf, S., Hammond, M., Herrero, J., Howe, K., Iyer, V., Jekosch, K., Kahari, A., Kasprzyk, A., Keefe, D., Kokocinski, F., Kulesha, E., London, D., Longden, I., Melsopp, C., Meidl, P., Overduin, B., Parker, A., Proctor, G., Pric, A., Rae, M., Rios, D., Redmond, S., Schuster, M., Sealy, I., Searle, S., Severin, J., Slater, G., Smedley, D., Smith, J., Stabenau, A., Stalker, J., Trevanion, S., Ureta-Vidal, A., Vogel, J., White, S., Woodwark, C., Hubbard, T., Andreson, R., Reppo, E., Kaplinski, L., Remm, M., Pattyn, F., Speleman, F., Paeppe, A. De, Vandesompele, J., Lexa, M., Horak, J., Brzobohaty, B., Cao, Y., Wang, L., Xu, K., Kou, C., Zhang, Y., Wei, G., He, J., Wang, Y., Zhao, L., 2006. The BiSearch web server. *BMC Bioinformatics* 7, 431. doi:10.1186/1471-2105-7-431
- Arvidsson, S., Kwasniewski, M., Riaño-Pachón, D.M., Mueller-Roeber, B., 2008. QuantPrime--a flexible tool for reliable high-throughput primer design for quantitative PCR. *BMC Bioinformatics* 9, 465. doi:10.1186/1471-2105-9-465
- Ashelford, K.E., Weightman, A.J., Fry, J.C., 2002. PRIMROSE: a computer program for generating and estimating the phylogenetic range of 16S rRNA oligonucleotide probes and primers in conjunction with the RDP-II database. *Nucleic Acids Res.* 30, 3481–3489. doi:10.1093/nar/gkf450
- Balla, S., Rajasekaran, S., 2007. An efficient algorithm for minimum degeneracy primer selection. *IEEE Trans. Nanobioscience* 6, 12–7.
- Bekaert, M., Teeling, E.C., 2008. UniPrime: A workflow-based platform for improved universal primer design. *Nucleic Acids Res.* 36. doi:10.1093/nar/gkn191
- Ben Zakour, N., Gautier, M., Andonov, R., Lavenier, D., Cochet, M.F., Veber, P., Sorokin, A., Le Loir, Y., 2004. GenoFrag: Software to design primers optimized for whole genome scanning by long-range PCR amplification. *Nucleic Acids Res.* 32, 17–24. doi:10.1093/nar/gkg928
- Ben Zakour, N., Le Loir, Y., 2007. Designing primers for whole genome PCR scanning using the software package GenoFrag: a software package for the design of primers dedicated to whole-genome scanning by LR-PCR. *Methods Mol. Biol.* 402, 349–368. doi:10.1385/1-59745-528-8:349
- Blick, R.J., Revel, A.T., Hansen, E.J., 2003. FindGDPs: Identification of primers for labeling microbial transcriptomes for DNA microarray analysis. *Bioinformatics* 19, 1718–1719. doi:10.1093/bioinformatics/btg218
- Boutros, P.C., Okey, A.B., 2004. PUNS: Transcriptomic- and genomic-in silico PCR for enhanced primer design. *Bioinformatics* 20, 2399–2400. doi:10.1093/bioinformatics/bth257
- Boutros, R., Stokes, N., Bekaert, M., Teeling, E.C., 2009. UniPrime2: A web service providing easier Universal Primer design. *Nucleic Acids Res.* 37. doi:10.1093/nar/gkp269
- Boyce, R., Chilana, P., Rose, T.M., 2009.

- iCODEHOP: a new interactive program for designing COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primers from multiply aligned protein sequences. *Nucleic Acids Res.* 37, W222-8. doi:10.1093/nar/gkp379
18. Brandes, J.C., Carraway, H., Herman, J.G., 2007. Optimal primer design using the novel primer design program: MSPprimer provides accurate methylation analysis of the ATM promoter. *Oncogene* 26, 6229–37. doi:10.1038/sj.onc.1210433
  19. Bridges, C.G., 1990. Olga—oligonucleotide primer design program for the Atari ST. *Bioinformatics* 6, 124–125. doi:10.1093/bioinformatics/6.2.124
  20. Brodin, J., Krishnamoorthy, M., Athreya, G., Fischer, W., Hraber, P., Gleasner, C., Green, L., Korber, B., Leitner, T., 2013. A multiple-alignment based primer design algorithm for genetically highly variable DNA targets. *BMC Bioinformatics* 14, 255. doi:10.1186/1471-2105-14-255
  21. Brown, A.M., Lo, K.S., Guelpa, P., Beaudoin, M., Rioux, J.D., Tardif, J.-C., Phillips, M.S., Lettre, G., 2010. Optimus Primer: A PCR enrichment primer design program for next-generation sequencing of human exonic regions. *BMC Res. Notes* 3, 185. doi:10.1186/1756-0500-3-185
  22. Bunce, M., Barnardo, M.C., Welsh, K.I., 1998. The PCR-SSP Manager computer program: a tool for maintaining sequence alignments and automatically updating the specificities of PCR-SSP primers and primer mixes. *Tissue Antigens* 52, 158–74.
  23. Busk, P.K., 2014. A tool for design of primers for microRNA-specific quantitative RT-qPCR. *BMC Bioinformatics* 15, 29. doi:10.1186/1471-2105-15-29
  24. Canaves, J., Morse, A., West, B., 2004. Biocomputing/Bioinformatics PCR primer selection tool optimized for high-throughput proteomics and structural genomics. *Biotechniques* 36, 1040–1042.
  25. Cao, Y., Sun, J., Zhu, J., Li, L., Liu, G., 2010. PrimerCE: Designing primers for cloning and gene expression. *Mol. Biotechnol.* 46, 113–117. doi:10.1007/s12033-010-9276-3
  26. Chang, H.W., Chuang, L.Y., Cheng, Y.H., Hung, Y.C., Wen, C.H., Gu, D.L., Yang, C.H., 2009. Prim-SNPing: A primer designer for cost-effective SNP genotyping. *Biotechniques* 46, 421–431. doi:10.2144/000113092
  27. Chavali, S., Mahajan, A., Tabassum, R., Maiti, S., Bharadwaj, D., 2005. Oligonucleotide properties determination and primer designing: a critical examination of predictions. *Bioinformatics* 21, 3918–25. doi:10.1093/bioinformatics/bti633
  28. Chen, H., Zhu, G., 1997. Computer program for calculating the melting temperature of degenerate oligonucleotides used in PCR or hybridization. *Biotechniques* 22, 1158–60.
  29. Chen, S.H., Lin, C.Y., Cho, C.S., Lo, C.Z., Hsiung, C.A., 2003. Primer Design Assistant (PDA): A web-based primer design tool. *Nucleic Acids Res.* 31, 3751–3754. doi:10.1093/nar/gkg560
  30. Chen, Y.-F., Chen, R.-C., Chan, Y.-K., Pan, R.-H., Hseu, Y.-C., Lin, E., 2009. Design of multiplex PCR primers using heuristic algorithm for sequential deletion applications. *Computational Biology and Chemistry.* doi:10.1016/j.compbiolchem.2008.12.003
  31. Cheng, Y.-H., 2015. Estimation of teaching-learning-based optimization primer design using regression analysis for different melting temperature calculations. *IEEE Trans. Nanobioscience* 14, 3–12. doi:10.1109/TNB.2014.2352351
  32. Cheng, Y.-H., 2014. Computational intelligence-based polymerase chain reaction primer selection based on a novel teaching-learning-based optimisation. *IET Nanobiotechnol.* 8, 238–46. doi:10.1049/iet-nbt.2013.0055
  33. Cheng, Y.-H., 2016. A Novel Teaching-Learning-Based Optimization for Improved Mutagenic Primer Design in Mismatch PCR-RFLP SNP Genotyping. *IEEE/ACM Trans. Comput. Biol. Bioinform.* 13, 86–98. doi:10.1109/TCBB.2015.2430354
  34. Chuang, L.-Y., Cheng, Y.-H., Yang, C.-H., 2015. PCR-CTPP design for enzyme-free SNP genotyping using memetic algorithm. *IEEE Trans. Nanobioscience* 14, 13–23. doi:10.1109/TNB.2015.2392782
  35. Chuang, L.-Y., Cheng, Y.-H., Yang, C.-H., 2013. Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnol. Lett.* 35, 1541–9. doi:10.1007/s10529-013-1249-8
  36. Chuang, L.-Y., Cheng, Y.-H., Yang, C.-H., 2012. URPD: a specific product primer design tool. *BMC Res. Notes* 5, 306. doi:10.1186/1756-0500-5-306
  37. Contreras-Moreira, B., Sachman-Ruiz, B., Figueroa-Palacios, I., Vinuesa, P., 2009. primers4clades: a web server that uses phylogenetic trees to design lineage-specific PCR primers for metagenomic and diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 37, W95–W100.

- doi:10.1093/nar/gkp377
38. Croce, O., Chevenet, F., Christen, R., 2008. OligoHeatMap (OHM): an online tool to estimate and display hybridizations of oligonucleotides onto DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 36, W154-6. doi:10.1093/nar/gkn221
  39. Cui, W., Taub, D.D., Gardner, K., 2007. qPrimerDepot: a primer database for quantitative real time PCR. *Nucleic Acids Res.* 35, D805-9. doi:10.1093/nar/gkl767
  40. Davidow, L., 1992. Selecting PCR designed mismatch primers to create diagnostic restriction sites. *Comput. Appl. Biosci.* 8, 193–194.
  41. Doi K., Imai H., 1999. A Greedy Algorithm for Minimizing the Number of Primers in Multiple PCR Experiments. *Genome Inform. Ser. Workshop Genome Inform.* 10, 73–82.
  42. Dopazo, J., Rodriguez, A., Sáiz, J.C., Sobrino, F., 1993. Design of primers for PCR amplification of highly variable genomes. *Bioinformatics* 9, 123–125. doi:10.1093/bioinformatics/9.2.123
  43. Duitama, J., Kumar, D.M., Hemphill, E., Khan, M., Măndoiu, I.I., Nelson, C.E., 2009. PrimerHunter: A primer design tool for PCR-based virus subtype identification. *Nucleic Acids Res.* 37, 2483–2492. doi:10.1093/nar/gkp073
  44. Dwivedi, B., Schmieder, R., Goldsmith, D.B., Edwards, R. a, Breitbart, M., 2012. PhiSiGns: an online tool to identify signature genes in phages and design PCR primers for examining phage diversity. *BMC Bioinformatics* 13, 37. doi:10.1186/1471-2105-13-37
  45. Eberhardt, N.L., 1992. A shell program for the design of PCR primers using genetics computer group (GCG) software (7.1) on VAX/VMS™ systems. *Biotechniques* 13, 914–918.
  46. Everett, J.K., Acton, T.B., Montelione, G.T., 2004. Primer Prim'er: a web based server for automated primer design. *J. Struct. Funct. Genomics* 5, 13–21. doi:10.1023/B:JSFG.0000029238.86387.90
  47. Fernandes, R.J., Skiena, S.S., 2002. Microarray synthesis through multiple-use PCR primer design. *Bioinformatics* 18 Suppl 1, S128-35. doi:10.1093/bioinformatics/18.suppl\_1.s128
  48. Frank, D.N., 2009. BARCRAWL and BARTAB: software tools for the design and implementation of barcoded primers for highly multiplexed DNA sequencing. *BMC Bioinformatics* 10, 362. doi:10.1186/1471-2105-10-362
  49. Frech, C., Breuer, K., Ronacher, B., Kern, T., Sohn, C., Gebauer, G., 2009. hybseek: Pathogen primer design tool for diagnostic multi-analyte assays. *Comput. Methods Programs Biomed.* 94, 152–160. doi:10.1016/j.cmpb.2008.12.007
  50. Fredslund, J., 2008. DATFAP: a database of primers and homology alignments for transcription factors from 13 plant species. *BMC Genomics* 9, 140. doi:10.1186/1471-2164-9-140
  51. Fredslund, J., Lange, M., 2007. Primique: automatic design of specific PCR primers for each sequence in a family. *BMC Bioinformatics* 8, 369. doi:10.1186/1471-2105-8-369
  52. Fredslund, J., Schausser, L., Madsen, L.H., Sandal, N., Stougaard, J., 2005. PriFi: Using a multiple alignment of related sequences to find primers for amplification of homologs. *Nucleic Acids Res.* 33. doi:10.1093/nar/gki425
  53. Fu, Q., Ruegger, P., Bent, E., Chrobak, M., Borneman, J., 2008. PRISE (PRImer SElector): Software for designing sequence-selective PCR primers. *J. Microbiol. Methods* 72, 263–267. doi:10.1016/j.mimet.2007.12.004
  54. Gadberry, M.D., Malcomber, S.T., Doust, A.N., Kellogg, E.A., 2005. Primaclade - A flexible tool to find conserved PCR primers across multiple species. *Bioinformatics* 21, 1263–1264. doi:10.1093/bioinformatics/bti134
  55. Gahoi, S., Arya, L., Anil, R., Marla, S., 2013. DPPrimer - A Degenerate PCR Primer Design Tool. *Bioinformation* 9, 937–40. doi:10.6026/97320630009937
  56. García, L.T., Cristancho, L.M., Vera, E.P., Begambre, O., 2015. A New Multiplex-PCR for Urinary Tract Pathogen Detection Using Primer Design Based on an Evolutionary Computation Method. *J. Microbiol. Biotechnol.* 25, 1714–27. doi:10.4014/jmb.1406.06079
  57. Gardès, J., Bachar, D., Croce, O., Christen, R., 2012. Patho-Genes.org: a website dedicated to gene sequences of potential bioterror bacteria and PCR primers used to amplify them. *Microb. Biotechnol.* 5, 594–8. doi:10.1111/j.1751-7915.2012.00353.x
  58. Gardner, S.N., Slezak, T., 2014. Simulate\_PCR for amplicon prediction and annotation from multiplex, degenerate primers and probes. *BMC Bioinformatics* 15, 237. doi:10.1186/1471-2105-15-237
  59. Gervais, A.L., Marques, M., Gaudreau, L., 2010. PCRTiler: Automated design of tiled and specific PCR primer pairs. *Nucleic Acids Res.* 38. doi:10.1093/nar/gkq485
  60. Gibbs, A., Armstrong, J., Mackenzie, A.M., Weiller, G.F., 1998. The GPRIME package: computer programs for identifying the best

- regions of aligned genes to target in nucleic acid hybridisation-based diagnostic tests, and their use with plant viruses. *J. Virol. Methods* 74, 67–76.
61. Giegerich, R., Meyer, F., Schleiermacher, C., 1996. GeneFisher—software support for the detection of postulated genes. *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* 4, 68–77.
  62. Gordon, P.M.K., Sensen, C.W., 2004. Osprey: a comprehensive tool employing novel methods for the design of oligonucleotides for DNA sequencing and microarrays. *Nucleic Acids Res.* 32, e133–e133. doi:10.1093/nar/gnh127
  63. Gorelenkov, V., Antipov, A., Lejnine, S., Daraselia, N., Yuryev, A., 2001. Set of novel tools for PCR primer design. *Biotechniques* 31, 1326–30.
  64. Graham, K.J., Holland, M.J., 2005. PrimerSelect: A Transcriptome-Wide Oligonucleotide Primer Pair Design Program for Kinetic RT-PCR-Based Transcript Profiling. *Methods Enzymol.* 395, 544–553. doi:10.1016/S0076-6879(05)95028-3
  65. Greuter, D., Loy, A., Horn, M., Rattei, T., 2016. probeBase—an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes and primers: new features 2016. *Nucleic Acids Res.* 44, gkv1232-. doi:10.1093/nar/gkv1232
  66. Gubelmann, C., Gattiker, A., Massouras, A., Hens, K., David, F., Decouttere, F., Rougemont, J., Deplancke, B., 2011. GETPrime: a gene- or transcript-specific primer database for quantitative real-time PCR. *Database (Oxford)*. 2011, bar040. doi:10.1093/database/bar040
  67. Guerrero, D., Bautista, R., Villalobos, D.P., Cantón, F.R., Claros, M.G., 2010. AlignMiner: a Web-based tool for detection of divergent regions in multiple sequence alignments of conserved sequences. *Algorithms Mol. Biol.* 5, 24. doi:10.1186/1748-7188-5-24
  68. Gulvik, C.A., Effler, T.C., Wilhelm, S.W., Buchan, A., Jarman, S., Deagle, B., Gales, N., Brown, M., Schwalbach, M., Hewson, I., Fuhrman, J., Brennerova, M., Josefiova, J., Brenner, V., Pieper, D., Junca, H., Azhari, N. El, Bru, D., Sarr, A., Martin-Laurent, F., Schmalenberger, A., Kertesz, M., Mehta, M., Butterfield, D., Baross, J., Bürgmann, H., Widmer, F., Sigler, W. Von, Zeyer, J., Luton, P., Wayne, J., Sharp, R., Riley, P., Chadhain, S., Schaefer, J., Crane, S., Zylstra, G., Barkay, T., Wang, G., Wang, Y., Yang, P., Luo, H., Huang, H., Wang, L., Wang, W., Lai, Q., Shao, Z., Matteson, A., Loar, S., Bourbonniere, R., Wilhelm, S., Jarman, S., Staheli, J., Boyce, R., Kovarik, D., Rose, T., Rose, T., Henikoff, J., Henikoff, S., Rose, T., Schultz, E., Henikoff, J., Pietrovski, S., McCallum, C., Fuchs, T., Malecova, B., Linhart, C., Sharan, R., Khen, M., Linhart, C., Shamir, R., Gadberry, M., Malcomber, S., Doust, A., Kellogg, E., Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Larkin, M., Blackshields, G., Brown, N., Chenna, R., McGettigan, P., Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kwok, S., Chang, S., Sninsky, J., Wang, A., Junca, H., Pieper, D., Hendrickx, B., Junca, H., Vosahlova, J., Lindner, A., Ruegg, I., Lyons, J., Newell, S., Buchan, A., Moran, M., Allen, A., Ward, B., Song, B., Malmstrom, R., Coe, A., Kettler, G., Martiny, A., Frias-Lopez, J., Kibbe, W., Kirchman, D., Yu, L., Cottrell, M., Ochsenreiter, T., Selezi, D., Quaiser, A., Bonch-Osmolovskaya, L., Schleper, C., Stach, J., Maldonado, L., Ward, A., Goodfellow, M., Bull, A., Rotthauwe, J., Witzel, K., Liesack, W., López-López, A., Bartual, S., Stal, L., Onyshchenko, O., Rodríguez-Valera, F., Sun, S., Chen, J., Li, W., Altintas, I., Lin, A., Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E., Lipman, D., Rather, L., Knapp, B., Haehnel, W., Fuchs, G., Tringe, S., Mering, C. von, Kobayashi, A., Salamov, A., Chen, K., Iwai, S., Johnson, T., Chai, B., Hashsham, S., Tiedje, J., Kwok, S., Chang, S., Sninsky, J., Wang, A., Preston, G., Liu, H., Nichols, R., Schloss, P., Westcott, S., Ryabin, T., Hall, J., Hartmann, M., Muzer, G., Dewaal, E., Uitterlinden, A., 2012. De-MetaST-BLAST: A Tool for the Validation of Degenerate Primer Sets and Data Mining of Publicly Available Metagenomes. *PLoS One* 7, e50362. doi:10.1371/journal.pone.0050362
  69. Haas, S., Vingron, M., Poustka, a, Wiemann, S., 1998. Primer design for large scale sequencing. *Nucleic Acids Res.* 26, 3006–12. doi:10.1093/nar/26.12.3006
  70. Haas, S.A., Hild, M., Wright, A.P.H., Hain, T., Talibi, D., Vingron, M., 2003. Genome-scale design of PCR primers and long oligomers for DNA microarrays. *Nucleic Acids Res.* 31, 5576–5581. doi:10.1093/nar/gkg752
  71. Han, S., Kim, D., Holland, M., Horak, C., Snyder, M., Steve, R., Helen, J., Pattyn, F., Speleman, F., Paepe, A. De, Vandesompele, J., Wang, X., Seed, B., SantaLucia, J., Rice, P., Longden, I., Bleasby, A., Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E., Lipman, D., Drenkard, E., Richter, B., Rozen, S., Stutius, L., Angell, N., Mindrinos, M., Cho, R., Oefner, P., Davis, R.,

- Ausubel, F., Matveeva, O., Mathews, D., Tsodikov, A., Shabalina, S., Gesteland, R., Atkins, J., Freier, S., Stajich, J., Block, D., Boulez, K., Brenner, S., Chervitz, S., Dagdigian, C., Fuellen, G., Gilbert, J., Korf, I., Lapp, H., Lehvaslaiho, H., Matsalla, C., Mungall, C., Osborne, B., Pocock, M., Schattner, P., Senger, M., Stein, L., Stupka, E., Wilkinson, M., Birney, E., Czechowski, T., Bari, R., Stitt, M., Scheible, W., Udvardi, M., Jack, T., Boss, P., Bastow, R., Mylne, J., Dean, C., 2006. AtRTPPrimer: database for Arabidopsis genome-wide homogeneous and specific RT-PCR primer-pairs. *BMC Bioinformatics* 7, 179. doi:10.1186/1471-2105-7-179
72. Heinze, B., Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., Bouvet, J., Demesure, B., Sodzi, N., Petit, R., Dumolin-Lapegue, S., Pemonge, M.-H., Petit, R., Fofana, B., Harvengt, L., Baudoin, J., Dujardin, P., Hamilton, M., Heinze, B., Lexer, C., Fay, M., Joseph, J., Nica, M.-S., Heinze, B., Turkec, A., Sayar, M., Heinze, B., Olmstead, R., Palmer, J., Small, R., Ryburn, J., Cronn, R., Seelanan, T., Wendel, J., Graham, S., Olmstead, R., Shaw, J., Lickey, E., Beck, J., Farmer, S., Liu, W., Miller, J., Siripun, K., Winder, C., Schilling, E., Small, R., Grivet, D., Heinze, B., Vendramin, G., Petit, R., Dhingra, A., Folta, K., Altschul, S., Madden, T., Schäffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D., Antoniw, J., Palmer, J., Shields, C., Cohen, D., Orton, T., Martin, W., Heinze, B., Tuskan, G., DiFazio, S., Jansson, S., Bohlmann, J., Grigoriev, I., Hellsten, U., Putnam, N., Ralph, S., Rombauts, S., Salamov, A., Schein, J., Sterck, L., Aerts, A., Bhalerao, R., Bhalerao, R., Blaudez, D., Boerjan, W., Brun, A., Brunner, A., Busov, V., Campbell, M., Carlson, J., Chalot, M., Chapman, J., Chen, G.-L., Cooper, D., Coutinho, P., Couturier, J., Covert, S., Cronk, Q., Cunningham, R., Davis, J., Degroove, S., Dejardin, A., dePamphilis, C., Detter, J., Dirks, B., Dubchak, I., Duplessis, S., Ehlting, J., Ellis, B., Gendler, K., Goodstein, D., Gribskov, M., Grimwood, J., Groover, A., Gunter, L., Hamberger, B., Heinze, B., Helariutta, Y., Henrissat, B., Holligan, D., Holt, R., Huang, W., Islam-Faridi, N., Jones, S., Jones-Rhoades, M., Jorgensen, R., Joshi, C., Kangasjarvi, J., Karlsson, J., Kelleher, C., Kirkpatrick, R., Kirst, M., Kohler, A., Kalluri, U., Larimer, F., Leebens-Mack, J., Leple, J.-C., Locascio, P., Lou, Y., Lucas, S., Martin, F., Montanini, B., Napoli, C., Nelson, D., Nelson, C., Nieminen, K., Nilsson, O., Pereda, V., Peter, G., Philippe, R., Pilate, G., Poliakov, A., Razumovskaya, J., Richardson, P., Rinaldi, C., Ritland, K., Rouze, P., Ryaboy, D., Schmutz, J., Schrader, J., Segerman, B., Shin, H., Siddiqui, A., Sterky, F., Terry, A., Tsai, C.-J., Uberbacher, E., Unneberg, P., Vahala, J., Wall, K., Wessler, S., Yang, G., Yin, T., Douglas, C., Marra, M., Sandberg, G., Peer, Y. Van de, Rokhsar, D., 2007. A database of PCR primers for the chloroplast genomes of higher plants. *Plant Methods* 3, 4. doi:10.1186/1746-4811-3-4
73. Hillier, L., Green, P., 1991. OSP: A computer program for choosing PCR and DNA sequencing primers. *Genome Res.* 1, 124–128. doi:10.1101/gr.1.2.124
74. Holleley, C.E., Geerts, P.G., 2009. Multiplex Manager 1.0: a cross-platform computer program that plans and optimizes multiplex PCR. *Biotechniques* 46, 511–7. doi:10.2144/000113156
75. Hou, J., 2002. Design of endonuclease restriction sites into primers for PCR cloning. *Bioinforma. Appl. NOTE* 18, 1690–1691.
76. Hu, Z.L., Glenn, K., Ramos, A.M., Otieno, C.J., Reecy, J.M., Rothschild, M.F., 2005. Expeditor: A pipeline for designing primers using human gene structure and livestock animal EST information. *J. Hered.* 96, 80–82. doi:10.1093/jhered/esi015
77. Huang, Y.-T., Yang, J., Chrobak, M., Borneman, J., 2014. PRISE2: software for designing sequence-selective PCR primers and probes. *BMC Bioinformatics* 15, 317. doi:10.1186/1471-2105-15-317
78. Hysom, D.A., Naraghi-Arani, P., Elsheikh, M., Carrillo, A.C., Williams, P.L., Gardner, S.N., 2012. Skip the alignment: degenerate, multiplex primer and probe design using K-mer matching instead of alignments. *PLoS One* 7, e34560. doi:10.1371/journal.pone.0034560
79. Jabado, O.J., Palacios, G., Kapoor, V., Hui, J., Renwick, N., Zhai, J., Briese, T., Lipkin, W.I., 2006. Greene SCPrimer: A rapid comprehensive tool for designing degenerate primers from multiple sequence alignments. *Nucleic Acids Res.* 34, 6605–6611. doi:10.1093/nar/gkl966
80. Jang, S.Y., Kim, M.S., Park, M.S., Lee, K.M., Chung, H.W., Chun, J., Lee, C.H., 2010. Designing primers from multiple sequences using Matchup program to improve detection of hepatitis B virus by polymerase chain reaction. *J. Microbiol.* 48, 111–6. doi:10.1007/s12275-009-0282-8
81. Jarman, S.N., 2004. Amplicon: Software for

- designing PCR primers on aligned DNA sequences. *Bioinformatics* 20, 1644–1645. doi:10.1093/bioinformatics/bth121
82. Kalendar, R., Lee, D., Schulman, A.H., 2011. Java web tools for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis. *Genomics* 98, 137–144. doi:10.1016/j.ygeno.2011.04.009
  83. Kalendar, R., Lee, D., Schulman, A.H., 2014. FastPCR Software for PCR, In Silico PCR, and Oligonucleotide Assembly and Analysis, in: *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*. pp.271–302. doi:10.1007/978-1-62703-764-8\_18
  84. Kämpke, T., Kieninger, M., Mecklenburg, M., 2001. Efficient primer design algorithms. *Bioinformatics* 17, 214–225.
  85. Kämpke, T., 2007. The reference point method in primer design. *Methods Mol. Biol. Clift. Nj* 402, 75–92. doi:10.1007/978-1-59745-528-2\_4
  86. Kaplinski, L., Andreson, R., Puurand, T., Remm, M., 2005. MultiPLX: automatic grouping and evaluation of PCR primers. *Bioinformatics* 21, 1701–2. doi:10.1093/bioinformatics/bti219
  87. Kaplinski, L., Remm, M., 2015. MultiPLX: automatic grouping and evaluation of PCR primers. *Methods Mol. Biol.* 1275, 127–42. doi:10.1007/978-1-4939-2365-6\_9
  88. Karikó, K., 1995. Identification of conserved sequences for PCR primer design by multiple alignments of dot matrix plots. *Biotechniques* 18, 1048–9.
  89. Karnik, A., Karnik, R., Grefen, C., Ling, M., Robinson, B., Braman, J., Papworth, C., Greener, A., Wang, W., Malcolm, B., Lu, L., Patel, H., Bissler, J., Evans, P., Liu, C., Grefen, C., Chen, Z., Honsbein, A., Donald, N., Hills, A., Blatt, M., Horak, J., Grefen, C., Berendzen, K., Hahn, A., Stierhof, Y., Stadelhofer, B., Rashtchian, A., Thornton, C., Heidecker, G., Little, J., Mount, D., Zhang, B., Zhang, X., An, X., Ran, D., Zhou, Y., Lu, J., Zheng, L., Baumann, U., Reymond, J., Liu, H., Naismith, J., Qi, D., Scholthof, K., Park, J., Labaer, J., Shankarappa, B., Vijayananda, K., Ehrlich, G., Turchin, A., Lawler, J., Breslauer, K., Frank, R., Blocker, H., Marky, L., Freier, S., Kierzek, R., Jaeger, J., Sugimoto, N., Caruthers, M., Neilson, T., Sentenac, H., Bonneaud, N., Minet, M., Lacroute, F., Salmon, J., Gaymard, F., Dreyer, I., Blatt, M., Grefen, C., Obrdlik, P., Harter, K., Tang, W., Ruknudin, A., Yang, W., Shaw, S., Knickerbocker, A., Kurtz, S., Grefen, C., Lalonde, S., Obrdlik, P., 2013. SDM-Assist software to design site-directed mutagenesis primers introducing “silent” restriction sites. *BMC Bioinformatics* 14, 105. doi:10.1186/1471-2105-14-105
  90. Kim, H., Kang, N., An, K., Koo, J., Kim, M.-S., 2016. MRPrimerW: a tool for rapid design of valid high-quality primers for multiple target qPCR experiments. *Nucleic Acids Res.* 44, W259–66. doi:10.1093/nar/gkw380
  91. Kim, H., Kang, N., Chon, K.W., Kim, S., Lee, N., Koo, J., Kim, M.S., 2015. MRPrimer: A MapReduce-based method for the thorough design of valid and ranked primers for PCR. *Nucleic Acids Res.* 43. doi:10.1093/nar/gkv632
  92. Kim, N., Lee, C., 2007. QPRIMER: A quick web-based application for designing conserved PCR primers from multigenome alignments. *Bioinformatics* 23, 2331–2333. doi:10.1093/bioinformatics/btm343
  93. Kimura, Y., Soma, T., Kasahara, N., Delobel, D., Hanami, T., Tanaka, Y., de Hoon, M.J.L., Hayashizaki, Y., Usui, K., Harbers, M., 2016. Edesign: Primer and Enhanced Internal Probe Design Tool for Quantitative PCR Experiments and Genotyping Assays. *PLoS One* 11, e0146950. doi:10.1371/journal.pone.0146950
  94. Kitchen, J.L., Moore, J.D., Palmer, S.A., Allaby, R.G., 2012. MCMC-ODPR: primer design optimization using Markov Chain Monte Carlo sampling. *BMC Bioinformatics* 13, 287. doi:10.1186/1471-2105-13-287
  95. Konwar, K., Mandoiu, I., Russell, A., Shvartsman, A., 2004. Approximation Algorithms for Minimum PCR Primer Set Selection with Amplification Length and Uniqueness Constraints.
  96. Koressaar, T., Remm, M., 2007. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* 23, 1289–91. doi:10.1093/bioinformatics/btm091
  97. Kovacova, V., Janousek, B. Bisprimer—a program for the design of primers for bisulfite-based genomic sequencing of both plant and Mammalian DNA samples. *J. Hered.* 103, 308–12. doi:10.1093/jhered/esr137
  98. Krauss, U., Eggert, T., 2005. insilico.mutagenesis: A primer selection tool designed for sequence scanning applications used in directed evolution experiments. *Biotechniques* 39, 679–682. doi:10.2144/000112013
  99. Kushwaha, G., Srivastava, G.P., Xu, D., 2015. PRIMEGENSw3: a web-based tool for high-throughput primer and probe design. *Methods Mol. Biol.* 1275, 181–99. doi:10.1007/978-1-4939-2365-6\_14



100. Kwok, S., Chang, S.Y., Sninsky, J.J., Wang, A., 1994. A guide to the design and use of mismatched and degenerate primers. *PCR Methods Appl.* 3, S39-47.
101. Lai, D., Love, D.R., 2012. Automation of a primer design and evaluation pipeline for subsequent sequencing of the coding regions of all human Refseq genes. *Bioinformatics* 8, 365–8. doi:10.6026/97320630008365
102. Lamprecht, A.-L., Margaria, T., Steffen, B., Sczyrba, A., Hartmeier, S., Giegerich, R., 2008. GeneFisher-P: variations of GeneFisher as processes in Bio-jETL. *BMC Bioinformatics* 9 Suppl 4, S13. doi:10.1186/1471-2105-9-S4-S13
103. Lane, C.E., Hulgan, D., O'Quinn, K., Benton, M.G., 2015. CEMAsuite: open source degenerate PCR primer design. *Bioinformatics* 31, 3688–90. doi:10.1093/bioinformatics/btv420
104. Leber, M., Kaderali, L., Schönhuth, A., Schrader, R., 2005. A fractional programming approach to efficient DNA melting temperature calculation. *Bioinformatics* 21, 2375–82. doi:10.1093/bioinformatics/bti379
105. Lee, W., Wong, C.W., Leong, W., Miller, L.D., Sung, W., Zhang, T., Breitbart, M., Lee, W., Run, J., Wei, C., Soh, S., Hibberd, M., Liu, E., Rohwer, F., Ruan, Y., Wang, D., Coscoy, L., Zylberberg, M., Avila, P., Boushey, H., Ganem, D., DeRisi, J., Mehlmann, M., Dawson, E., Townsend, M., Smagala, J., Moore, C., Smith, C., Cox, N., Kuchta, R., Rowlen, K., Chou, C., Lee, T., Chen, C., Hsiao, H., Lin, Y., Ho, M., Yang, P., Peck, K., SantaLucia, J., Allawi, H., Seneviratne, P., Lockhart, D., Dong, H., Byrne, M., Follettie, M., Gallo, M., Chee, M., Mittmann, M., Wang, C., Kobayashi, M., Horton, H., Brown, E., Wang, D., Urisman, A., Liu, Y., Springer, M., Ksiazek, T., Erdman, D., Mardis, E., Hickenbotham, M., Magrini, V., Eldred, J., Latreille, J., Wilson, R., Ganem, D., DeRisi, J., Sung, W., Lee, W., Holloway, A., Laar, A. Van, Tothill, R., Bowtell, D., Cherkasova, E., Laassri, M., Chrizhikov, V., Korotkova, E., Dragunsky, E., Agol, V., Chumakov, K., Nygaard, V., Hovig, E., Bustin, S., Nolan, T., Pinto, F., Svensson, H., Lindblad, P., Wong, C., Lee, W., Leong, W., Soh, W., Kartasasmita, C., Simoes, A., Hibberd, M., Sung, W., Miller, L., Pang, X., Preiksaitis, J., Lee, B., Grothues, D., Smith, C., Cantor, C., Raghunathan, A., Ferguson, H., Bornarth, C., Song, W., Driscoll, M., Lasken, R., Quan, P., Palacios, G., Jabado, O., Conlan, S., Hirschberg, D., Pozo, F., Jack, P., Cisterna, D., Renwick, N., Hui, J., Drysdale, A., Amos-Ritchie, R., Baumeister, E., Savy, V., Lager, K., Richt, J., Boyle, D., Garcia-Sastre, A., Casas, I., Perez-Brena, P., Briese, T., Lipkin, W., Nguyen, H., Southern, E., Hu, A., Colella, M., Tam, J., Rappaport, R., Cheng, S., Contoli, M., Message, S., Laza-Stanca, V., Edwards, M., Wark, P., Bartlett, N., Keadze, T., Mallia, P., Stanciu, L., Parker, H., Slater, L., Lewis-Antes, A., Kon, O., Holgate, S., Davies, D., Kotenko, S., Papi, A., Johnston, S., Moës, E., Vijgen, L., Keyaerts, E., Zlateva, K., Li, S., Maes, P., Pyrc, K., Berkhout, B., Hoek, L. der, Ranst, M. Van, Broude, N., Driscoll, K., Cantor, C., Simmler, H., Singpiel, H., Männer, R., Nuwaysir, E., Huang, W., Albert, T., Singh, J., Nuwaysir, K., Pitas, A., Richmond, T., Gorski, T., Berg, J., Ballin, J., McCormick, M., Norton, J., Pollock, T., Sumwalt, T., Butcher, L., Porter, D., Molla, M., Hall, C., Blattner, F., Sussman, M., Wallace, R., Cerrina, F., Green, R., Robertson, S., Roca, A., Alonso, P., Simoes, E., Kartasasmita, C., Olaleye, D., Odaibo, G., Collinson, M., Venter, M., Zhu, Y., Wright, P., Smalling, T., Sefers, S., Li, H., Tang, Y., Tang, Y., Heimgartner, P., Tollefson, S., Berg, T., Rys, P., Li, H., Smith, T., Persing, D., Wright, P., Bohlander, S., Espinosa, I., Rafael, null, Beau, M. Le, Rowley, J., Diaz, M., Wong, C., Albert, T., Vega, V., Norton, J., Cutler, D., Richmond, T., Stanton, L., Liu, E., Miller, L., Burpo, F., Howley, P., Israel, M., Law, M.-F., Martin, M., 2008. LOMA: A fast method to generate efficient tagged-random primers despite amplification bias of random PCR on pathogens. *BMC Bioinformatics* 9, 368. doi:10.1186/1471-2105-9-368
106. Lefever S., Vandesompele J., Speleman F., Pattyn F. 2009. RTPrimerDB: the portal for real-time PCR primers and probes. *Nucleic Acids Res.* 37 (Database issue) D942-5. doi: 10.1093/nar/gkn777.
107. Leister, D., Varotto, C., 2007. GST-PRIME: an algorithm for genome-wide primer design. *Methods Mol. Biol.* 402, 141–58. doi:10.1007/978-1-59745-528-2\_7
108. Li, L.-C., 2007. Designing PCR primer for DNA methylation mapping. *Methods Mol. Biol.* 402, 371–84.
109. Li, L.-C., Dahiya, R., 2002. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics* 18, 1427–1431. doi:10.1016/0014-5793(85)80078-8
110. Li, P., Kupfer, K.C., Davies, C.J., Burbee, D., Evans, G.A., Garner, H.R., 1997. PRIMO: A

- primer design program that applies base quality statistics for automated large-scale DNA sequencing. *Genomics* 40, 476–485. doi:10.1006/Geno.1996.4560
111. Linhart, C., Shamir, R., 2002. The degenerate primer design problem. *Bioinformatics* 18 Suppl 1, S172–81.
  112. Linhart, C., Shamir, R., 2005. The degenerate primer design problem: theory and applications. *J. Comput. Biol.* 12, 431–56. doi:10.1089/cmb.2005.12.431
  113. Linhart C., Shamir R. 2007. Degenerate primer design: theoretical analysis and the HYDEN program. *Methods Mol Biol.* 402, 221–44. DOI: 10.1007/978-1-59745-528-2\_11
  114. Liu, S., Tinker, N.A., Molnar, S.J., Mather, D.E., 2004. EC\_oligos: automated and whole-genome primer design for exons within one or between two genomes. *Bioinformatics* 20, 3668–9. doi:10.1093/bioinformatics/bth413
  115. Lowe, T., Sharefkin, J., Yang, S.Q., Dieffenbach, C.W., 1990. A computer program for selection of oligonucleotide primers for polymerase chain reactions. *Nucleic Acids Res.* 18, 1757–1761. doi:10.1093/nar/18.7.1757
  116. Lucas K., Busch M., Mössinger S., Thompson J.A., 1991. An improved microcomputer program for finding gene- or gene family-specific oligonucleotides suitable as primers for polymerase chain reactions or as probes. *Comput. Appl. Biosci.* 7, 525–529.
  117. Mann, T., Humbert, R., Dorschner, M., Stamatoyannopoulos, J., Noble, W.S., 2009. A thermodynamic approach to PCR primer design. *Nucleic Acids Res.* 37. doi:10.1093/nar/gkp443
  118. Markham, N.R., Zuker, M., 2005. DINAMelt web server for nucleic acid melting prediction. *Nucleic Acids Res.* 33, W577–81. doi:10.1093/nar/gki591
  119. Marshall, O., 2007. Graphical design of primers with PerlPrimer. *Methods Mol. Biol.* 402, 403–414. doi:10.1007/978-1-59745-528-2\_21
  120. Marshall, O.J., 2004. PerlPrimer: Cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics* 20, 2471–2472. doi:10.1093/bioinformatics/bth254
  121. McKay, S.J., Jones, S.J.M., 2002. AcePrimer: automation of PCR primer design based on gene structure. *Bioinformatics* 18, 1538–1539.
  122. Megléc, E., Costedoat, C., Dubut, V., Gilles, A., Malausa, T., Pech, N., Martin, J.F., 2009. QDD: A user-friendly program to select microsatellite markers and design primers from large sequencing projects. *Bioinformatics.* doi:10.1093/bioinformatics/btp670
  123. Menzel, P., Stadler, P.F., Gorodkin, J., 2011. maxAlike: Maximum likelihood-based sequence reconstruction with application to improved primer design for unknown sequences. *Bioinformatics* 27, 317–325. doi:10.1093/bioinformatics/btq651
  124. Montpetit, M.L., Cassol, S., Salas, T., O’Shaughnessy, M. V., 1992. OLIGSCAN: a computer program to assist in the design of PCR primers homologous to multiple DNA sequences. *J. Virol. Methods* 36, 119–128. doi:10.1016/0166-0934(92)90143-2
  125. Mořkovský, L., Pačes, J., Řídl, J., Reifová, R., 2015. Scrimer: designing primers from transcriptome data. *Mol. Ecol. Resour.* 15, 1415–20. doi:10.1111/1755-0998.12403
  126. Müller, K., 2005. SeqState: primer design and sequence statistics for phylogenetic DNA datasets. *Appl. Bioinformatics* 4, 65–9.
  127. Najafabadi, H.S., Saberi, A., Torabi, N., Chamankhah, M., 2008. MAD-DPD: designing highly degenerate primers with maximum amplification specificity. *Biotechniques* 44, 519–20, 522, 524–6. doi:10.2144/000112694
  128. Najafabadi, H.S., Torabi, N., Chamankhah, M., 2008a. Designing multiple degenerate primers via consecutive pairwise alignments. *BMC Bioinformatics* 9, 55. doi:10.1186/1471-2105-9-55
  129. Nash, J.H., 1993. A computer program to calculate and design oligonucleotide primers from amlno acid sequences. *Comput. Appl. Biosci.* 9, 469–471.
  130. Nielsen, D.A., Novoradovsky, A., Goldman, D., 1995. SSCP primer design based on single-strand DNA structure predicted by a DNA folding program. *Nucleic Acids Res.* 23, 2287–2291. doi:10.1093/nar/23.12.2287
  131. Niu, T., Hu, Z., 2004. SNPICKER: A graphical tool for primer picking in designing mutagenic endonuclease restriction assays. *Bioinformatics* 20, 3263–3265. doi:10.1093/bioinformatics/bth360
  132. Nonis, A., Scortegagna, M., Nonis, A., Ruperti, B., 2011. PRATo: A web-tool to select optimal primer pairs for qPCR, *Biochemical and Biophysical Research Communications.* doi:10.1016/j.bbrc.2011.10.148
  133. O’Halloran, D.M., 2015. PrimerView: high-throughput primer design and visualization. *Source Code Biol. Med.* 10, 8. doi:10.1186/s13029-015-0038-2
  134. O’Halloran, D.M., 2015a. STITCHER: A web

- resource for high-throughput design of primers for overlapping PCR applications. *Biotechniques* 58, 325–8. doi:10.2144/000114301
135. O'Halloran, D.M., 2016. PrimerMapper: high throughput primer design and graphical assembly for PCR and SNP detection. *Sci. Rep.* 6, 20631. doi:10.1038/srep20631
136. O'Hara, P.J., Venezia, D., 1991. PRIMEGEN, a tool for designing primers from multiple alignments. *Comput. Appl. Biosci.* 7, 533–4.
137. Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M., UGENE team, 2012. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* 28, 1166–7. doi:10.1093/bioinformatics/bts091
138. Olsen, L.R., Hansen, N.B., Bonde, M.T., Genee, H.J., Holm, D.K., Carlsen, S., Hansen, B.G., Patil, K.R., Mortensen, U.H., Wernersson, R., 2011. PHUSER (Primer Help for USER): A novel tool for USER fusion primer design. *Nucleic Acids Res.* 39. doi:10.1093/nar/gkr394
139. Onodera, K., Melcher, U., 2002. VirOligo: a database of virus-specific oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 30, 203–4.
140. Osborne, B.I., 1992. HyperPCR: a Macintosh Hypercard program for the determination of optimal PCR annealing temperature. *Comput. Appl. Biosci.* 8, 83.
141. Pandey, R.V., Walter, P., Kallmeyer, R., Beikircher, G., Pabinger, S., Kriegner, A., Weinhäusel, A., 2016. MSRE-HTPrimer: a high-throughput and genome-wide primer design pipeline optimized for epigenetic research. *Clin. Epigenetics* 8, 26. doi:10.1186/s13148-016-0190-9
142. Paneto, G.G., De Paula Careta, F., 2014. Designing primers for snapshot technique. *Methods Mol. Biol.* 1275, 165–172. doi:10.1007/978-1-4939-2365-6\_12
143. Panjkovich, A., Norambuena, T., Melo, F., 2005. dnaMATE: a consensus melting temperature prediction server for short DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 33, W570-2. doi:10.1093/nar/gki379
144. Pattyn, F., Hoebeek, J., Robbrecht, P., Michels, E., De Paepe, A., Bottu, G., Coornaert, D., Herzog, R., Speleman, F., Vandesompele, J., 2006. methBLAST and methPrimerDB: web-tools for PCR based methylation analysis. *BMC Bioinformatics* 7, 496. doi:10.1186/1471-2105-7-496
145. Pattyn, F., Robbrecht, P., De Paepe, A., Speleman, F., Vandesompele, J., 2006. RTPrimerDB: the real-time PCR primer and probe database, major update 2006. *Nucleic Acids Res.* 34, D684-8. doi:10.1093/nar/gkj155
146. Pattyn, F., Speleman, F., De Paepe, A., Vandesompele, J., 2003. RTPrimerDB: the real-time PCR primer and probe database. *Nucleic Acids Res.* 31, 122–3.
147. Pauthenier, C., Faulon, J.L., 2014. PrecisePrimer: An easy-to-use web server for designing PCR primers for DNA library cloning and DNA shuffling. *Nucleic Acids Res.* 42. doi:10.1093/nar/gku393
148. Pearson, W.R., Robins, G., Wrege, D.E., Zhang, T., 1995. A new approach to primer selection in polymerase chain reaction experiments. *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* 3, 285–91.
149. Penkett, C.J., Birtle, Z.E., Bähler, J., 2006. Simplified primer design for PCR-based gene targeting and microarray primer database: two web tools for fission yeast. *Yeast* 23, 921–928. doi:10.1002/yea.1422
150. Pesole, G., Liuni, S., Grillo, G., Belichard, P., Trenkle, T., Welsh, J., McClelland, M., 1998. GeneUp: A program to select short PCR primer pairs that occur in multiple members of sequence lists. *Biotechniques* 25, 112–123.
151. Pessoa, A.M., Pereira, S., Teixeira, J., 2010. PrimerIdent: A web based tool for conserved primer design. *Bioinformatics* 5, 52–4.
152. Phillips, A.R., Robertson, A.L., Batzli, J., Harris, M., Miller, S., 2008. Aligning goals, assessments, and activities: an approach to teaching PCR and gel electrophoresis. *CBE Life Sci. Educ.* 7, 96–106. doi:10.1187/cbe.07-07-0052
153. Piriyaopongsa, J., Ngamphiw, C., Assawamakin, A., Wangkumhang, P., Suwannasri, P., Ruangrit, U., Agavatpanitch, G., Tongsimma, S., 2009. REXPrimer: an integrated primer designing tool increases PCR effectiveness by avoiding 3' SNP-in-primer and mis-priming from structural variation. *BMC Genomics* 10 Suppl 3, S4. doi:10.1186/1471-2164-10-S3-S4
154. Plasterer, T.N., 1997. PRIMERSELECT. Primer and probe design. *Methods Mol. Biol.* 70, 291–302.
155. Png, A.E.H., Choo, K.W., Lee, C.I.P., Leong, S.H., Kon, O.L., 2006. Primer design for Whole Genome Amplification using genetic algorithms. *In Silico Biol.* 6, 505–14.
156. Podowski, R.M., Sonhammer, E.L., 2001. MEDUSA: large scale automatic selection and visual assessment of PCR primer pairs. *Bioinformatics* 17, 656–7.
157. Proutski, V., Holmes, E.C., 1996. Primer Master: a new program for the design and

- analysis of PCR primers. *Bioinformatics* 12, 253–255.  
doi:doi:10.1093/bioinformatics/12.3.253
158. Qu, W., Zhang, C., 2015. Selecting specific PCR primers with MFEprimer. *Methods Mol. Biol.* 1275, 201–13. doi:10.1007/978-1-4939-2365-6\_15
159. Qu, W., Zhou, Y., Zhang, Y., Lu, Y., Wang, X., Zhao, D., Yang, Y., Zhang, C., 2012. MFEprimer-2.0: a fast thermodynamics-based program for checking PCR primer specificity. *Nucleic Acids Res.* 40, W205-8. doi:10.1093/nar/gks552
160. Rachlin J., Ding C., Cantor C., Kasif S. 2005. MuPlex: multi-objective multiplex PCR assay design. *Nucleic Acids Res.* 33. W544-7.
161. Raddatz, G., Dehio, M., Meyer, T.F., Dehio, C., 2001. PrimeArray: genome-scale primer design for DNA-microarray construction. *Bioinformatics* 17, 98–99. doi:doi:10.1093/bioinformatics/17.1.98
162. Ramirez-Gonzalez, R.H., Segovia, V., Bird, N., Fenwick, P., Holdgate, S., Berry, S., Jack, P., Caccamo, M., Uauy, C., 2015. RNA-Seq bulked segregant analysis enables the identification of high-resolution genetic markers for breeding in hexaploid wheat. *Plant Biotechnol. J.* 13, 613–24. doi:10.1111/pbi.12281
163. Ramirez-Gonzalez, R.H., Uauy, C., Caccamo, M., 2015a. PolyMarker: A fast polyploid primer design pipeline. *Bioinformatics* 31, 2038–2039. doi:10.1093/bioinformatics/btv069
164. Riley, M.C., Aubrey, W., Young, M., Clare, A., Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B., Piriyaongsa, J., Ngamphiw, C., Assawamakin, A., Wangkumhang, P., Suwannasri, P., Arvidsson, S., Kwasniewski, M., Riaño-Pachon, D., Mueller-Roeber, B., Li, K., Brownley, A., Stockwell, T., Beeson, K., McIntosh, T., Boutros, R., Stokes, N., Bekaert, M., Teeling, E., You, F., Huo, N., Gu, Y., Luo, M., Ma, Y., Tsai, M., Lin, Y., Cheng, Y., Lee, K., Huang, C., You, F., Huo, N., Gu, Y., Lazo, G., Dvorak, J., Shen, Z., Qu, W., Wang, W., Lu, Y., Wu, Y., Gordon, P., Sensen, C., Fredslund, J., Lange, M., Akada, R., Kitagawa, T., Kaneko, S., Toyonaga, D., Ito, S., Blankenberg, D., Kuster, G. Von, Coraor, N., Ananda, G., Lazarus, R., Goecks, J., Nekrutenko, A., Taylor, J., Giardine, B., Riemer, C., Hardison, R., Burhans, R., Elnitski, L., Thiel, T., Michalek, W., Varshney, R., Graner, A., Jr, J.S., Allawi, H., Seneviratne, P., Breslauer, K., Frank, R., Blöcker, H., Marky, L., Freier, S., Kierzek, R., Jaeger, J., Sugimoto, N., Caruthers, M., Wallace, R., Shaffer, J., Murphy, R., Bonner, J., Hirose, T., Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., Miller, W., Pearson, W., Pearson, W., Lipman, D., 2013. PD5: A General Purpose Library for Primer Design Software. *PLoS One* 8, e80156. doi:10.1371/journal.pone.0080156
165. Ringquist, S., Pecoraro, C., Gilchrist, C.M.S., Styche, A., Rudert, W.A., Benos, P. V., Trucco, M., 2005. SOP3v2: Web-based selection of oligonucleotide primer trios for genotyping of human and mouse polymorphisms. *Nucleic Acids Res.* 33. doi:10.1093/nar/gki483
166. Robertson, A.L., Phillips, A.R., 2008. Integrating PCR theory and bioinformatics into a research-oriented primer design exercise. *CBE Life Sci. Educ.* 7, 89–95. doi:10.1187/cbe.07-07-0051
167. Rose T.M., Schultz E.R., Henikoff J.G., Pietrokovski S., McCallum C.M., Henikoff S. 1998. Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nucleic Acids Res.* 26. 1628-35.
168. Rose T.M., Henikoff J.G., Henikoff S. 2003. CODEHOP (CONsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) PCR primer design. *Nucleic Acids Res.* 31. 3763-6.
169. Rouillard, J.-M., Herbert, C.J., Zuker, M., 2002. OligoArray: genome-scale oligonucleotide design for microarrays. *Bioinformatics* 18, 486–487. doi:10.1093/bioinformatics/18.3.486
170. Rouillard, J.-M., Zuker, M., Gulari, E., 2003. OligoArray 2.0: design of oligonucleotide probes for DNA microarrays using a thermodynamic approach. *Nucleic Acids Res.* 31, 3057–3062. doi:10.1093/nar/gkg426
171. Rozas, J., 1991. A Program to Optimize the Design of Oligonucleotides for PCR Amplification. *J. Hered.* 82, 84.
172. Rozen, S., Skaletsky, H., 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.* 132, 365–386. doi:10.1385/1-59259-192-2:365
173. Rychlik, W., 1993. Selection of primers for polymerase chain reaction. *Methods Mol. Biol.* 15, 31–40. doi:10.1385/0-89603-244-2:31
174. Rychlik, W., Rhoads, R.E., 1989. A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and in vitro amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 17, 8543–8551. doi:10.1093/nar/17.21.8543
175. Rychlik, W., 1995. Selection of primers for polymerase chain reaction. *Mol. Biotechnol.* 3, 129–134. doi:10.1007/BF02789108

176. Rychlik, W., 2007. OLIGO 7 primer analysis software. *Methods Mol. Biol.* doi:10.1007/978-1-59745-528-2\_2
177. Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 230. 1350-4. DOI: 10.1126/science.2999980
178. Salomonsen, B., Mortensen, U.H., Halkier, B.A., 2014. USER-derived cloning methods and their primer design. *Methods Mol. Biol.* 1116, 59–72. doi:10.1007/978-1-62703-764-8\_5
179. Sandhu, K.S., Acharya, K.K., 2005. ExPrimer: To design primers from exon-exon junctions. *Bioinformatics* 21, 2091–2092. doi:10.1093/bioinformatics/bti304
180. Sarika, Arora, V., Iquebal, M.A., Rai, A., Kumar, D., 2013. PIPEMicroDB: microsatellite database and primer generation tool for pigeonpea genome. *Database (Oxford)*. 2013, bas054. doi:10.1093/database/bas054
181. Schageman, J.J., Horton, C.J., Niu, S., Garner, H.R., Pertsemlidis, A., 2004. ELXR: a resource for rapid exon-directed sequence analysis. *Genome Biol.* 5, R36. doi:10.1186/gb-2004-5-5-r36
182. Schretter, C., Milinkovitch, M.C., 2006. OligoFactory: a visual tool for interactive oligonucleotide design. *Bioinformatics* 22, 115–6. doi:10.1093/bioinformatics/bti728
183. Shao, C., Meng, Y., Lv, S., Zhong, W., Wang, Z., Chen, M., 2010. CloneAssistant 1.0: A stand-alone software for automated cloning primer design. *J. Biotechnol.* 150, 294–298. doi:10.1016/j.jbiotec.2010.09.952
184. Silbermann, J., Wernicke, C., Pospisil, H., Frohme, M., 2013. RefPrimeCouch--a reference gene primer CouchApp. *Database (Oxford)*. 2013, bat081. doi:10.1093/database/bat081
185. Singh, V.K., Mangalam, A.K., Dwivedi, S., Naik, S., 1998. Primer premier: program for design of degenerate primers from a protein sequence. *Biotechniques* 24, 318–9.
186. Sobhy, H., Colson, P., 2012. Gemi: PCR Primers Prediction from Multiple Alignments. *Comp. Funct. Genomics* 2012, 1–5. doi:10.1155/2012/783138
187. Souvenir, R., Buhler, J., Stormo, G., Zhang, W., 2007. An iterative method for selecting degenerate multiplex PCR primers. *Methods Mol. Biol.* 402, 245–68. doi:10.1007/978-1-59745-528-2\_12
188. Spandidos, A., Wang, X., Wang, H., Dragnev, S., Thurber, T., Seed, B., 2008. A comprehensive collection of experimentally validated primers for Polymerase Chain Reaction quantitation of murine transcript abundance. *BMC Genomics* 9, 633. doi:10.1186/1471-2164-9-633
189. Spandidos, A., Wang, X., Wang, H., Seed, B., 2010. PrimerBank: a resource of human and mouse PCR primer pairs for gene expression detection and quantification. *Nucleic Acids Res.* 38, D792-9. doi:10.1093/nar/gkp1005
190. Srivastava, G.P., Guo, J., Shi, H., Xu, D., 2008. PRIMEGENS-v2: genome-wide primer design for analyzing DNA methylation patterns of CpG islands. *Bioinformatics* 24, 1837–42. doi:10.1093/bioinformatics/btn320
191. Srivastava, G.P., Hanumappa, M., Kushwaha, G., Nguyen, H.T., Xu, D., 2011. Homolog-specific PCR primer design for profiling splice variants. *Nucleic Acids Res.* 39. doi:10.1093/nar/gkr127
192. Srivastava, G.P., Xu, D., 2007. Genome-scale probe and primer design with PRIMEGENS. *Methods Mol. Biol.* 402, 159–76. doi:10.1007/978-1-59745-528-2\_8
193. Staheli, J.P., Boyce, R., Kovarik, D., Rose, T.M., 2011. CODEHOP PCR and CODEHOP PCR primer design. *Methods Mol. Biol.* 687, 57–73. doi:10.1007/978-1-60761-944-4\_5
194. Staheli, J.P., Ryan, J.T., Bruce, A.G., Boyce, R., Rose, T.M., 2009. Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers (CODEHOPs) for the detection of novel viruses in non-human primates. *Methods* 49, 32–41. doi:10.1016/j.ymeth.2009.05.011
195. Thomas, M.C., Thomas, D.K., Selinger, L.B., Inglis, G.D., 2011. spyder, a new method for in silico design and assessment of 16S rRNA gene primers for molecular microbial ecology. *FEMS Microbiol. Lett.* 320, 152–159. doi:10.1111/j.1574-6968.2011.02302.x
196. Tian, S., Yesselman, J.D., Cordero, P., Das, R., 2015. Primerize: automated primer assembly for transcribing non-coding RNA domains. *Nucleic Acids Res.* 43, 1–5. doi:10.1093/nar/gkv538
197. Tokheim, C., Park, J.W., Xing, Y., 2014. PrimerSeq: Design and Visualization of RT-PCR Primers for Alternative Splicing Using RNA-seq Data. *Genomics. Proteomics Bioinformatics* 12, 105–109. doi:10.1016/j.gpb.2014.04.001
198. Tsai, M.F., Lin, Y.J., Cheng, Y.C., Lee, K.H., Huang, C.C., Chen, Y.T., Yao, A., 2007. PrimerZ: Streamlined primer design for promoters, exons and human SNPs. *Nucleic*

- Acids Res. 35. doi:10.1093/nar/gkm383
199. Turchin, A., Lawler, J.F., 1999. The primer generator: A program that facilitates the selection of oligonucleotides for site-directed mutagenesis. *Biotechniques* 26, 672–676.
  200. Tusnády, G.E., Simon, I., Váradi, A., Arányi, T., 2005. BiSearch: primer-design and search tool for PCR on bisulfite-treated genomes. *Nucleic Acids Res.* 33, e9. doi:10.1093/nar/gni012
  201. Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., Rozen, S.G., 2012. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 40, e115. doi:10.1093/nar/gks596
  202. Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., Leunissen, J.A.M., 2007. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res.* 35, W71-4. doi:10.1093/nar/gkm306
  203. Vallone, P.M., Butler, J.M., 2004. AutoDimer: A screening tool for primer-dimer and hairpin structures. *Biotechniques* 37, 226–231.
  204. Varotto C., Richly E., Salamini F., Leister D. 2001. GST-PRIME: a genome-wide primer design software for the generation of gene sequence tags. *Nucleic Acids Res.* 29. 4373-7.
  205. van Baren, M.J., Heutink, P., 2004. The PCR suite. *Bioinformatics* 20, 591–3. doi:10.1093/bioinformatics/btg473
  206. van Hijum, S.A.F.T., de Jong, A., Buist, G., Kok, J., Kuipers, O.P., 2003. UniFrag and GenomePrimer: selection of primers for genome-wide production of unique amplicons. *Bioinformatics* 19, 1580–2.
  207. Vieux, E.E., Kwok, P.Y., Miller, R.D., 2002. Primer design for PCR and sequencing in high-throughput analysis of SNPs. *Biotechniques* 32.
  208. Villard, P., Malausa, T., 2013. SP-Designer: a user-friendly program for designing species-specific primer pairs from DNA sequence alignments. *Mol. Ecol. Resour.* 13, 755–8. doi:10.1111/1755-0998.12116
  209. von Ahsen, N., Wittwer, C.T., Schütz, E., 2011. Monovalent and divalent salt correction algorithms for Tm prediction—recommendations for Primer3 usage. *Brief. Bioinform.* 12, 514–7. doi:10.1093/bib/bbq081
  210. Walters, W.A., Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Berg-Lyons, D., Fierer, N., Knight, R., 2011. PrimerProspector: De novo design and taxonomic analysis of barcoded polymerase chain reaction primers. *Bioinformatics* 27, 1159–1161. doi:10.1093/bioinformatics/btr087
  211. Wang, J., Li, K. Bin, Sung, W.K., 2004. G-PRIMER: Greedy algorithm for selecting minimal primer set. *Bioinformatics* 20, 2473–2475. doi:10.1093/bioinformatics/bth259
  212. Wang, X., Seed, B., 2003. A PCR primer bank for quantitative gene expression analysis. *Nucleic Acids Res.* 31, e154.
  213. Wang X., Spandidos A., Wang H., Seed B. 2012. PrimerBank: a PCR primer database for quantitative gene expression analysis, 2012 update. *Nucleic Acids Res.* 40 (Database issue). D1144-9. doi: 10.1093/nar/gkr1013.
  214. Wang, Y., Tiwari, V.K., Rawat, N., Gill, B.S., Huo, N., You, F.M., Coleman-Derr, D., Gu, Y.Q., 2016. GSP: a web-based platform for designing genome-specific primers in polyploids. *Bioinformatics* btw134. doi:10.1093/bioinformatics/btw134
  215. Wangkumhang, P., Chaichoompu, K., Ngamphiw, C., Ruangrit, U., Chanprasert, J., Assawamakin, A., Tongsimma, S., 2007. WASP: a Web-based Allele-Specific PCR assay designing tool for detecting SNPs and mutations. *BMC Genomics* 8, 275. doi:1471-2164-8-275 [pii]r10.1186/1471-2164-8-275
  216. Weckx, S., De Rijk, P., Glassee, W., Van Broeckhoven, C., Del-Favero, J., 2007. SNPbox: web-based high-throughput primer design with an eye for repetitive sequences. *Methods Mol. Biol.* 402, 179–200.
  217. Weckx, S., De Rijk, P., Van Broeckhoven, C., Del-Favero, J., 2005. SNPbox: A modular software package for large-scale primer design. *Bioinformatics* 21, 385–387. doi:10.1093/bioinformatics/bti006
  218. Wei, X., Kuhn, D.N., Narasimhan, G., 2003. Degenerate primer design via clustering. *Proc. IEEE Comput. Soc. Bioinform. Conf.* 2, 75–83. doi:10.1109/csb.2003.1227306
  219. Wrobel, G., Kokocinski, F., Lichter, P., 2004. AutoPrime: selecting primers for expressed sequences. *Genome Biol.* 5, P11. doi:10.1186/gb-2004-5-5-p11
  220. Wu, J.-S., Lee, C., Wu, C.-C., Shiu, Y.-L., 2004. Primer design using genetic algorithm. *Bioinformatics* 20, 1710–7. doi:10.1093/bioinformatics/bth147
  221. Wu, X., Munroe, D.J., 2006. EasyExonPrimer: automated primer design for exon sequences. *Appl. Bioinformatics* 5, 119–20.
  222. Xu, D., Li, G., Wu, L., Zhou, J., Xu, Y., 2002. PRIMEGENS: robust and efficient design of gene-specific probes for microarray analysis. *Bioinformatics* 18, 1432–7.
  223. Yamada, T., Soma, H., Morishita, S., 2006. PrimerStation: A highly specific multiplex

- genomic PCR primer design server for the human genome. *Nucleic Acids Res.* 34. doi:10.1093/nar/gkl297
224. Yang, C.H., Cheng, Y.H., Chuang, L.Y., Chang, H.W., 2009. Specific PCR product primer design using memetic algorithm. *Biotechnol. Prog.* 25, 745–753. doi:10.1002/btpr.169
225. Yang, C.H., Cheng, Y.H., Chuang, L.Y., Chang, H.W., 2009a. SNP-flankplus: SNP ID-centric retrieval of flanking sequences. *Stud. Comput. Intell.* 214, 13–18. doi:10.1007/978-3-540-92814-0\_3
226. Yang, C., Cheng, Y., Chang, H., Chuang, L., 2010. Primer Design with Specific PCR Product using Particle Swarm Optimization. *Int. J. Chem. Biol. Eng.* 3, 18–23.
227. Yang, C.-H., Cheng, Y.-H., Chuang, L.-Y., Chang, H.-W., 2010a. Confronting two-pair primer design for enzyme-free SNP genotyping based on a genetic algorithm. *BMC Bioinformatics* 11, 509. doi:10.1186/1471-2105-11-509
228. Yang, C.-H., Cheng, Y.-H., Yang, C.-H., Chuang, L.-Y., 2012. Mutagenic primer design for mismatch PCR-RFLP SNP genotyping using a genetic algorithm. *IEEE/ACM Trans. Comput. Biol. Bioinform.* 9, 837–45. doi:10.1109/TCBB.2012.25
229. Yao, F., Zhang, R., Zhu, Z., Xia, K., Liu, C., 2006. MutScreener: Primer design tool for PCR-direct sequencing. *Nucleic Acids Res.* 34. doi:10.1093/nar/gkl168
230. Yao, J., Lin, H., Van Deynze, A., Doddapaneni, H., Francis, M., Lemos, E., Civerolo, E.L., 2008. PrimerSNP: a web tool for whole-genome selection of allele-specific and common primers of phylogenetically-related bacterial genomic sequences. *BMC Microbiol.* 8, 185. doi:10.1186/1471-2180-8-185
231. Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., Madden, T.L., 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13, 134. doi:10.1186/1471-2105-13-134
232. Yofe, I., Schuldiner, M., 2014. Primers-4-Yeast: a comprehensive web tool for planning primers for *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 31, 77–80. doi:10.1002/yea.2998
233. Yoon, H., Leitner, T., 2014. PrimerDesign-M: A multiple-alignment based multiple-primer design tool for walking across variable genomes. *Bioinformatics* 31, 1472–1474. doi:10.1093/bioinformatics/btu832
234. Yoon, J.R., Laible, P.D., Gu, M., Scott, H.N., Collart, F.R., 2002. Express primer tool for high-throughput gene cloning and expression. *Biotechniques* 33, 1328–33.
235. You, F.M., Huo, N., Gu, Y.Q., Lazo, G.R., Dvorak, J., Anderson, O.D., 2009. ConservedPrimers 2.0: a high-throughput pipeline for comparative genome referenced intron-flanking PCR primer design and its application in wheat SNP discovery. *BMC Bioinformatics* 10, 331. doi:10.1186/1471-2105-10-331
236. You, F.M., Huo, N., Gu, Y.Q., Luo, M.-C., Ma, Y., Hane, D., Lazo, G.R., Dvorak, J., Anderson, O.D., 2008. BatchPrimer3: a high throughput web application for PCR and sequencing primer design. *BMC Bioinformatics* 9, 253. doi:10.1186/1471-2105-9-253
237. You, F.M., Wanjugi, H., Huo, N., Lazo, G.R., Luo, M.C., Anderson, O.D., Dvorak, J., Gu, Y.Q., 2010. RJPrimers: Unique transposable element insertion junction discovery and PCR primer design for marker development. *Nucleic Acids Res.* 38. doi:10.1093/nar/gkq425
238. Yu, Q., Ryan, E.M., Allen, T.M., Birren, B.W., Henn, M.R., Lennon, N.J., 2011. PriSM: A primer selection and matching tool for amplification and sequencing of viral genomes. *Bioinformatics* 27, 266–267. doi:10.1093/bioinformatics/btq624
239. Yuryev, A., 2007. PCR primer design using statistical modeling. *Methods Mol. Biol.* 402, 93–104. doi:10.1007/978-1-59745-528-2\_5
240. Zeisel, A., Yitzhaky, A., Bossel Ben-Moshe, N., Domany, E., 2013. An accessible database for mouse and human whole transcriptome qPCR primers. *Bioinformatics* 29, 1355–6. doi:10.1093/bioinformatics/btt145
241. Zhang, R., Zhu, Z., Zhu, H., Nguyen, T., Yao, F., Xia, K., Liang, D., Liu, C., 2005. SNP Cutter: a comprehensive tool for SNP PCR-RFLP assay design. *Nucleic Acids Res.* 33, W489-92. doi:10.1093/nar/gki358
242. Zhou, Y., Qu, W., Lu, Y., Zhang, Y., Wang, X., Zhao, D., Yang, Y., Zhang, C., 2011. VizPrimer: A web server for visualized PCR primer design based on known gene structure. *Bioinformatics* 27, 3432–3434. doi:10.1093/bioinformatics/btr582
243. Ziesel, A.C., Chrenek, M.A., Wong, P.W., 2008. MultiPriDe: automated batch development of quantitative real-time PCR primers. *Nucleic Acids Res.* 36, 3095–100. doi:10.1093/nar/gkn165

**DESIGN OF PRIMERS FOR POLYMERASE CHAIN REACTION  
(BRIEF REVIEW OF SOFTWARE AND DATABASES)**

Chemeris D.A.<sup>1</sup>, Kiryanova O.Yu.<sup>2</sup>, Gubaydullin I.M.<sup>2</sup>, Chemeris A.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center of Russian Academy of Sciences, Russia  
[chemeris@gmail.com](mailto:chemeris@gmail.com), [chemeris@anrb.ru](mailto:chemeris@anrb.ru)

<sup>2</sup>Institute of Petrochemistry and Catalysis of Russian Academy of Sciences, Russia  
[olga.kiryanova27@gmail.com](mailto:olga.kiryanova27@gmail.com), [IrekMars@mail.ru](mailto:IrekMars@mail.ru)

**Resume**

In three decades of the existence the polymerase chain reaction (PCR) as a method of molecular biology got practically into all modern physicochemical biology and related subjects. PCR is applied approximately in every eighth work where DNA is analyzed. Oligonucleotide primers are extremely important component of any PCR, and there is a number of requirements to their design. Now for this purpose the specialized computer software based on various algorithms are used. Many programs for primers design exist as free web services, also their distribution kits can be received from developers, quite often authors provide access to source code of their products. A number of programs are accessible from commercial sources. The existing software allow to design primers for various modifications among which there is multiplex, degenerate, metabisulfite PCR, PCR in real time, PCR with the subsequent cloning of multiple fragments, including ligase-free, PCR site-directed mutagenesis, PCR aimed for indel and mutations identification, SNP, etc. The multiple parameter analysis of oligonucleotides properties in silico (melting point definition, detection of secondary structures, dimers, etc.) is carried out. The programs which are carrying out design the oligonucleotide primers with various modifications, for example, containing ribonucleotides, LNA nucleotides are developed. Recently the programs of primers design considering the ploidy level of the concrete type of an organism genome began to appear. The large number of references to web services of software for primers design is given. Some databases in which information on the sequences of well proved primers collects are briefly characterized. The list of a references consist of more than 240 sources. In this work software complexes, and partly some algorithms which are applied to selection of primers are considered. A basis of any modern software complex, an efficient algorithm is the mathematical description in the form of systems of algebraic, differential equations, integral differential equations.

*Keywords:* PCR, primer, primer annealing temperature, melting temperature, oligonucleotide, primer design, software, algorithm, database, databank