

# Actividad 2. Diseño de primers para amplificar un fragmento de DNA (JAC)

DOMINGO, 19/2/2023

Este cuaderno de actividades te explicará como diseñar primers para amplificar un fragmento de DNA específico.

1. Haz click derecho en la Actividad 2 y cópiala en tu carpeta. Este paso lo repetirás con todas las actividades.
2. Todos los grupos de investigación han recibido la información del gen sobre el que van a trabajar además de una muestra de DNA genómico (gDNA) del patógeno. El siguiente paso es amplificarlo mediante PCR para obtener el material necesario para su clonación. Tener una muestra de gDNA permite trabajar de forma segura sin exponerse al patógeno. Abre el genoma de [Haemophilus Influenzae](#) y lee el documento asociado. Busca el gen que se te ha asignado para trabajar con él usando la **función lupa**.
3. Selecciona el gen que te corresponde y veras como su secuencia se resalta.
4. Haz click en primers para empezar su diseño.

The screenshot displays a bioinformatics software interface. On the left, a sidebar shows a project tree with folders like 'Cloning Results', 'Haemophilus influenzae Rd KW20 c...', 'PCR Products', 'Primers', and 'Vectores de clonación'. The main window shows a 'SEQUENCE MAP' view of the 'HI\_0004 gene' (conserved hypothetical protein). The sequence is displayed with a scale from 3,760 to 4,020. A red arrow points to the 'CREATE PRIMERS' button in the bottom right corner. The bottom panel shows a 'PRIMER DESIGN WIZARD' with fields for 'BASES 1830138', 'START 3854', 'END 4318', 'LENGTH 465', 'GC 43.23%', and 'MELTING TEMP 76.3 °C'. The interface also includes a 'SHARE' button and a 'SPLIT WORKSPACE' button.

5. Usa la opción **wizard** (mago) para el diseño y el programa lo hará automáticamente. Tan solo tendremos que completar algunos parámetros en la ventanas emergentes. También lo puedes hacer manualmente si quieres.

- a. Selecciona **PCR** en la tarea a realizar

**a.**

SEQUENCE MAP PRIMER WIZARD X LINEAR MAP PLASMID DESCRIPTION METADATA RELEVANT ITEMS

Task: PCR (dropdown menu open showing: PCR, qPCR (Hybridization Probe), qPCR (Intercalating Dyes), Sequencing)

Region: (collapse icon) Region

Target: Start End Use selection

T<sub>m</sub> params Reset

Show advanced

b. El fragmento a amplificar está seleccionado por lo que usaremos esa selección para el diseño de primers. "Click en Use Selection".

**b.**

image.png

Task: PCR

Region: (collapse icon) Region

Target: 3854 4318 Use selection

T<sub>m</sub> params Reset

Show advanced

c. Los **parámetros de los primers** están en la imagen de aquí abajo. **Completa los valores** en sus ventanas. Asegúrate que el amplicon, fragmento que se amplifica, tenga los tamaños adecuados. El **mínimo** debe ser el tamaño de tu gen, el **óptimo** debe ser un poco mas grande que el tamaño de tu gen y el **máximo** debe ser **200 pb** más que tu gen.

c.

**C.**

Primer

	Min	Opt	Max
GC%	45	50	65
T <sub>m</sub>	55	60	65
Size	18	22	26
3' GC clamp	0		

Amplicon

	Min	Opt	Max
Size	470	500	800

Result Generation

# results	10
-----------	----

d. Una vez completado los parámetros podemos **generar los primers**.

d.

Task: PCR

Region

Target: 3854 4318 Use selection

Show advanced

Primer

	Min	Opt	Max
GC%	45	50	65
T <sub>m</sub>	55	60	65
Size	18	22	26
3' GC clamp	0		

Amplicon

	Min	Opt	Max
Size	470	500	800

Generate Primers

BASES 1830138 START 3854 END 4318 LENGTH 465 GC 43.23% MELTING TEMP 76.3 °C

6. Después de unos segundos (**espera** a que aparezca el resultado), se abrirá una nueva ventana con los primers diseñados por el programa. Si el resultado no muestra primers, aumenta el tamaño **máximo** del **amplícón**. Selecciona la primera pareja (Imagen 6.1) y asegúrate que flanquean la secuencia de tu gen. Para ello ve a la **ventana del mapa de la secuencia** y mira donde están los primers que aparecen **como flechas de líneas discontinuas** (Imagen 6.2).



7. Si la localización de tus primers es correcta puedes guardarlos en tu carpeta.

7.

The screenshot shows a software interface with a sidebar on the left and a main panel on the right. The sidebar has a search bar and a list of items. The main panel has a tabbed interface with 'PRIMER3 RESULTS' selected. Below the tabs, there are buttons for 'Save Selected Primers' and 'Export as CSV'. A table of primer results is displayed with columns: Penalty, Direction, % GC, T<sub>m</sub>°C, Location, Length, Product BP, and Primer. A red arrow points to the 'Save Selected Primers' button. Below the table, a 'Select a folder' dialog is open, showing a tree structure of folders. A red arrow points to the 'Nombre Estudiante' folder in the tree.

8. Cambia los nombres de los primers para que sean mas informativos: "ID del gen \_FWD" y "ID del gen\_REV".

Completa la tabla

Tabla 2						
	A	B	C	D	E	F
1	Nombre del Grupo de Trabajo	Nombre del Primer	Secuencia del primer	Posicion del primer	GC%	T <sub>m</sub>
2						
3						

Has completado con éxito la actividad 2.

Si has visto errores en las actividades o piensas que algo no queda claro, toma nota y compártelo con el profesor.