



ALAG

ASOCIACIÓN
LATINOAMERICANA
DE GENÉTICA



**SOCIEDAD
DE GENÉTICA
DE CHILE**

**Doctorado en
Biotecnología**
PUCV - UTFSM

CURSO

Análisis de expresión diferencial de genes e investigación reproducibile con R

Dra. Débora Torrealba Sandoval



ALAG

ASOCIACIÓN
LATINOAMERICANA
DE GENÉTICA



SOCIEDAD
DE GENÉTICA
DE CHILE

Doctorado en
Biotecnología
PUCV - UTFSM

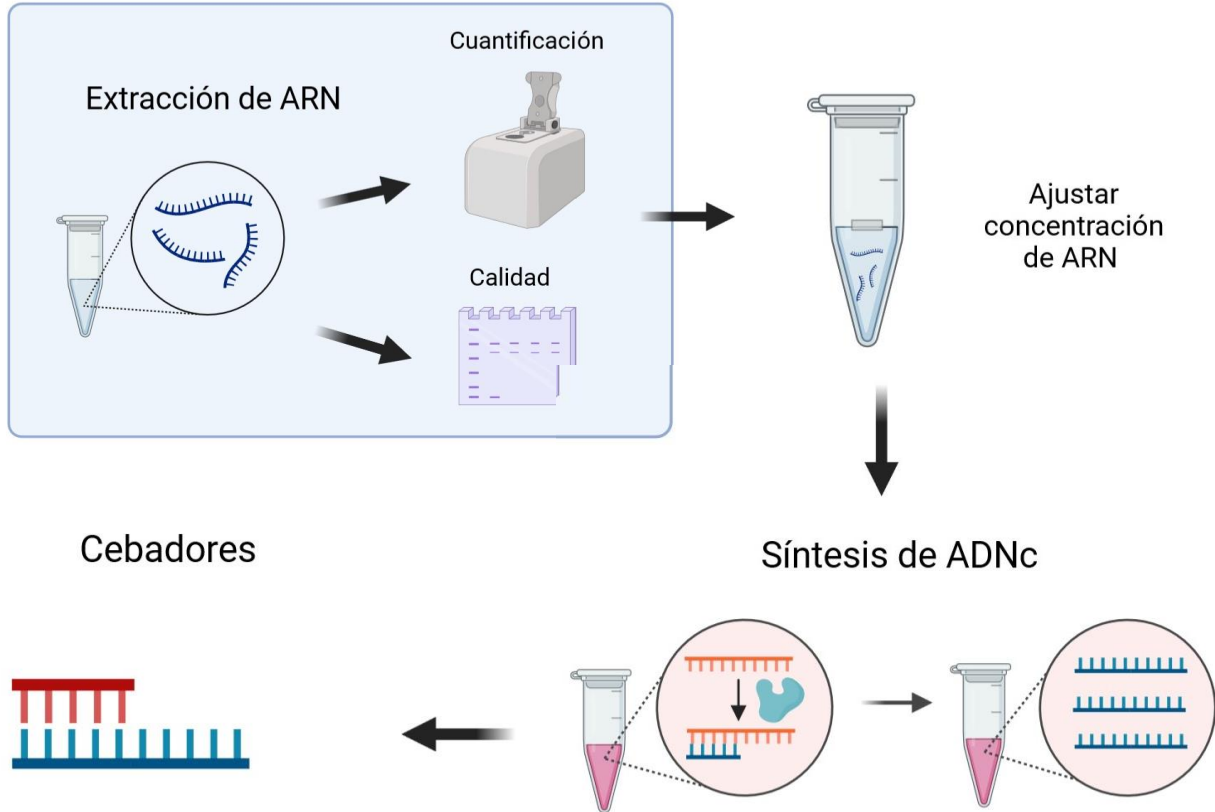
Clase 3

Síntesis de ADNc y Diseño de primers

Plan de la clase

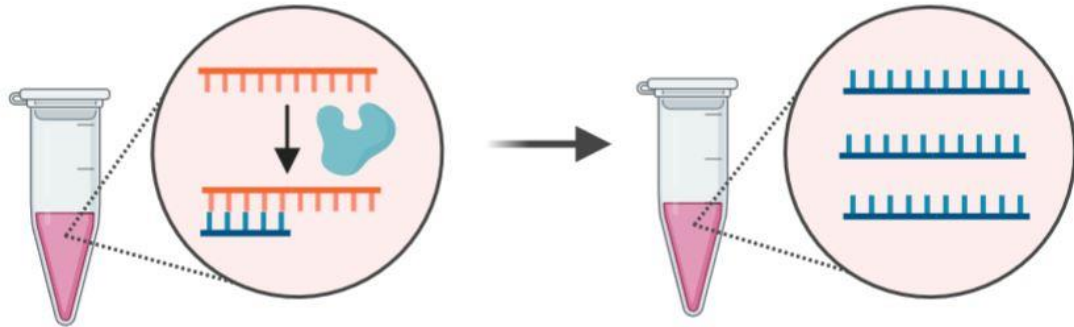
- Síntesis de ADNc
- Qué son y como se diseñan los cebadores
- Características de un cebador eficiente
- Actividad de aprendizaje: como diseñar cebadores

Paso a paso



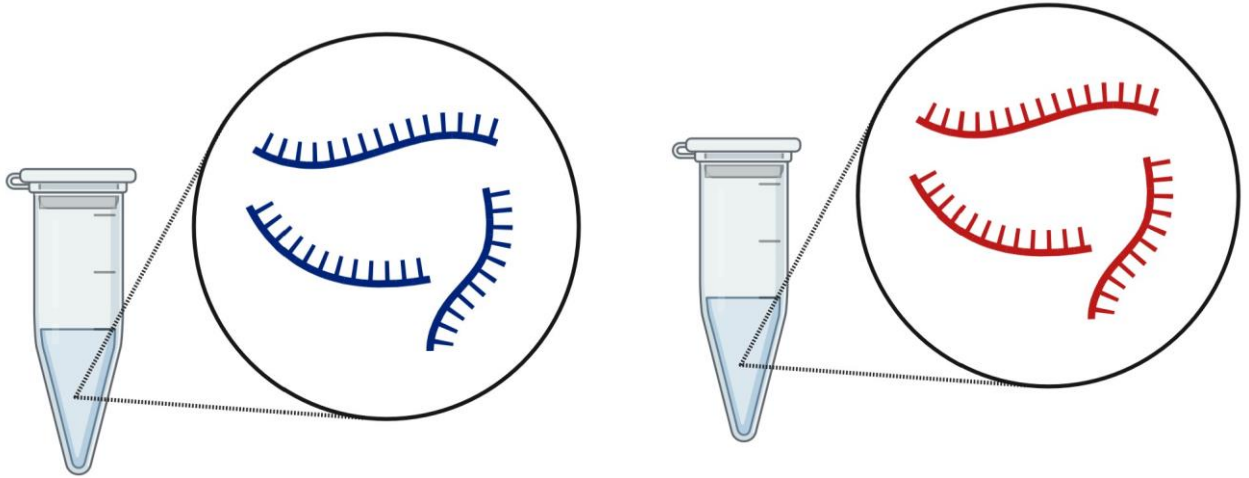
Síntesis de ADNc

¿Qué es la transcripción inversa?



ARN es muy inestable para usarlo como plantilla
para RT-qPCR

De ARN a ADNc



El grupo hidroxilo extra
en el azúcar ribosa es
altamente reactivo

Guardar ARN a -80°C

Tiene una columna
vertebral de azúcar
desoxirribosa

Guardar ADNc a -20°C

¿Cuánto ARN necesito para preparar ADNc?

Muestra ID	Concentración ng/μl	Volumen de ARN (1ug)	Volumen total de 15 μl de H ₂ O
1	579,4	1,73	13,27
2	689,1	1,45	13,55
3	880,6	1,14	13,86

$$579,4 \text{ ng/}\mu\text{l} \quad \rightarrow \quad \frac{1000}{579,4} = 1,73\mu\text{l}$$

Transcribir la misma cantidad de ARN en cada muestra

Síntesis de ADNc

➤ En dos pasos



SuperScript III Reverse Transcriptase
de Invitrogen



Promega

- **Master Mix 1:**
oligo(dt) primer
dNTP

Termociclador a 65°C por 5 min

- **Master Mix 2:**
Buffer
DTT
Superscript III

Termociclador a 50°C por 1h, 70°C
por 15 min

Síntesis de ADNc

➤ En un paso



iScript cDNA Synthesis Kit
de BioRad

Master Mix

Component	Volume per Reaction, μ l
5x iScript Reaction Mix	4
iScript Reverse Transcriptase	1
Nuclease-free water	Variable
RNA template (100 fg–1 μ g total RNA)*	Variable
Total volume	20

Protocolo en termociclador

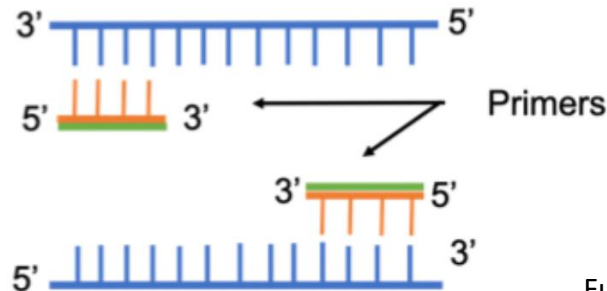
Priming	5 min at 25°C
Reverse transcription	20 min at 46°C
RT inactivation	1 min at 95°C
Optional step	Hold at 4°C

- Mantener muestras en hielo
- Sacar enzima solo para usar

Cebadores

Cebadores

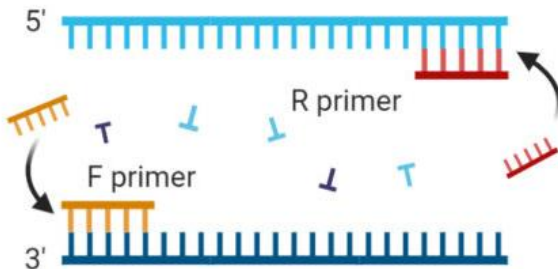
- También conocidos como primers, partidores o iniciadores
- Son cadenas cortas de ácido nucleico
- La ADN polimerasa necesita sintetizar una nueva hebra desde una preexistente
- Los cebadores se necesitan dos para llevar a cabo la PCR



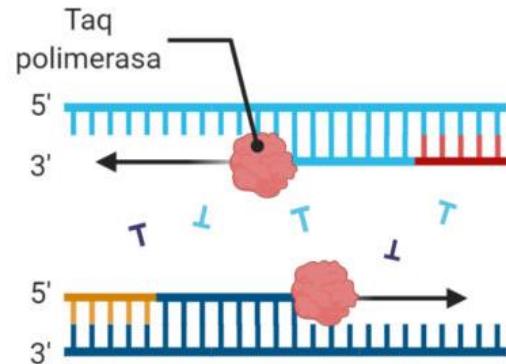
Fuente: Addgene

¿Por qué necesitamos cebadores?

Alineamiento

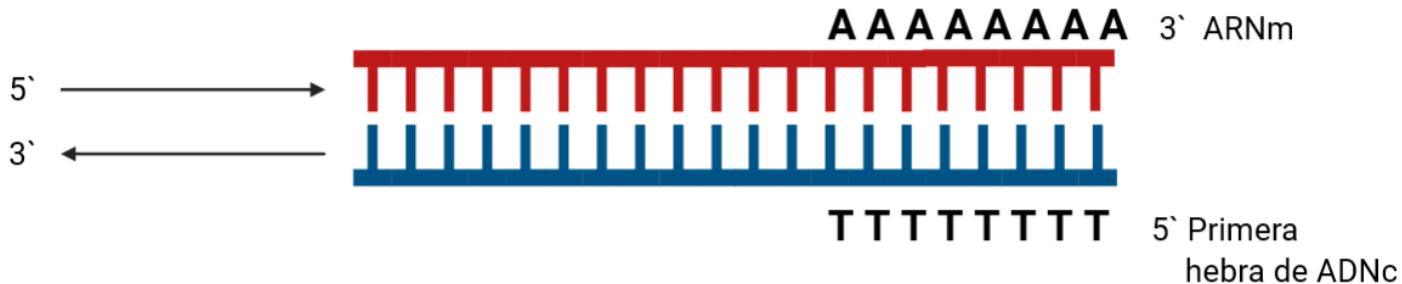


Elongación



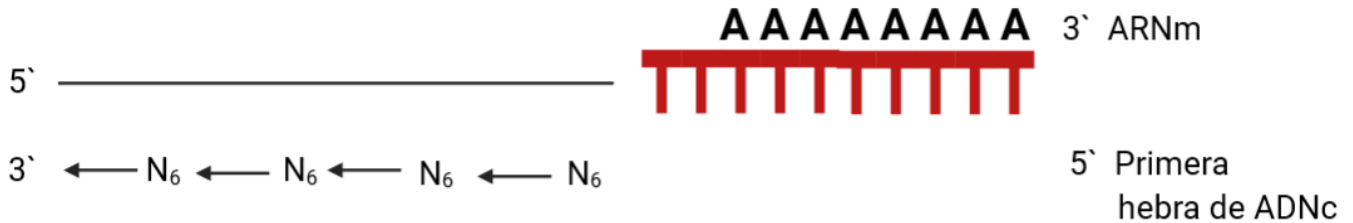
Tipos de cebadores para ADNc

Cebador Oligo(dt)



Se unen a las colas poli(A) complementarias del ARNm

Hexámeros aleatorios



Cebador de región específico



Los cebadores específicos de secuencia tienen la mayor especificidad para el objetivo de interés.

Obtención de cebadores para PCR real time

Cebadores publicados



Table 1

Real-time qRT-PCR primer sequences, efficiencies and sources

Gene name (ASAP ID number ^a)	Primer name	Primer sequence (5' to 3', forward/reverse)	% Efficiency ^b
<i>pelX</i>	P0779	AACAAACGCCGACCTTCC/	105
(ABF-0014783)	P0780	TCCTGATGGGTGACTAAATCC	
(ABF-0019391)	P0781	AAACACCGTCAATTACAG/	86
	P0782	AATTCAGTATCGGAAATCG	
<i>rplU</i> /	P0275	GTTTGACCAGGTTCTGATGGTTGC/	91
(ABF-0046905)	P0276	CCAGCCTGCTTACGGTAGTGTTA	
<i>gyrA</i> /	P0791	CCACCCGTATCCCGAATC/	90
(ABF-0017293)	P0792	ACAACCGTCAATCACTTCAG	
<i>rpoS</i> /	P0789	CGCTGCTGGATCTGATTG/	109
(ABF-0020446)	P0790	ACGATATGGATGGGTAAACG	
<i>ompA</i> /	P0787	CAGACAGCCACGACAATC/	87
(ABF-0018822)	P0788	TAGCGTATCAACACCCACAG	
<i>rpoD</i> /	P0814	GCCATCACCTATCTGTTG/	85
(ABF-0019909)	P0815	TCTTCTCGTCTTCTTCG	

^a *Dickeya dadantii* sequences can be obtained (under the former name *Erwinia chrysanthemi* 3937) from the ASAP database at <https://asap.ahabs.wisc.edu/asap/logon.php>.

^b Primer efficiencies were determined by the MyiQ Cyclor software from a standard dilution curve of target DNA as described in [Materials and methods](#).

Jahn et al. 2008. Journal of Microbiological Methods.

Primers pre-diseñados

- Comprar primers pre-diseñados



Cebadores KiCqStart®

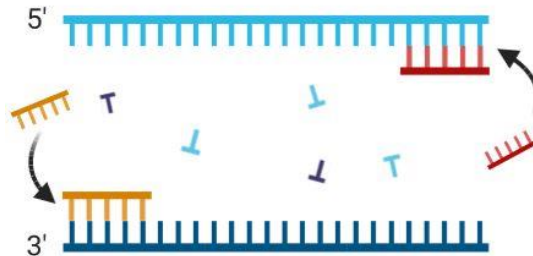


Predesigned qPCR Assays

Diseño de cebadores

Antes de comenzar...

Nucleótidos	Probabilidad
A, C, G, T	1/4
Dinucleótido (ej: AT)	1/16
Tetranucleótido (ej: AATG)	1/256
Cebador de 16 pb	1/4294967296



Características de un primer eficiente

Longitud entre 17 - 28 pb

Contenido de GC en un rango de 50 a 60%

Tm entre 59 y 65°C

Producto PCR de 80 a 200 pb

Características de un primer eficiente

Contener una abrazadera de GC

- 5'-CTCTGTAGGGTCGCGACTAC-3'
- 5'-CGCTACCACCATCGATTGAT-3'
- 5'-GGATCTGGCTGCATGCTATG-3'

Evitar tres o mas citocinas o guaninas en el 3`terminal

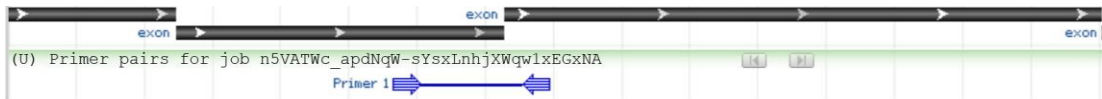
Evitar repeticiones de nucleótidos

Características de un primer eficiente

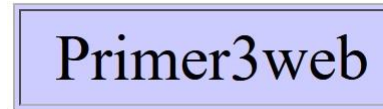
Cebadores específicos para el gen de interés

Si usa Oligo(dT)s diseñar cebadores cerca del 3' del gen

Cebadores separados por un intrón



Software para el diseño de cebadores



Primer-BLAST

GenBank ▾

Send to: ▾

Change region shown ▾

Customize view ▾

Salmo salar hemoglobin subunit alpha (hba), mRNA

NCBI Reference Sequence: NM_001123662.1

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

Go to: ▾

LOCUS NM_001123662 556 bp mRNA linear VRT 10-JAN-2022
DEFINITION Salmo salar hemoglobin subunit alpha (hba), mRNA.
ACCESSION NM_001123662
VERSION NM_001123662.1
KEYWORDS RefSeq.
SOURCE Salmo salar (Atlantic salmon)
ORGANISM [Salmo salar](#)
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Protacanthopterygii;
Salmoniformes; Salmonidae; Salmoninae; Salmo.
REFERENCE 1 (bases 1 to 556)
AUTHORS Leong JS, Jantzen SG, von Schalburg KR, Cooper GA, Messmer AM, Liao
NY, Munro S, Moore R, Holt RA, Jones SJ, Davidson WS and Koop BF.
TITLE Salmo salar and Esox lucius full-length cDNA sequences reveal
changes in evolutionary pressures on a post-tetraploidization
genome
JOURNAL BMC Genomics 11, 279 (2010)
PUBMED [20433749](#)

Analyze this sequence ▴

Pick Primers

Highlight Sequence Features

Find in this Sequence

Show in Genome Data Viewer

Articles about the hba gene ▴

Salmo salar and Esox lucius full-length cDNA
sequences reveal change [BMC Genomics. 2010]

cDNA and deduced amino acid sequence of the
Salmo salar (Atlantic s; [Nucleic Acids Res. 1989]

See all...

Primer-BLAST

Primers for target on one template

Primers common for a group of sequences

PCR Template

[Retrieve recent results](#) [Publication](#) [Tips for finding specific primers](#)

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

Clear

AF012125.1

Range ?

Clear

From

To

Forward primer

Reverse primer

Or, upload FASTA file

Examinar...

Ningún archivo seleccionado.

Primer Parameters

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

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

PCR product size

of primers to return

Primer melting temperatures
(T_m)

Min

80

Max

200

Min

59.0

Opt

63.0

Max

65.0

Max T_m difference

3

Clear

Clear

?

Diseño de cebadores

Exon/intron selection

Exon junction span

Exon junction match

Intron inclusion

Intron length range

A refseq mRNA sequence as PCR template input is required for options in the section ?

No preference ?

Min 5' match

7

Min 3' match

4

Max 3' match

8

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



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

Min

200

Max

10000 ?

Diseño de cebadores

Primer Pair Specificity Checking Parameters

Specificity check

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

Search mode

Automatic ?

Database

Refseq mRNA ?

Exclusion

☐ Exclude predicted Refseq transcripts (accession with XM, XR prefix) ☐ Exclude uncultured/environmental

Organism

8030 [Add organism](#)

Enter an organism name (or organism group name such as enterobacteriaceae, rodents), taxonomy id or select

Entrez query (optional)

?

Primer specificity stringency

Primer must have at least 2 total mismatches to unintended targets, including at least 2 mismatches within the last 5 bps at the 3' end. ?
Ignore targets that have 6 or more mismatches to the primer. ?

Max target amplicon size

4000 ?

Allow splice variants

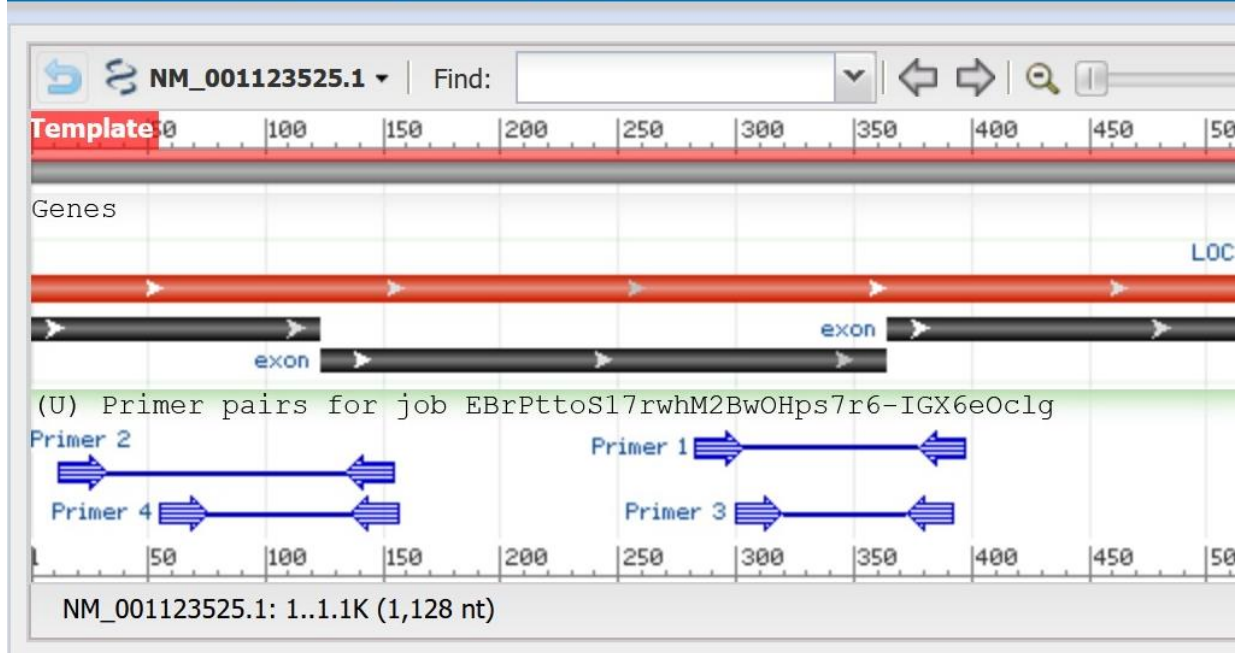
☐ Allow primer to amplify mRNA splice variants (requires refseq mRNA sequence as PCR template input) ?

Get Primers

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

Resultados

— Graphical view of primer pairs



Resultados

Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AGAGTGGCACCAGAGGAGCA	Plus	20	283	302	63.03	60.00	5.00	1.00
Reverse primer	ACATGGCGGGGGTGTGAAG	Minus	20	397	378	63.05	60.00	4.00	1.00
Product length	115								
Total intron size	518 (between pos. 101424830 and 101425349 on NC_059444.1)								

Products on intended targets

>[XM_014194536.2](#) PREDICTED: Salmo salar beta actin (LOC100136352), transcript variant X1, mRNA

product length = 115

Forward primer	1	AGAGTGGCACCAGAGGAGCA	20
Template	587	606

Reverse primer	1	ACATGGCGGGGGTGTGAAG	20
Template	701	682

Actividad de aprendizaje

- Diseño de cebadores en Primer-BLAST (Drive)

Clase 3: Diseño de Primers

PCR en tiempo real e Investigación reproducible con R



National Library of Medicine

National Center for Biotechnology Information

Primer-BLAST

Resumen de la clase

- Síntesis de ADNc en reacciones de 1 y 2 pasos
- Conocimos que es un cebador y cuales son las características de cebador eficiente
- Diseño de cebadores a través del software Primer-Blast de NCBI
- Análisis de los cebadores con los software Oligoanalyzer y Blast

Próxima clase

- Eficiencia de los cebadores y optimización de qPCR

