

DISEÑO DE PRIMER Y PCR IN SILICO

SEMANA 02

18 de Abril del 2020

UTEC
UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE CALABAZA

BIOINFORMÁTICA Y BIOESTADÍSTICA 2020-1

LUIS JARAMILLO MSc

Índice

- PCR: Fundamento
- Primers: Fundamento y consideraciones
- Practica 1: Diseño de primers
- Practica 2: PCR in silico

UTEC
UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE CALABAZA

BIOINFORMÁTICA Y BIOESTADÍSTICA 2020-1

LUIS JARAMILLO MSc

1

DISEÑO DE PRIMER Y PCR IN SILICO

BIOINFORMÁTICA Y BIOESTADÍSTICA 2020-1

LUIS JARAMILLO MSc

Polymerase Chain Reaction

Thermus aquaticus

Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro:
The Polymerase Chain Reaction

K. MULLIS, F. FALGONA, S. SCHARF, R. SAIKI, G. HORN, AND H. ERLICH
Cetus Corporation, Department of Human Genetics, Emeryville, California 94608

Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase

RANDALL K. SAIKI, DAVID H. GELFAND, SUSANNE STOFFEL, STEPHEN J. SCHARF, RUSSELL HIGUCHI, GLENN T. HORN, KARY B. MULLIS,* HENRY A. ERLICH

A thermostable DNA polymerase was used in an in vitro DNA amplification procedure, the polymerase chain reaction. The enzyme, isolated from *Thermus aquaticus*, greatly simplifies the procedure and, by enabling the amplification reaction to be performed at higher temperatures, significantly improves the specificity, yield, sensitivity, and length of products that can be amplified. Single-copy genomic sequences were amplified by a factor of more than 10 million with very high specificity, and DNA segments up to 2000 base pairs were readily amplified. In addition, the method was used to amplify and detect a target DNA molecule present only once in a sample of 10^7 cells.

UTEC
UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE CALABAZA

BIOINFORMÁTICA Y BIOESTADÍSTICA 2020-1

LUIS JARAMILLO MSc

Elementos para hacer una PCR

- **DNA**= Este se llama "molde" o *template*
- **Nucleótidos** o dNTP's= **A T C G**
- **Primers**= segmentos de **DNA** cortos, son *específicos*.
- **Cofactor**: Mg 2+ y un medio particular (**Buffer**)
- **Polimerasa** termoestable

UTEC
UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE CALABAZA

BIOINFORMÁTICA Y BIOESTADÍSTICA 2020-1

LUIS JARAMILLO MSc

Elementos para hacer una PCR

The basic protocol—what's in the tube

Target DNA

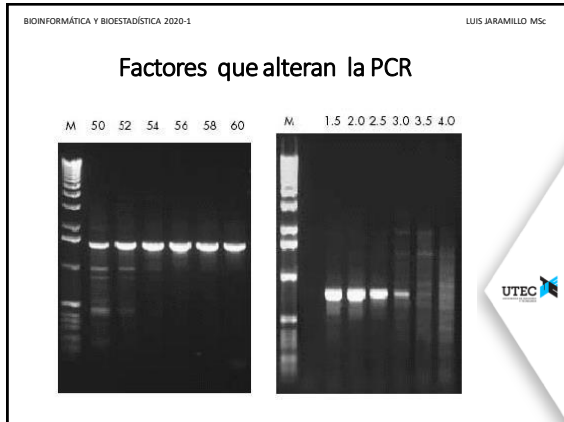
primers

Taq DNA polymerase

Free nucleotides

Buffer containing magnesium

UTEC
UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE CALABAZA



BIOINFORMÁTICA Y BIOESTADÍSTICA 2020-1 LUIS JARAMILLO MSc

Primers

- Anneal to complementary regions of single stranded DNA
- DNA polymerase attaches to the primer and elongates the DNA by adding nucleotides

CTACTTAGTATGAGGCCCTATATTACC
TATGA

UTEC

BIOINFORMÁTICA Y BIOESTADÍSTICA 2020-1 LUIS JARAMILLO MSc

Primers

- Tamaño: Entre 18 y 24 nucleótidos.
- T_m = Temperatura de **melting**
 - Temp. a la cual el **50%** de las híbridos está asociado/disociado. Es una medida de la **estabilidad** del primer.
- Ambos **primers** deben tener T_m 's parecidas
- % GC es importante (>50%)
- $T_m = (A+T) \times 2^\circ\text{C} + (G+C) \times 4^\circ\text{C}$,
Annealing ($T_a = T_m - 5^\circ\text{C}$)

UTEC

BIOINFORMÁTICA Y BIOESTADÍSTICA 2020-1 LUIS JARAMILLO MSc

Temperatura de melting y annealing

| Primer Length | $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$ | Primer Length | $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$ |
|---------------|-------------------------|---------------|-------------------------|
| 4 | 12°C | 22 | 66°C |
| 6 | 18°C | 24 | 72°C |
| 8 | 24°C | 26 | 78°C |
| 10 | 30°C | 28 | 84°C |
| 12 | 36°C | 30 | 90°C |
| 14 | 42°C | 32 | 96°C |
| 16 | 48°C | 34 | 102°C |
| 18 | 54°C | 36 | 108°C |
| 20 | 60°C | 38 | 114°C |

$T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$

$T_m (^\circ\text{C}) = 69.3 + 0.41(\%G + C) - (650/L)$

Where: %G + C = %age GC content of the primer
L = length of primer (bp)

UTEC

BIOINFORMÁTICA Y BIOESTADÍSTICA 2020-1 LUIS JARAMILLO MSc

Primers

- Los **primers** deben apuntar a una **única** secuencia dentro del genoma del organismo estudiado.
- Composición de bases: Es preferible que los **primers** tengan una mayor cantidad de CG que AT.
- Los **primers** no deben formar **hairpins** o dímeros

UTEC

BIOINFORMÁTICA Y BIOESTADÍSTICA 2020-1 LUIS JARAMILLO MSc

Primers degenerados

Amino acid: P F T K
Nucleotide: CCn TTy ACn Aar

n = A,C,G or T y = C,T r = A,G

- Avoid amino acids with lots of codons e.g. Leucine (L), Arginine (R) and Serine (S)
- Aim for regions that are rich in AAs with one or two possible codons e.g. MWCDEFHKQY

UTEC

Algunos consejos

- Los primers deben tener un tamaño de entre 17 a 82 bp.
- La composición de bases debería ser 50-60% (G C)
- La Tm debe estar entre 55°-80° C.
- Los extremos 3' de los primers deberían terminar en C o G o CG o GC
- Evitar zonas repetitivas (GGG o CCC)
- Los extremos 3' de ambos primers no deben ser complementarios
- Evitar la complementaridad de estructura (hairpins)



Dos primers

- El Bueno
- 5' ATGCACTCAGACGTACAACGTGAC 3'
- El malo
- 5' AAAACAAACGATTTTTT 3'

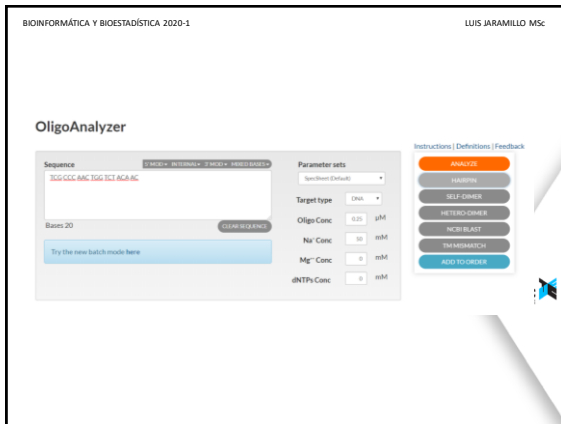


2 UN POCO DE PRÁCTICA

Práctica Diseño de Primers

| | Pseudomonas aeruginosa strain PA83 chromosome, complete genome | Customize view |
|-------------------------|---|-----------------------------|
| NCBI Reference Sequence | NZ_CP017893.1 | Analyze this sequence |
| FASTA | GenBank | Run BLAST |
| Gen ID | | Find Primers |
| LOCUS | NZ_CP017893.1 4863227 bp DNA circular GC 50.16% 02-FEB-2008 | Highlight Sequence Features |
| DEFINITION | Pseudomonas aeruginosa strain PA83 chromosome, complete genome. | |
| ACCESSION | NZ_CP017893.1 | |
| VERSION | NC_017893.1 | |
| KEYWORDS | GenBank | |
| SOURCE | RefSeq | |
| ORGANISM | Pseudomonas aeruginosa Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas | |
| REFERENCE | 1. Shono T, et al. NC017893 Suzukawa K, Watanabe M, Itagaki H, Arai, R., Nishikubo Y, Petro S, and Nakano J. Title Full Genomic Sequences of Colistin Resistance in Extensively Drug-Resistant Pseudomonas aeruginosa Strains Isolated from Hospital Outpatients Antimicrob Agents Chemother. 51(7), e00647-07 (2007) | |
| JOURNAL | Publication Status: Withdrawn | |
| COMMENTARY | 1. Shono T, et al. NC017893 | |
| AUTHORS | Itagaki H, and Nakano J | |
| TITLE | Direct Sequencing | |
| SUBJECT | (15-SEP-2008) NCBI Project "Genomes Online Research" | |
| | Submitted by National Institute of Health Collection of Microorganisms and Cells | |

[illegible][illegible]



Conclusiones

- ✓ Los primers deben apuntar a una única secuencia dentro del genoma del organismo estudiado.
- ✓ Los primers no deben formar hairpins o dímeros
- ✓ Diseño de primers y PCR in silico con herramientas online.



Gracias

NO IMPORTA CUÁN
DESPACIO VAYAS
MIENTRAS NO TE
DETENGAS

