

Diseño de primers

1. Usaremos como referencia el genoma de *Pseudomonas aeruginosa* strain PA83 (NZ_CP017293.1). Esta secuencia se encuentra en el siguiente link: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NZ_CP017293.1
2. Nos enfocaremos en un gen específico, el gen LasB, este gen se encuentra en la siguiente posición: 1402659 – 1404155.
3. Trataremos de diseñar *primers* que cubran parcialmente este gen, para ello debemos obtener la secuencia de nucleótidos. En la opción **Change region shown** coloque los siguientes números, 1402659 y 1404155. Luego de clic en **Update View**.
4. También puede observar esta misma región utilizando el siguiente link: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NZ_CP017293.1?report=genbank&from=1402659&to=1404155

—

5. Revise este registro, el gen de la elastasa se encontrará en la posición ... y ... dentro de nuestra nueva secuencia.
6. Descargue la secuencia con la opción **Send to File => Fasta => Create File**. Renombre a la secuencia descargada y llévela a una carpeta nueva.
7. Abra la secuencia y cópiela.
8. Abra la página del Primer3, <http://primer3.ut.ee>. Copie la secuencia aquí, y observe los parámetros.

Parámetro	Mínimo	Óptimo	Máximo
Longitud (Length)			
Tm			

9. Buscaremos un producto mayor a 400 bp. Así que elimine los otros tamaños del parámetro **Product Size Ranges**. Luego de clic en **Pick Primers**.
10. Existe otra versión llamada Primer3Plus, que puede ser usada desde aquí, <https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>
11. Es posible obtener los *primers* desde el Genbank, para ello busque la opción **Pick Primers**.
12. Modifique el parámetro de tamaño de producto para tener un tamaño mínimo de 400 pb y el número de *primers* a escoger a 5.
13. Los parámetros de Tm son:

Parámetro	Mínimo	Óptimo	Máximo
Tm			

14. Usando Primer-Blast: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. En **Database** escoja **nr** que es la base de datos general del GenBank. Fíjese que el código del organismo está con el valor 287, el cual corresponde a *Pseudomonas aeruginosa*.
15. Para obtener los *primers* de clic en el botón **Get Primers**.
16. El programa le dirá que la secuencia molde se parece mucho a una secuencia de la base de datos (CP017293.1), lo cual es cierto, por lo que seleccione la primera secuencia. Vaya hacia abajo y de clic en **Submit**.
17. Observará la figura a continuación:



18. El Primer-BLAST realiza también un análisis BLAST de cada par de *primers* para ver si podrían alinearse con otras secuencias dentro del genoma, lo que provocaría productos inespecíficos.

Propiedades de los *primers*

19. Las diferentes propiedades de los *primers* pueden ser calculadas usando esta web,

<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>

Problemas de los *primers*

20. El cálculo de estructuras erróneas puede ser hecho a través de esta web,

<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>

PCR *in silico*

1. Es posible realizar una simulación del PCR con los *primers* predichos, para ello necesitará la secuencia de ambos *primers* y utilizar la siguiente web, <http://insilico.ehu.es/PCR/>. Observar que el análisis funcionará si hay una secuencia de referencia en la base de datos de esta web.
2. Otras webs:

http://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_products.html

<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?command=start> (Animales)

<http://projects.insilico.us/SpliceCenter/PrimerCheck>