

Guía de diseño de primers LAMP con PrimerExplorer

1.- Entrar al siguiente link y les saldrá una pantalla como esta:

<http://primerexplorer.jp/lampv5e/index.html>

LAMP primer designing software: Pri X +

← → ↻ 🏠 ⓘ primerexplorer.jp/lampv5e/index.html

PrimerExplorer V5 Software

Operation procedure for designing regular primers

1. Click on [Browse] button.
Choose and upload the target sequence file.
Following formats can be used.
 - Plain text format (sequence only)
 - FASTA format
 - GenBank format
 - Multiple alignment file format
 - Target sequence save file format
2. Choose the corresponding parameter set.
3. Click on the [Primer Design] button

Operation procedure for designing loop primers

1. Click on the [Browse] button.
Choose the Primer Information File.
2. Click on the [Primer Design] button.

Target Sequence File/Primer Information File

No se seleccionó un archivo.

Parameter Set(not applicable to the loop primer design.)

☒ Automatic Judgment
☐ Normal
☐ User Assignment

No se seleccionó un archivo.

En este caso será la V5 porque se va actualizando. Recomiendo seguir la guía paso a paso para reforzar lo aprendido con respecto al diseño de primers LAMP.

2.- En el recuadro verde colocar “examinar” y elegir el archivo FASTA de interés, en nuestro caso colocaremos el archivo M7.fasta que se encuentra en los materiales de la clase. Recuerda que luego lo puedes reemplazar por tu secuencia de interés, la cual debe ser corta, pero siempre manteniendo el formato de la secuencia Fasta, con un signo > (mayor que) seguido del nombre del gen y especie y las bases en la segunda línea deben contener un máximo de 80 caracteres.

Por: Michelle C. Chirinos Arias

Considerar que el largo de pares de bases debe ser menor a 2000 bp porque si no saldrá error, en caso su archivo contenga más, es necesario recortar.

File upload Error

Target sequence length is too long! Please input the sequence less than 2000 bp.

OK

Seleccionar “automático”, ya que no aplica otra selección para primers LAMP, por último has click en Primer Design.

Target Sequence File/Primer Information File

Examinar... M7.fasta

Parameter Set(not applicable to the loop primer design.)

☒ Automatic Judgment

☐ Normal

☐ User Assignment

Examinar... No se seleccionó un archivo.

Primer Design

3.- Aparecerá la siguiente ventana que nos muestra nuestra secuencia blanco, como pueden ver tiene el nombre de la secuencia fasta que subimos (recuadro rojo).

UPLOAD FILE: M7.fasta

1 AAGTGGTTAG TACCTATTAA TGTAGTGTTC AATCCATTTC CTCATGTGGA TTGTGTTCACT TACATCTGTT TACGTTATGC 80

81 TCTTCTCAGG GGAAATTTTA TGAGCTGTAT GAGCTAGATG CGGAATTAGG TCACAAGGAG CTTGACTGGA AGATGACCAT 160

161 GAGTGGTGTG GGAAATGCA GACAGGTAAA TTAGTTGAAA CAACTGGCCT GCTTGAATTA TTGTGCTCTAT AAATTTTAC 240

241 ACCACCTTTT GTTTCAGGTT GGTATCTCTG AAAGTGGGAT AGATGAGGCA GTGCAAAAGC TATTAGCTCG TGGGTAAGGG 320

321 AACCATCATA CTTTATGAA TTGCTTTACT GCTACTTCGG CTAGGATTTA AGAAATGGAA ATCACTTCAA GCATCATTAG 400

401 TTAGGATCCT GAGAACTCAG GATGTTTCTT TATTGCTTAT ATAATAAGTC TTTCATCAA GGAGTAACAA ACAAAACCTG 480

481 CACAATATT GTGTGCTCAC TGGCAAGGCA TATATACCCA GCTAACCTTT GCTAGTTCAC TGTAGTAACA GTTACGGATA 560

561 ATATATGTTT ACTTGTATGT GGTACCTCA TTTTGTCTCT CATGGAGGCT TTCAAGCCTT GTGTTGAAAC TGGATAGTTA 640

641 CATATGCTTC CAACAGAAAC TAGCATGCAG ATTCATATGC TTTCCTATT TACTAATTAT GTATTGACAC ACTCGTTGTT 720

721 TCTTTTGAAA GATATAAGT TGGACGAATC GAGCAGCTAG AACATCTGA CCAAGCAAA GCCAGAGGTG CTAATACTGT 800

801 AAGTTTCTT GGATAGGTCA AGGAGAGTGT TGCAGACTGT TTTTGATCAT TTCTTTTCT GTACATTACT TTCATGCTGT 880

Set Mutation

Mut/Cons

Clear

Fixed Primer

F3

F2

F1

B1

B2

B3

Clear

Save Target

Design Option

☒ Default

☐ Common

☐ Specific

1.Generate


Generate

sets were generated.

2.Display

Display

If you can have more detail settings, please click below.

 IGBM
Instituto de Genética
Barbara McClintock

www.igbmgenetica.com

2

Por: Michelle C. Chirinos Arias

4.- Fijarse que en la figura de arriba ↑, en letras verdes y en la parte de abajo dice "If you can have more detail settings, please click below". Hacer click y aparecerá la siguiente ventana por defecto:

If you can move to "Basic Designing", please click below.

Basic Designing

Parameter Condition

AT rich

Save Parameter

Reset Parameter

Length

F1c/B1c

20

-

25

F2/B2

18

-

25

F3/B3

18

-

25

Tm

F1c/B1c

60

-

63

F2/B2

55

-

58

F3/B3

55

-

58

GC rate(%)

30

-

65

dG threshold

5'stability

-3

3'stability

-4

dimer check

-2.5

Distances

(F2-B2)

120

-

180

Loop(F1c-F2)

40

-

60

F2-F3

0

-

20

F1c-B1c

0

-

100

Si deseas puedes volver al diseño básico de primers LAMP para ello debes hacer click en Basic Designing (recuadro rojo).

5.- En las clases hemos aprendido el diseño de primers, por ello, aplicaremos los conceptos de la clase 5. Podemos seleccionar el rango de la secuencia FASTA subida donde queremos que este el TARGET DNA, pero recuerda que eso limita las opciones, solo se debe usar si es necesario, si no lo es, seleccionar "ignore range"

1.Select Range

☒ Ignore range

☐ Within F2-B2

☐ Between F1c-B1c

Targeting Range

-

2.Generate

Generate

sets were generated.

6.- Como parámetro de la condición colocaremos GC rich en lugar de AT rich que es lo que está por defecto. Ver la diapositiva 2 de la clase 5 (parte 3) que tiene unas tablas resúmenes, coloquemos esos parámetros, por ejemplo, primers con un largo de 15 a 25 ntd, las diferentes temperaturas de melting y el contenido de GC que debe estar entre 40 a 60%, tal como se muestra en la siguiente figura.

Parameter Condition GC rich

Length	F1c/B1c	15	-	25
	F2/B2	15	-	25
	F3/B3	15	-	25

Tm	F1c/B1c	64	-	68
	F2/B2	59	-	63
	F3/B3	59	-	63

GC rate(%) 40 - 60

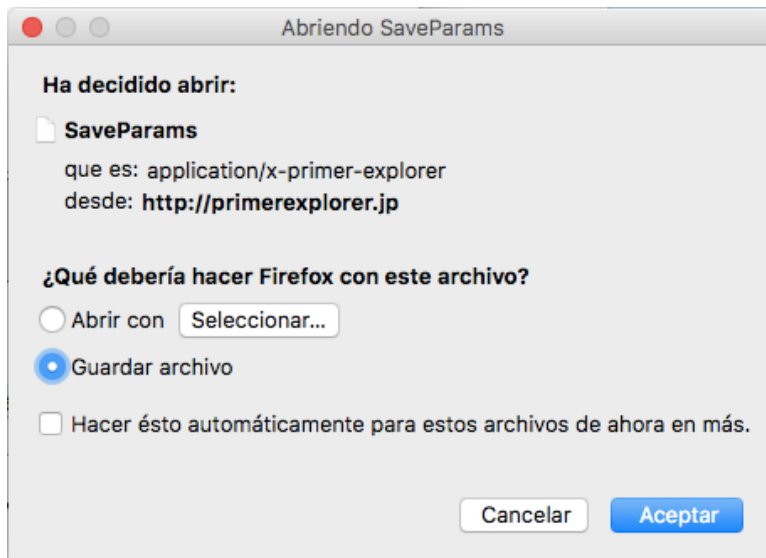
Así seguiremos con los demás parámetros dG threshold (el cual se recomienda un valor menor de -4), las distancias entre los diferentes primers, lo demás lo podemos dejar por defecto.

dG threshold	5'stability	-3
	3'stability	-4
	dimer check	-2.5

Distances	(F2-B2)	120	-	160
	Loop(F1c-F2)	40	-	60
	F2-F3	0	-	60
	F1c-B1c	0	-	100

Puedes guardar los parámetros del diseño de tus primers LAMP, yo los guardé en un archivo parámetros_de_primers.txt que se encuentra dentro de los materiales. Para ello, dar "save parameter" que está en recuadro verde en la parte de arriba y aparecerá la siguiente ventana:

Por: Michelle C. Chirinos Arias



Click en aceptar.

7.- Dar click en Generate (recuadro verde). Puedes guardar los parámetros y generar los primers, o puedes solo generar los primers.

Aparecerá en la parte de debajo de la secuencia, un recuadro gris con los mil primers generados. Puede demorar un poco.

```
721 TCTTTTGAAA GATATAAAGT TGGACGAATC GAGCAGCTAG AAACATCTGA CCAAGCAAAA GCCAGAGGTG CTAATACTGT 800
*****
801 AAGTTTCTCT GGATAGGTCA AGGAGAGTGT TGCAGACTGT TTTTGATCAT TTCTTTTCT GTACATTACT TTCATGCTGT 880
*****

Number of Primer Candidates: F1=202, F2=559, F3=878, B1=208, B2=582, B3=914, FIP=375, BIP=449
1000 Primer set(s) were generated.
```

8.- Para poder ver los primers generados, debes darle click al recuadro verde que dice "Display" y aparecerá la siguiente pantalla. La cual puedes guardar como Excel dándole click a "save list".

The screenshot shows the 'Primer Set List' page in the PrimerExplorer V5 software. It displays a table of generated primers with columns for ID, position, length, Tm, 5'dG, 3'dG, GCrate, and Sequence. The sequences are color-coded: green for F3, blue for B3, black for F1c, and blue for B1c. A 'Confirm' button and a 'Save List' button are visible at the bottom left. The design ID is 190728045520.

Mira la pantalla, tendrás letras en **mayúsculas y en verde (F3)**, mayúsculas y azul (F2), negro y en minúscula (F1c), negro y mayúscula (B1c), minúscula y azul (B2), minúscula y verde (B3).

9.- Para visualizarlo mejor, seleccionamos algunos primers (opciones 1, 2 y 7), dándole click en el checkbox y luego click en Confirm.

The screenshot shows the 'Primer Information' page in the PrimerExplorer V5 software. It displays a table with columns for ID, position, length, Tm, 5'dG, 3'dG, GCrate, and Sequence. The sequences are color-coded: green for F3, blue for B3, black for F1c, and blue for B1c. A 'Confirm' button and a 'Save' button are visible at the bottom left. The design ID is 190728045520.

ID	pos	len	Tm	5'dG	3'dG	GCrate	Sequence
1	25	49	25.60.72	-4.67	-4.21	0.40	GTGTTCAATCCATTTCCTCAATGTG
B3	237	258	22.60.97	-4.86	-5.07	0.45	CCTGAAACAAAGGTGGTGTCA
FIP		50					TGTGACCTAATCCGCATCTAGCTC-CATCTGTTTACGTTATGCTCTTCTC
BIP		43					AGGAGCTTGACTGGAAGATGACCA-ATTCAAGCAGGCCAGTTGT
F2	63	87	25.59.51	-4.40	-4.20	0.40	CATCTGTTTACGTTATGCTCTTCTC
F1c	111	135	25.64.20	-5.07	-4.67	0.48	TGTGACCTAATCCGCATCTAGCTC
B2	200	218	19.59.39	-3.57	-4.55	0.47	ATTCAAGCAGGCCAGTTGT
B1c	136	159	24.65.44	-5.93	-5.42	0.50	AGGAGCTTGACTGGAAGATGACCA

Primer Information									
Save									
2	ID:2	dimer(minimum)dG=-2.13							
label	5'pos	3'pos	len	Tm	5'dG	3'dG	GCrate	Sequence	
F3	74	96	23	60.03	-3.39	-4.01	0.43	GTTATGCTCTTCTCAGGGGAAAT	
B3	265	288	24	60.99	-4.74	-4.60	0.46	CCTCATCTATCCCACTTTCAGAGA	
F1P			50					ACTCATGGTCATCTTCCAGTCAAGC-TTATGAGCTGTATGAGCTAGATGC	
B1P			46					TAGTTGAAACAACCTGGCCTGCTTGA-CCTGAAACAAAAGGTGGTGTC	
F2	98	122	25	62.25	-3.15	-6.08	0.44	TTATGAGCTGTATGAGCTAGATGCG	
F1c	140	164	25	64.65	-4.29	-5.26	0.48	ACTCATGGTCATCTTCCAGTCAAGC	
B2	238	258	21	59.12	-4.86	-5.51	0.48	CCTGAAACAAAAGGTGGTGTC	
B1c	192	216	25	65.00	-3.74	-5.26	0.44	TAGTTGAAACAACCTGGCCTGCTTGA	

Primer Information									
Save									
3	ID:7	dimer(minimum)dG=-2.16							
label	5'pos	3'pos	len	Tm	5'dG	3'dG	GCrate	Sequence	
F3	74	96	23	60.03	-3.39	-4.01	0.43	GTTATGCTCTTCTCAGGGGAAAT	
B3	265	288	24	60.99	-4.74	-4.60	0.46	CCTCATCTATCCCACTTTCAGAGA	
F1P			47					CCACTCATGGTCATCTTCCAGTCAA-GAGCTGTATGAGCTAGATGCGG	
B1P			46					TAGTTGAAACAACCTGGCCTGCTTGA-CCTGAAACAAAAGGTGGTGTC	
F2	102	123	22	62.19	-5.59	-6.57	0.55	GAGCTGTATGAGCTAGATGCGG	
F1c	142	166	25	64.42	-5.35	-4.41	0.48	CCACTCATGGTCATCTTCCAGTCAA	
B2	238	258	21	59.12	-4.86	-5.51	0.48	CCTGAAACAAAAGGTGGTGTC	
B1c	192	216	25	65.00	-3.74	-5.26	0.44	TAGTTGAAACAACCTGGCCTGCTTGA	

Estos son los sets de primers que se pueden elegir y están en dirección 5'-3'. Se debe elegir los que tengan un dG menor, uno equivalente a -4 o menos. De no ser así, elegir otro set de primers y de ellos el mejor.