



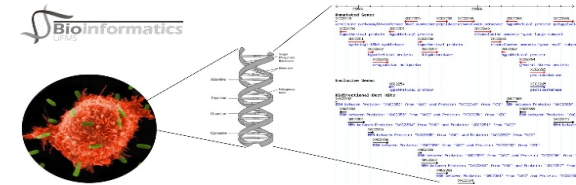
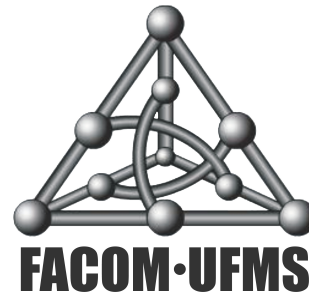
**BSB
EBB2012**

BRAZILIAN SYMPOSIUM ON BIOINFORMATICS
CAMPO GRANDE - MATO GROSSO DO SUL - BRAZIL

Ferramentas para projeto de *primers*



Luciana Montera
montera@facom.ufms.br



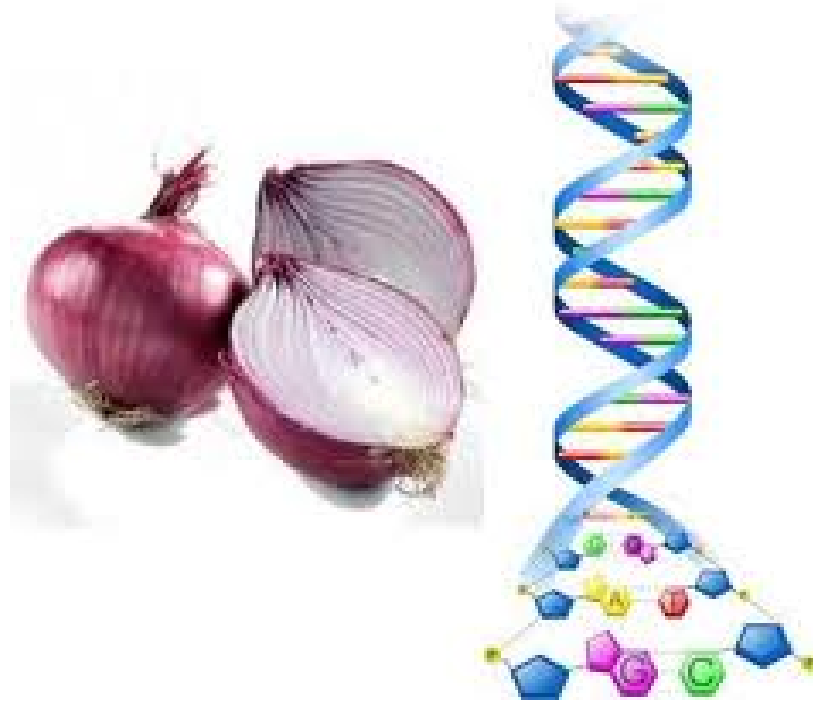
Bia Walter
bia.walter@gmail.com

Conteúdo



- * Bioinformática
- * O que são *primers*
- * Reações de PCR
- * Projeto de *primers*
- * Cálculo da Temperatura de *Melting*
- * *Softwares para análise de primers*
- * Base de dados de *primers*
- * Ferramentas para projeto de *primers*

Bioinformática



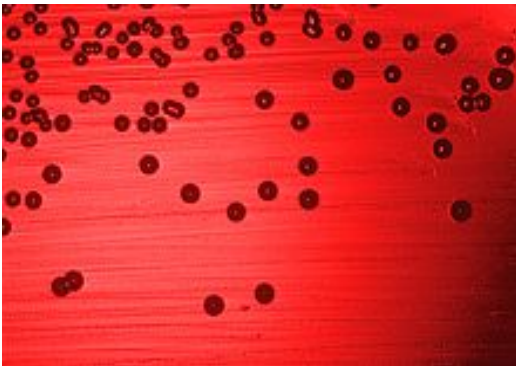
Haemophilus influenzae plasmid pA1209, complete sequence

GenBank: JQ783055.1

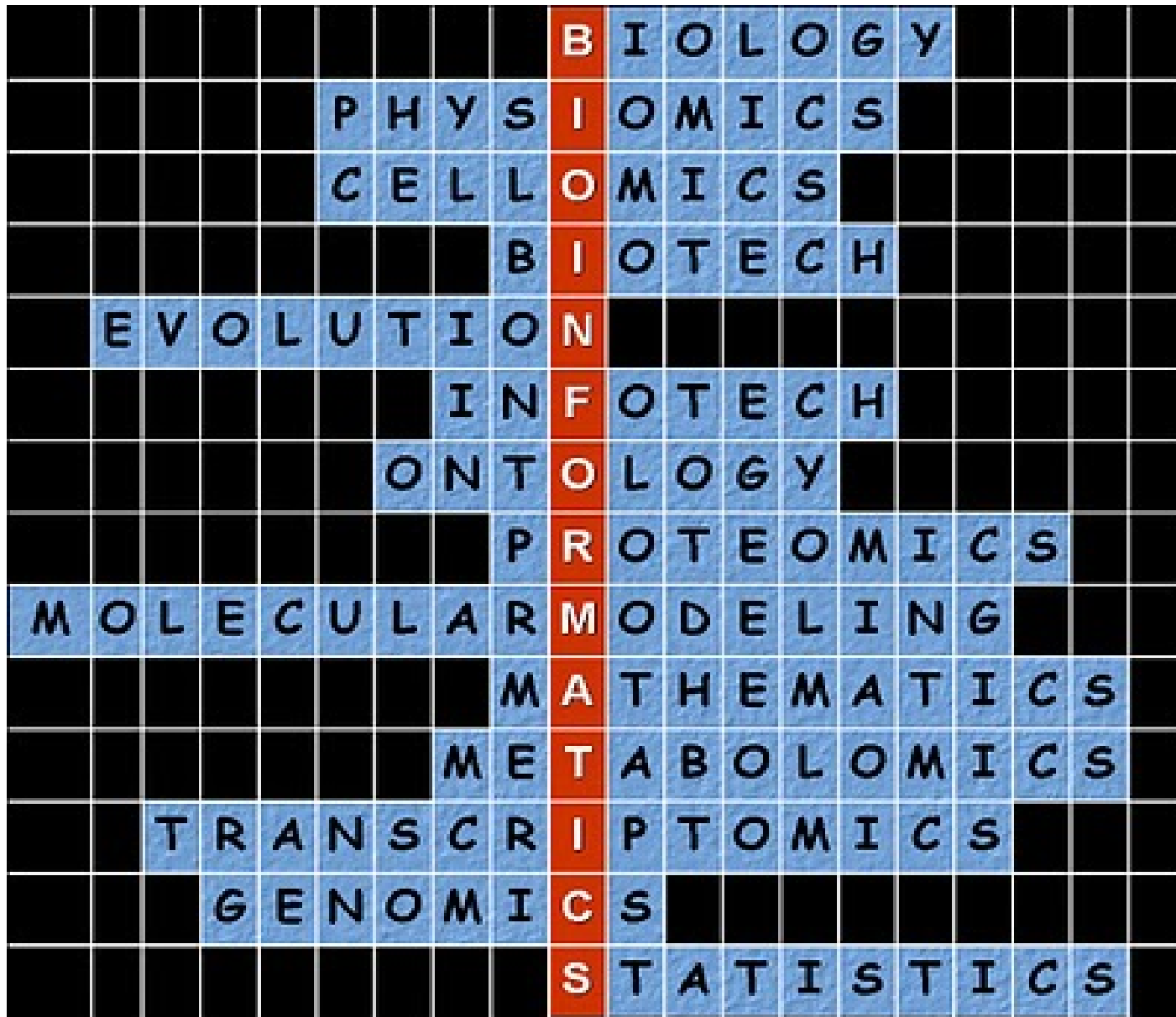
[GenBank Graphics](#)

>gi|392513885|gb|JQ783055.1| Haemophilus influenzae plasmid pA1209, complete sequence

```
AAAAAACAGGGCTGAAAGCCAAAAAGAGCCGAAAGGCTCTATTTTTTATATTTTATATTTTATCTTG
TTTTCGGATAGGCTAGAGCCTTTATTTGCAAGGGTTGTGGATTTTAAATATGTAGAAATTTGTCGTTTAA
TATGTAGAAATTTGTCGTTTAAATATGTAGAAATTTGTCGTTTAAATATGTAGAAATTTGTCGTTACTATGT
AAACCATATTTACTTTTTACATAGTTTTGTTATTATGTAGAAAGATAATTTCTTTACATAGATTTGGTGA
CCTATGACAAATGACCTTACAGTGGTGAAAGCGAATAGTTTGATTGAGGCTAGTTATCGCCTGACATTGG
ACGAAATGAGATTGTTAGCTTTAACGATTGGAACAATGAACCCAAAAAGCGATCAGCAAGTGTTGAGTT
TTCGGTGTCTGAATTTGTAAATCAATTTCTGATGTGAACGTAGATAGGGCGTACACACAAATAAAATCA
GCGATTGAGCGTATTTCTGAACGTTGGGTAAAGACGGAAGATGAAAGGCACGTTACTAAATTTAGATGGG
TGTCGTCTCAAACGTATTTCAAGAAAGAGGGGCGATTTAAATAGCCCTAACCAATGAAATTATGCCTTA
TTTAACGCAGTTAAAGGGCAATTTACCCAATATCAACTTAATCATATCTCTGGTTTTACGAGTGTTTCAT
ACAATGCGTTTTTATGAGTTGCTAACTCAATACAAACGGGTTGGACAACGCTATATCACTATTGAAGATT
TGAAAAAATGGTTGCAACTTGAAGATAAATACAATTTGTGGGCTGAGTTACAACGTTGGGTTATAAAACC
GTCGTTAAATGAAATTAACGAAAAATCAGATCTCTTTGTTGAATATGAGCCAATGAAAAAAGGGCGAAAA
GTTACAGGTATTGAGTTTAGTATCACATACGAAAAACCAGTAAAAAACGCCAGCATTTCCGCATAAAA
ACAAGTACGGTACTTTGTTAAATTTAATGCTCAAGATCCAAAATTCAGCTCTCACGAATATTCAGTTTA
TGCTAAAGATTGCCTAAAAATACTAGATGATTTTTATAGTGATCTAGCTGATGTTACGTTAGAAGATTTG
GTTTTTTATGCGAAGTTTTTAGCGGTCAATCAAAGCCATAAATCAAAGTTTGGGAAAGAGCGAAATATCT
GGGCTGAATTGAAAAAGAGAGGTTATAAGCTATCGCAATATGAATTGGTTGAAATACCAAAAAATCAAAT
AGATTTTGTGAGTAACTATGAAAAAATTGAACAATAAGGTGGTTTATAATGTGTACTTTAATGCAAA
AAGATAGCTTAATTCATTTAGTTGCTGAAGCTCAAGCAACATTAACATTAAGAATTGATCCAGGGGTCTG
ACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTA
GATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGT
TACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTGTTTCATCCATAGTTGCCTGAC
TCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCG
AGACCCACGCTCACC GGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGT
GGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTTCGC
CAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTGCAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTAT
GGCTTCATTAGCTCCGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCG
GTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCAGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGG
CAGCACTGCATAATTCTTTACTGTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAAC
CAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAACACGGGATAATACC
GCACCACATAGCAGAACTTTAAAGTGCTCATCATTGGAACGTTCTTGCGGGGCGAAAACTCTCAAGGA
TCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCAACTGATCTTCAGCA
```

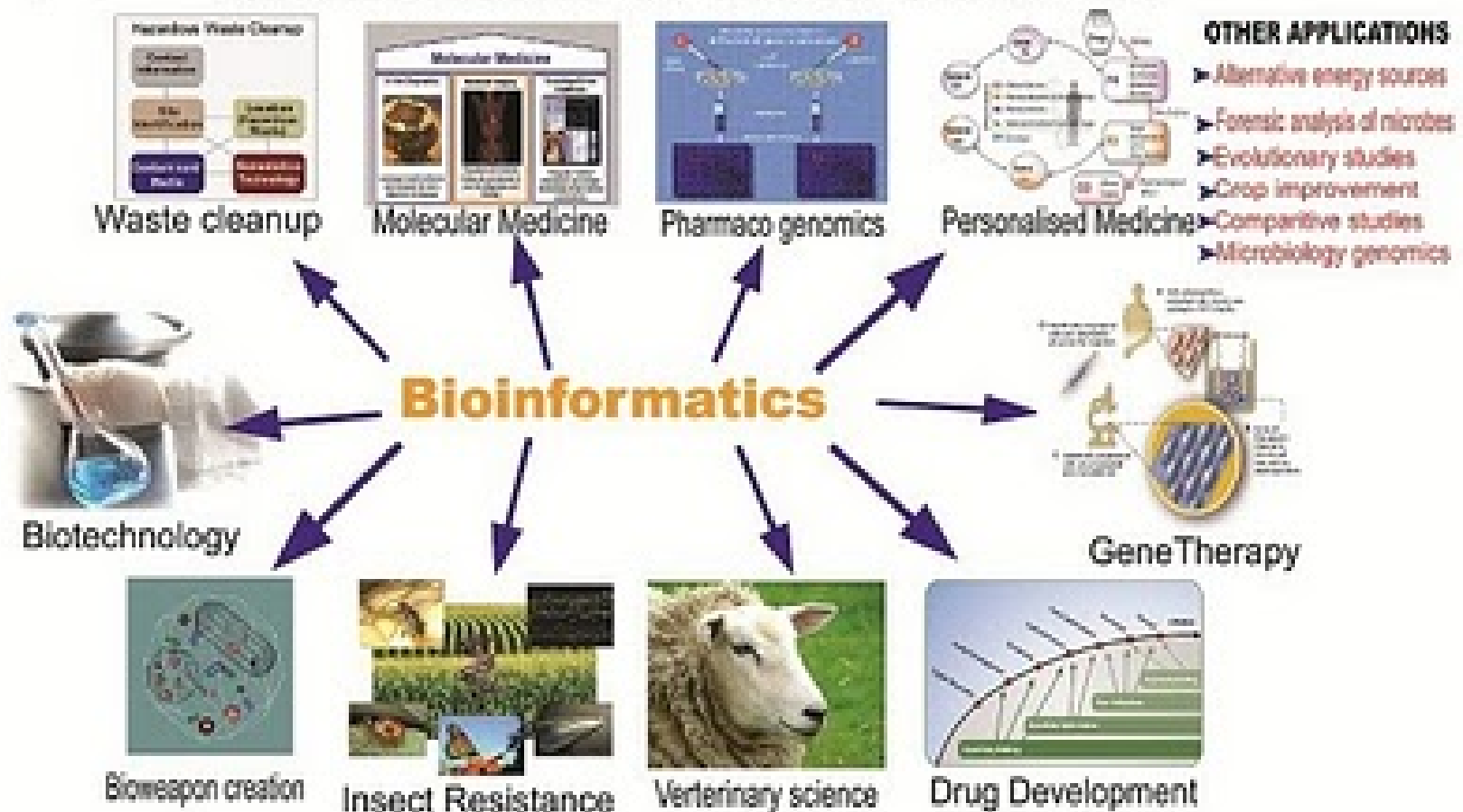


Bioinformática



Bioinformática

APPLICATIONS OF BIOINFORMATICS

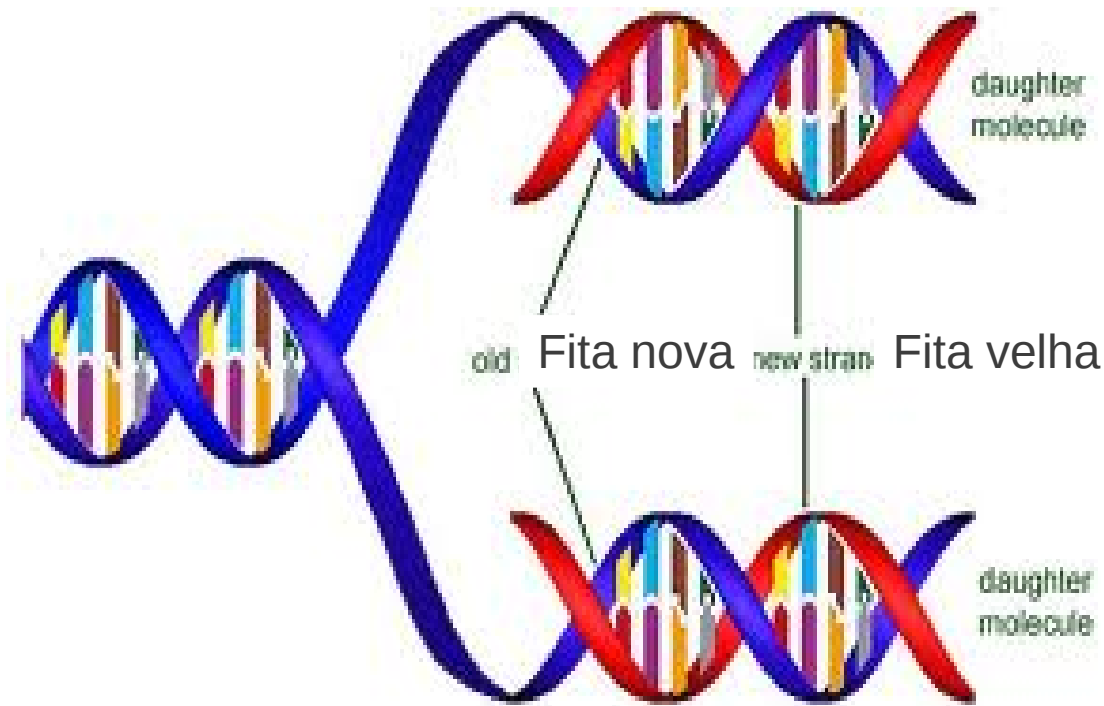


O que são *primers*?

Cadeias de nucleotídeos que atuam como iniciadores do processo de **replicação de DNA**

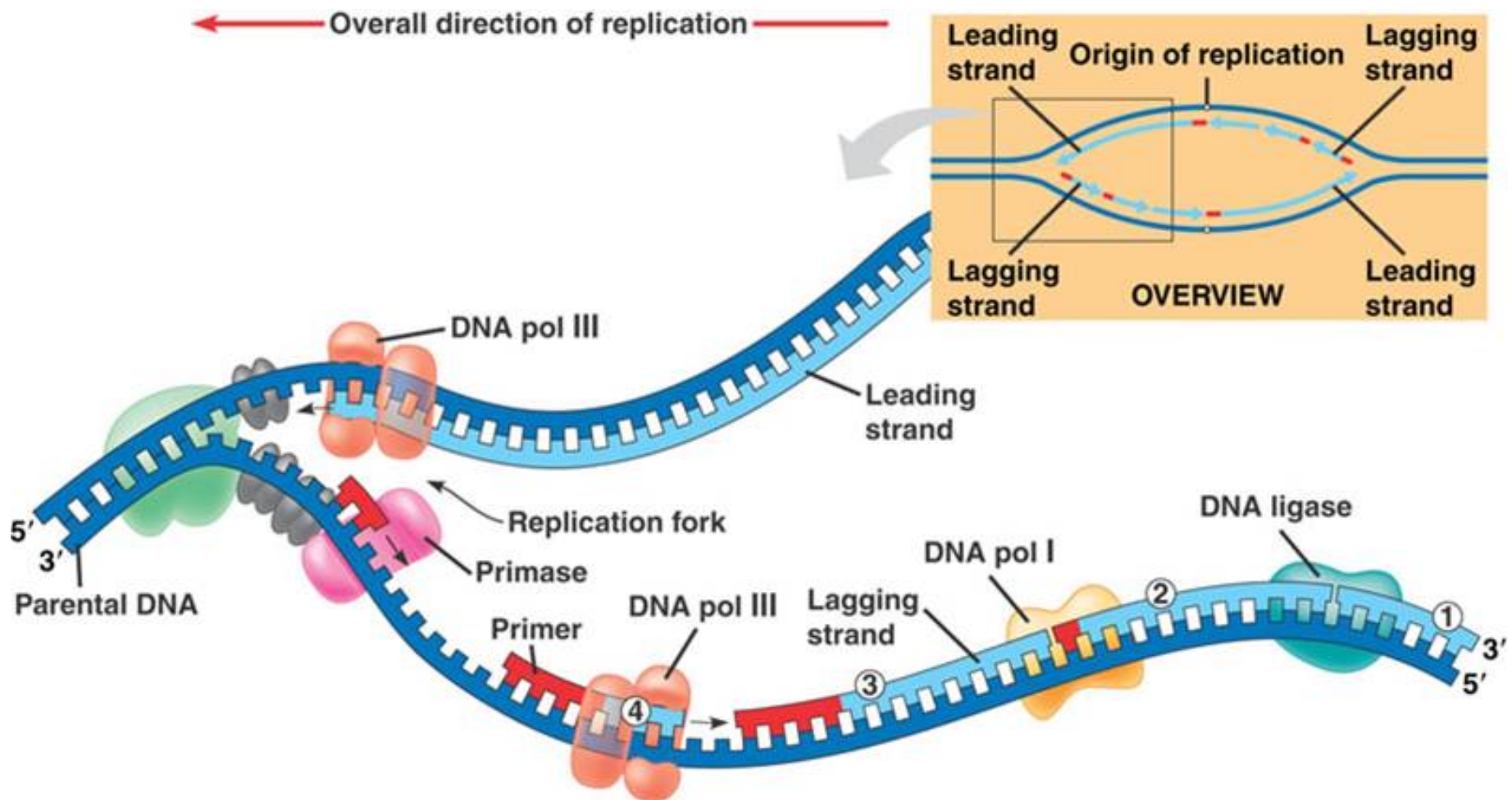
O que são *primers*?

Cadeias de nucleotídeos que atuam como iniciadores do processo de **replicação de DNA**



O que são *primers*?

Cadeias de nucleotídeos que atuam como iniciadores do processo de **replicação de DNA**

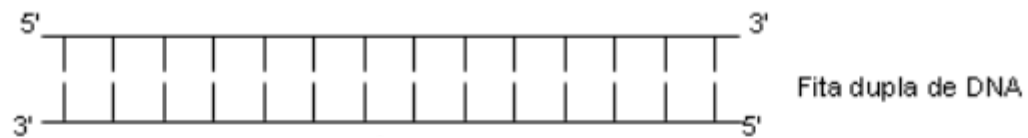


O que são *primers*?

Cadeias **sintéticas** de nucleotídeos que atuam como iniciadores do processo de **replicação de DNA**

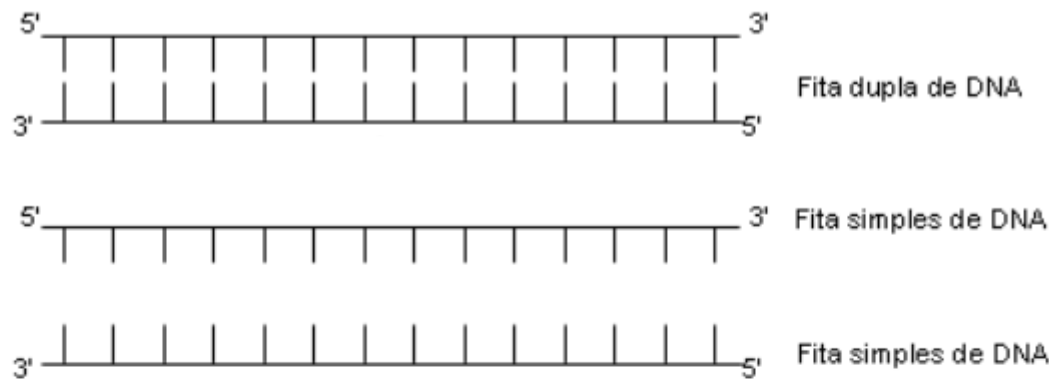
O que são *primers*?

Cadeias **sintéticas** de nucleotídeos que atuam como iniciadores do processo de **replicação de DNA**



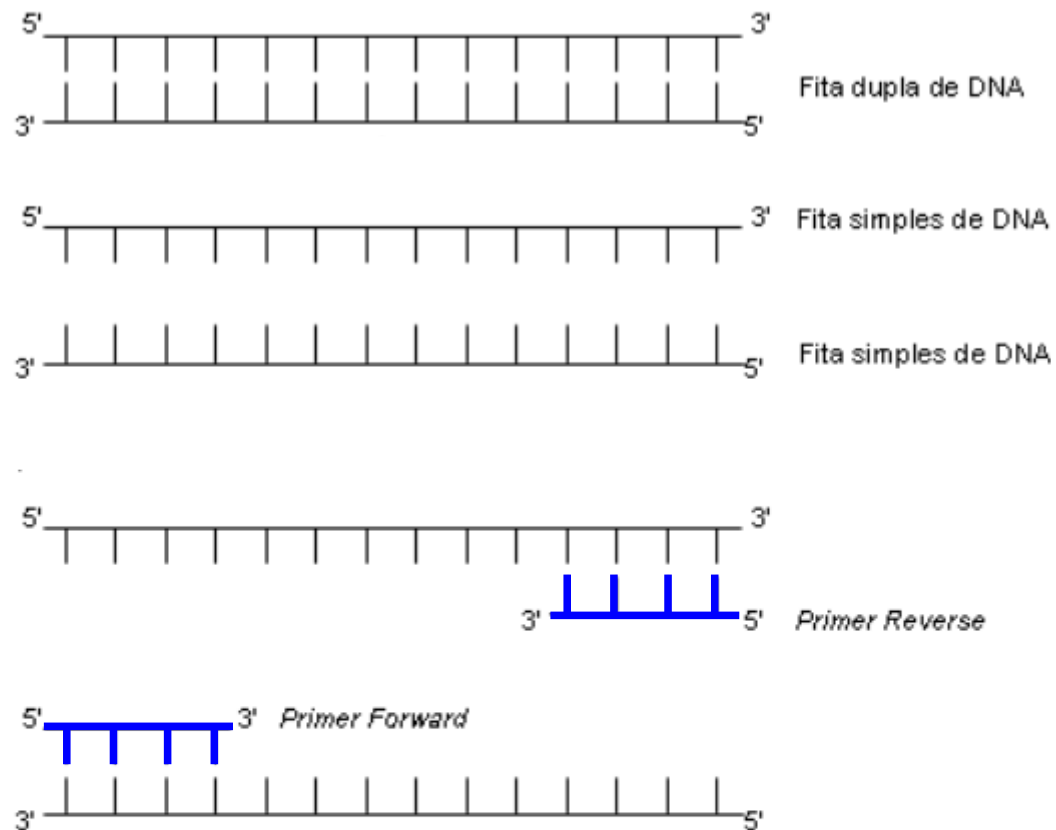
O que são *primers*?

Cadeias **sintéticas** de nucleotídeos que atuam como iniciadores do processo de **replicação de DNA**



O que são *primers*?

Cadeias **sintéticas** de nucleotídeos que atuam como iniciadores do processo de **replicação de DNA**



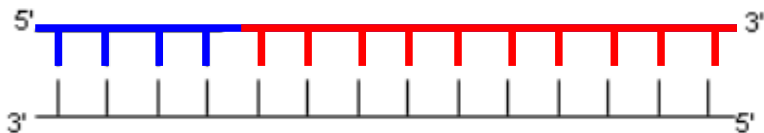
O que são *primers*?

Cadeias **sintéticas** de nucleotídeos que atuam como iniciadores do processo de **replicação de DNA**



O que são *primers*?

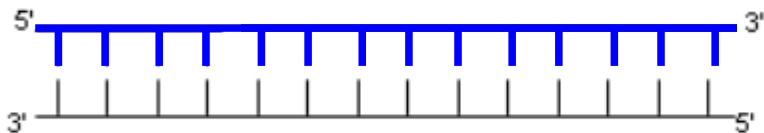
Cadeias **sintéticas** de nucleotídeos que atuam como iniciadores do processo de **replicação de DNA**



O que são *primers*?

Cadeias **sintéticas** de nucleotídeos que atuam como iniciadores do processo de **replicação de DNA**

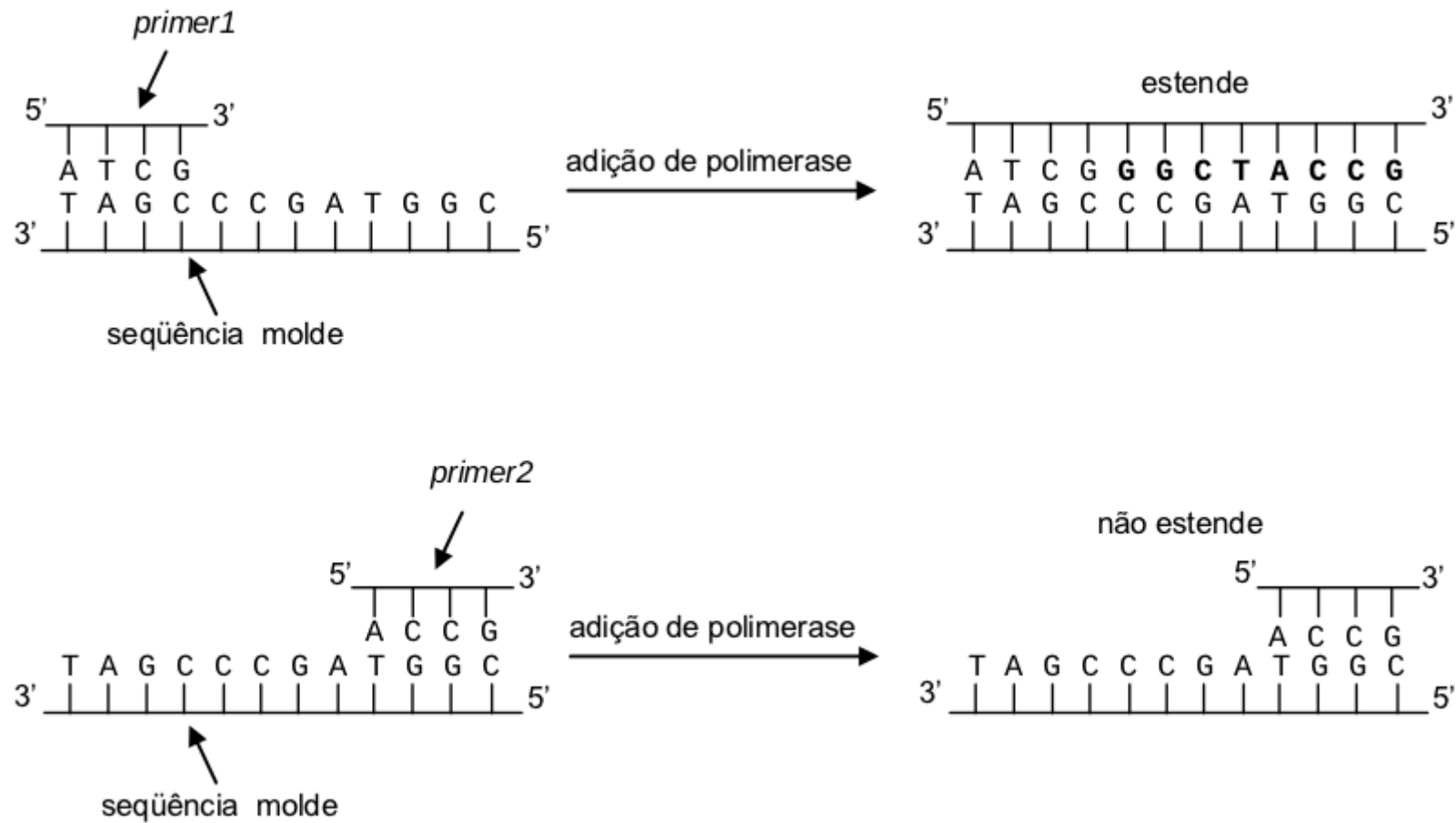
ATCCGCGTAGACTCGCACAGTAGCGCAT
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
TAGGCGCATCTGAGCGTGTCATCGCGTA



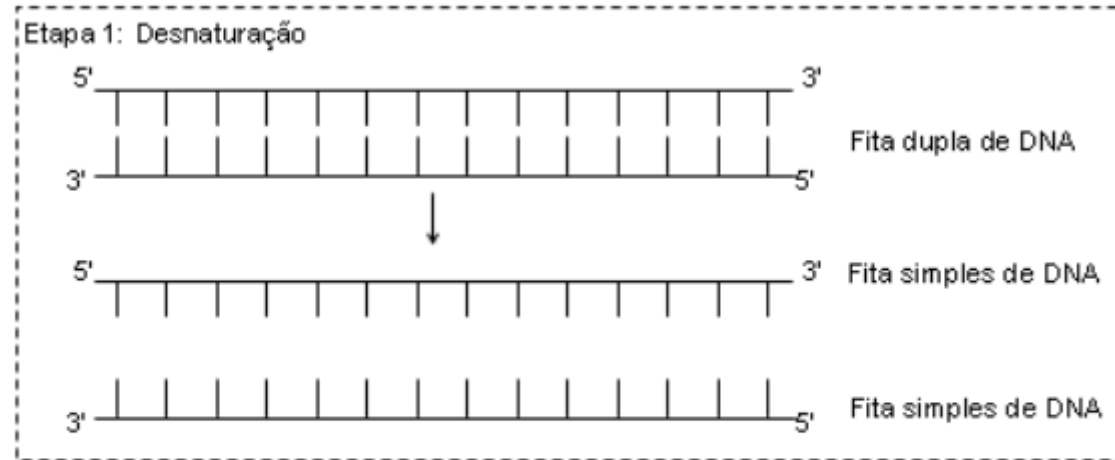
O que são *primers*?



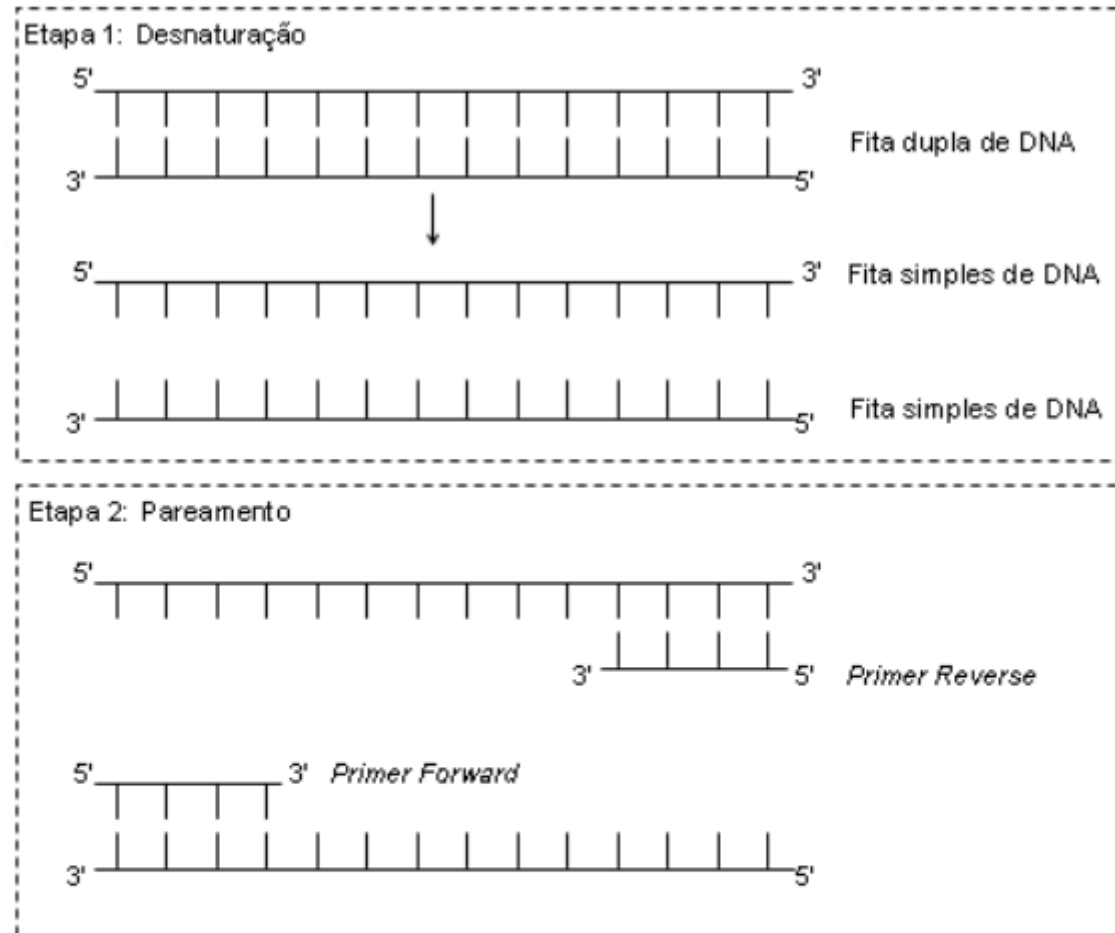
O que são *primers*?



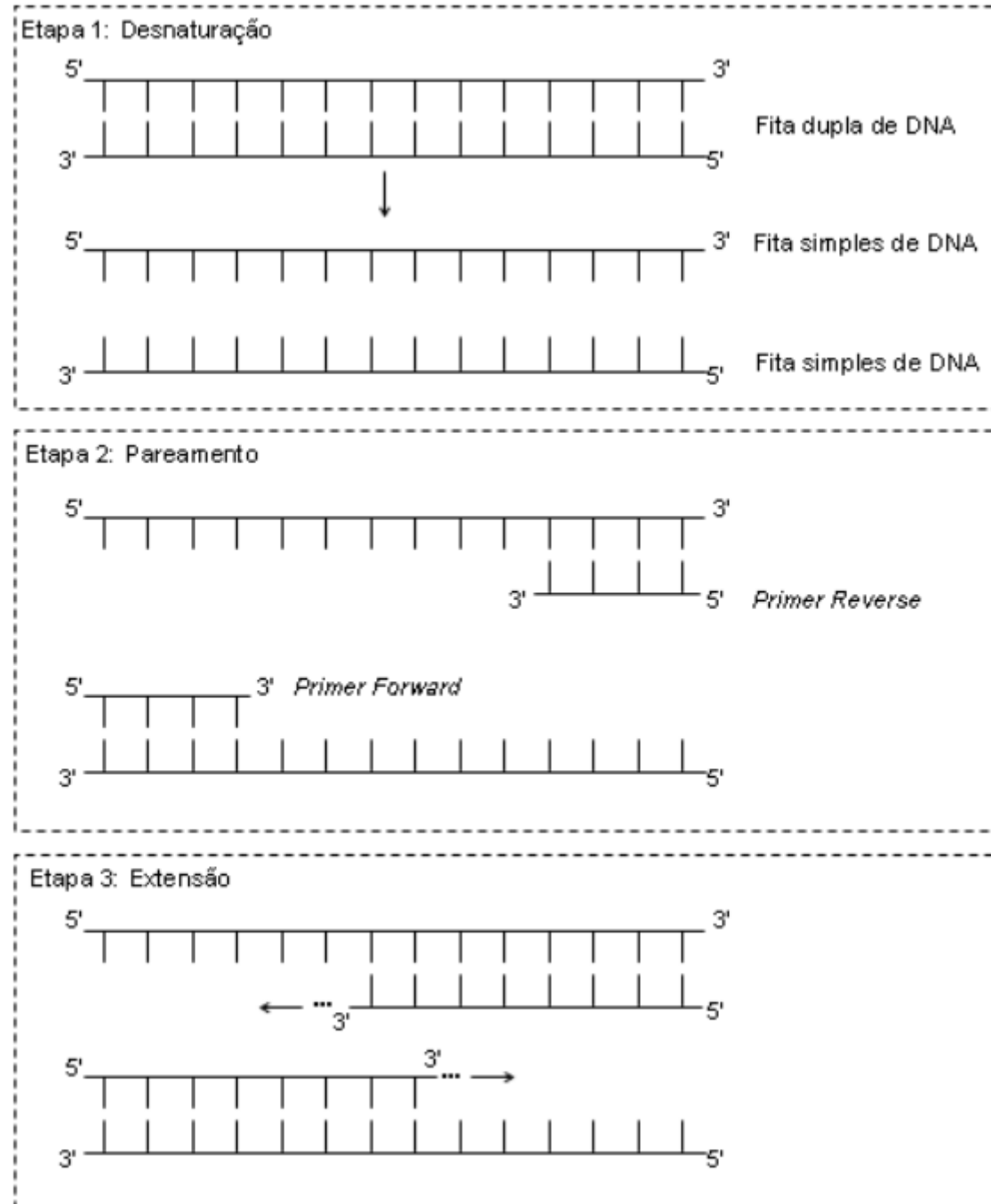
Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)



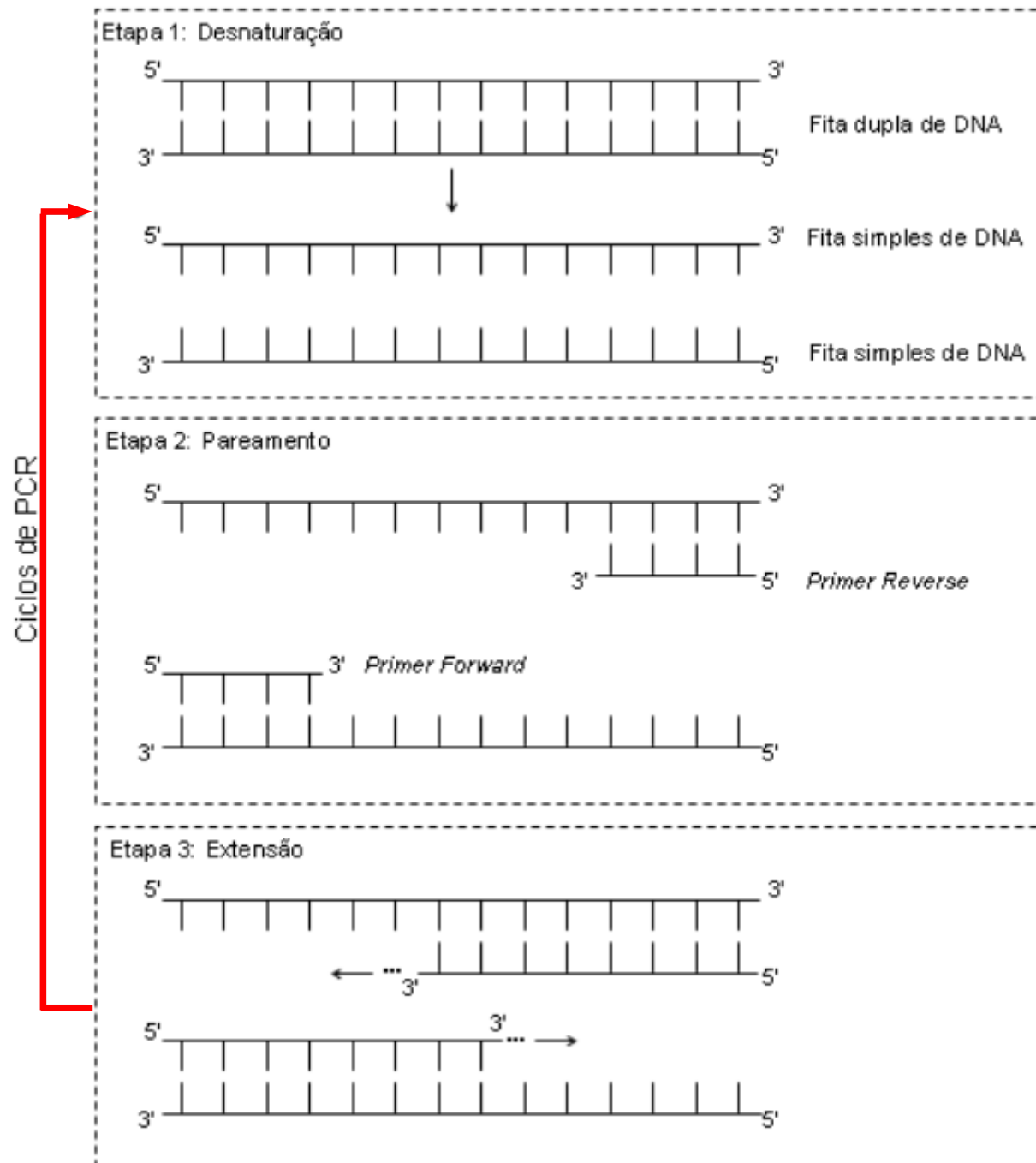
Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)



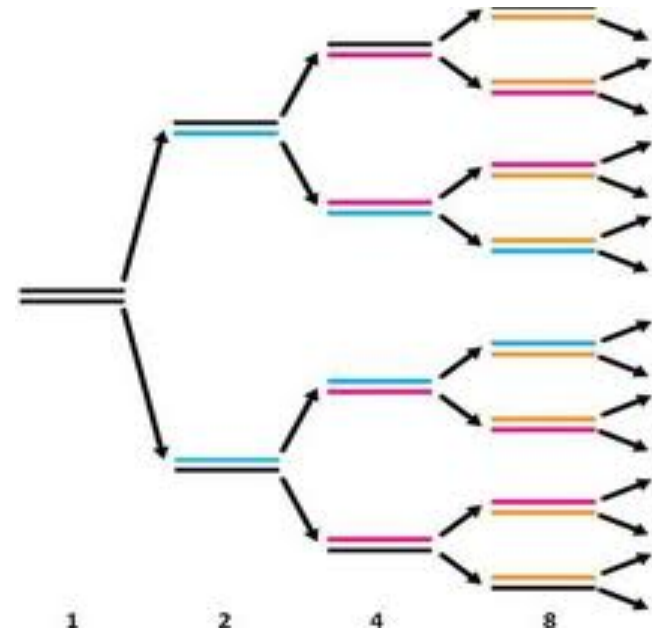
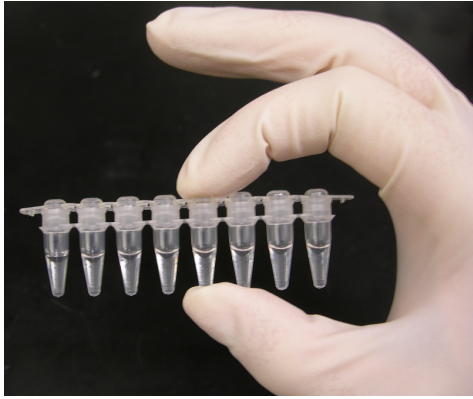
Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)



Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)



Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)



Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)

Ingredientes

- * DNA molde
- * *primers*
- * enzima do tipo polimerase
- * nucleotídeos

Protocolo

- * Número de ciclos
- * Duração de cada ciclo
- * Temperatura em cada uma das etapas
Desnaturação
Pareamento
Extensão
- * Duração de cada uma das etapas
Desnaturação
Pareamento
Extensão

Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)

Ingredientes

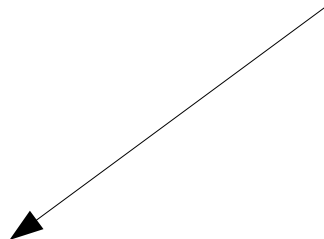
- * DNA molde
- * *primers*
- * enzima do tipo polimerase
- * nucleotídeos

Protocolo

- * Número de ciclos
- * Duração de cada ciclo
- * Temperatura em cada uma das etapas
Desnaturação
Pareamento
Extensão
- * Duração de cada uma das etapas
Desnaturação
Pareamento
Extensão

Exemplo de Programa de ciclagem

- * 96°C por 1 minuto
- * Repetir 25 ciclos de:
 - 96°C por 10 segundos
 - 50°C por 5 segundos
 - 60°C por 4 minutos

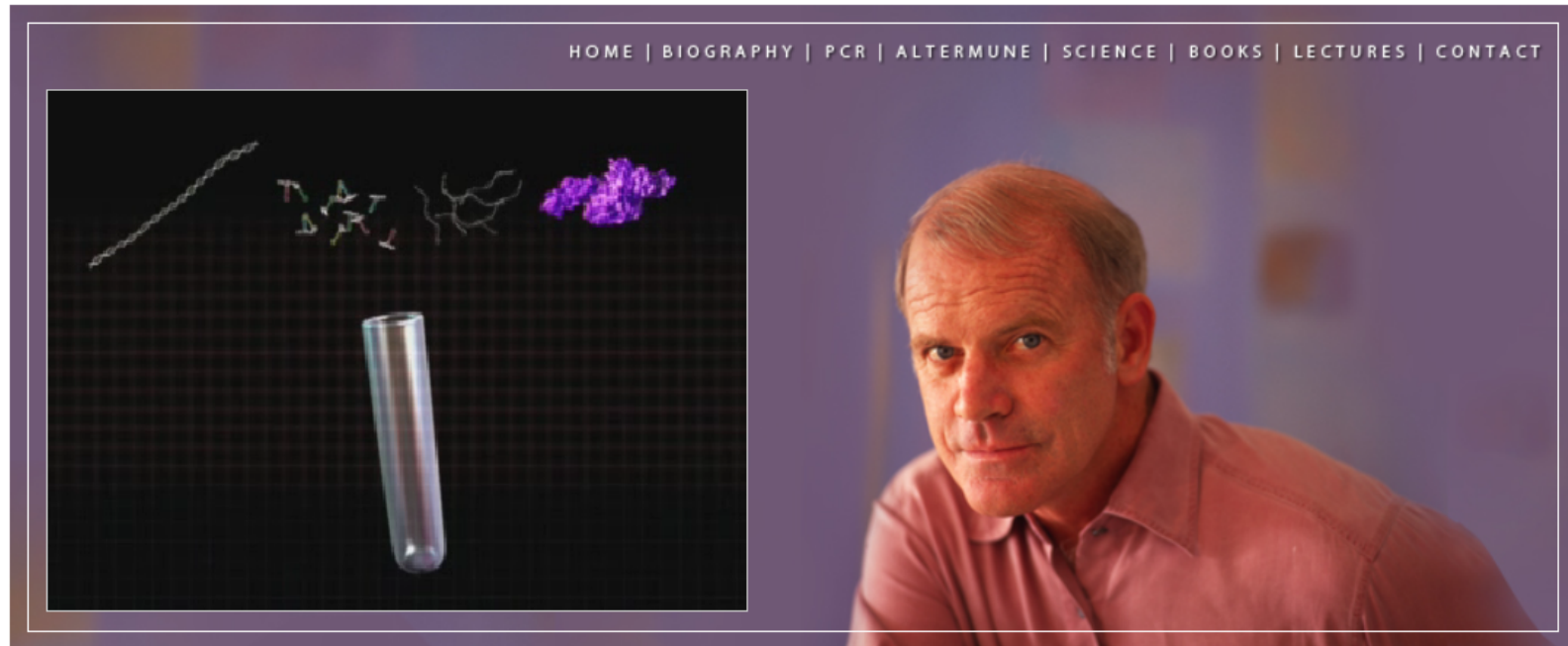


Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)

http://www.karymullis.com



Google



Polymerase Chain Reaction

Making DNA accessible

Most people in molecular biology today are not old enough to remember pre-PCR. But try to do your job without it, and you will see what a difference that simple little technique has made.

'Polymerase Chain Reaction' is now a word in Merriam Webster's Collegiate Dictionary and if you put 'PCR' into Google, you get 18,000,000 hits. If you type in 'pcr song,' you get a lovely little ditty courtesy of Bio-Rad, which will rattle around in your brain like an insane cat in your garage. Try it.

When I stumbled on PCR in the spring of 1983, I was trying to increase the demand for oligonucleotides, which before automation my laboratory had made by hand. Our new machine from my friend Ron Cook at Biosearch across the San Francisco bay had threatened job stability in the laboratory by doing what had taken us about three weeks to do, in eight hours—and it did it every eight hours, no breaks.

Downloads & Links

[The Academy's press release](#)

[Questions about PCR](#)

[Interview \(David J. Brown\)](#)

[Nobel Lecture \(Dec 8, 1993\)](#)

[Video Interview \(June, 2005\)](#)

[YouTube - The PCR Song](#)

[Buy PCR-Book at Amazon \(U.S.\)](#)



Projeto de *Primers*

Características desejáveis

- Tamanho:
- % de bases C e G:
- Temperatura de *melting*annealing:
- Diferença entre as T_m dos *primers* F e R:
- Base na extremidade 3':
- Sem ocorrência de *runs*, *repeats* e estruturas secundárias

Projeto de *Primers*

Características desejáveis

- **Tamanho:** entre 18 e 24 pares de bases
- **% de bases C e G:** entre 45 e 60%
- **Temperatura de *meltingannealing*:** entre 45 e 55 °C
- **Diferença entre as T_m dos *primers* F e R:** máximo de 5 °C
- **Base na extremidade 3':** C ou 3'G
- **Sem ocorrência de *runs*, *repeats* e estruturas secundárias**

Projeto de *Primers*

Tamanho e Especificidade

Um *primer* é específico se ele se pareia com o *template* apenas na região específica para a qual ele foi projetado

Quanto **Maior** Tamanho do *primer* → Mais **específico**
Mais **estável**
Mais propenso a formação de **estruturas secundárias**

Projeto de *Primers*

Tamanho e Especificidade

Um *primer* é específico se ele se pareia com o *template* apenas na região específica para a qual ele foi projetado

Quanto **Maior** Tamanho do *primer* → Mais **específico**
Mais **estável**
Mais propenso a formação de **estruturas secundárias**

Tamanhos entre 18 e 30 bases são preferidos

Projeto de *Primers*

%CG

Quanto maior a quantidade de bases C e G, mais fortemente o *primer* se ligará ao *template*

Influenciam na temperatura na qual o pareamento *primer* – *template* ocorrerá

Projeto de *Primers*

%CG

Quanto maior a quantidade de bases C e G, mais fortemente o *primer* se ligará ao *template*

Influenciam na temperatura na qual o pareamento *primer* – *template* ocorrerá

Valores entre 40 e 60% são preferidos

Projeto de *Primers*

Base na extremidade 3'

Extremidade pela qual a enzima polimerase inicia a extensão do *primer*

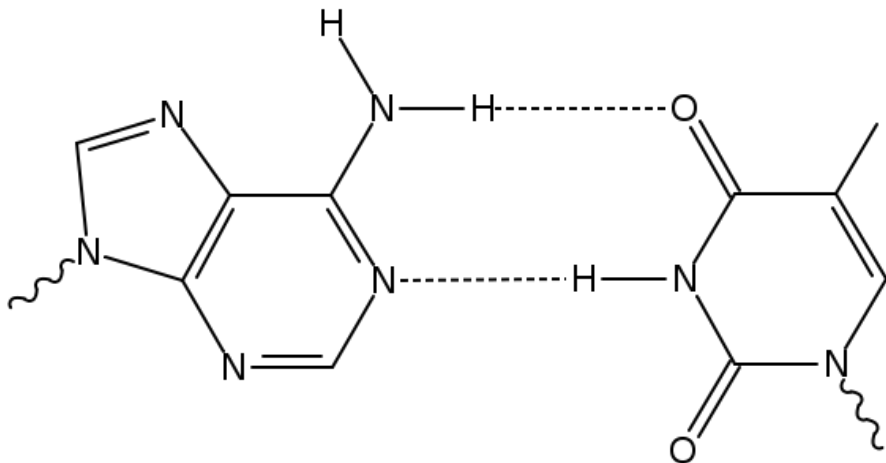
Ligação C – G mais estável do que ligação A – T

Projeto de *Primers*

Base na extremidade 3'

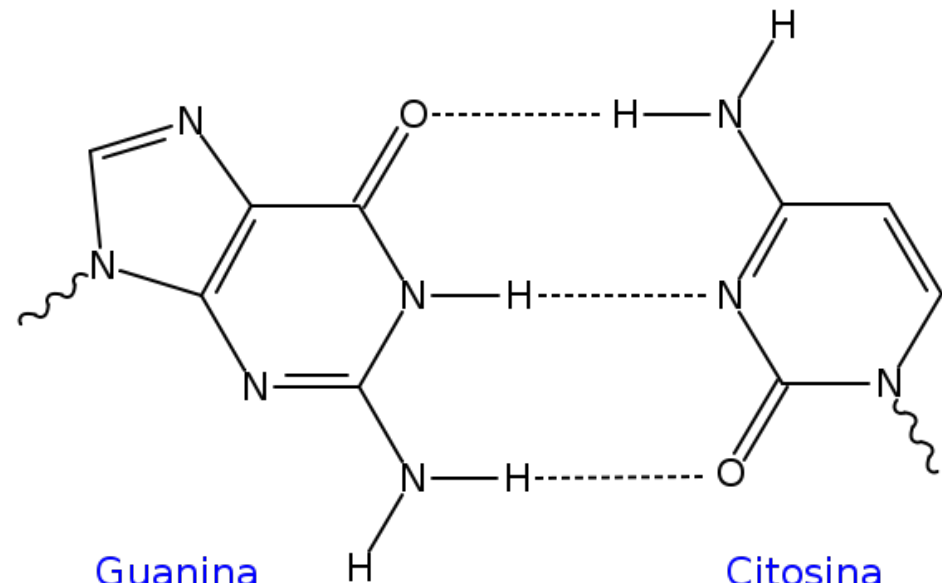
Extremidade pela qual a enzima polimerase inicia a extensão do *primer*

Ligação C – G mais estável do que ligação A – T



Adenina

Timina



Guanina

Citosina

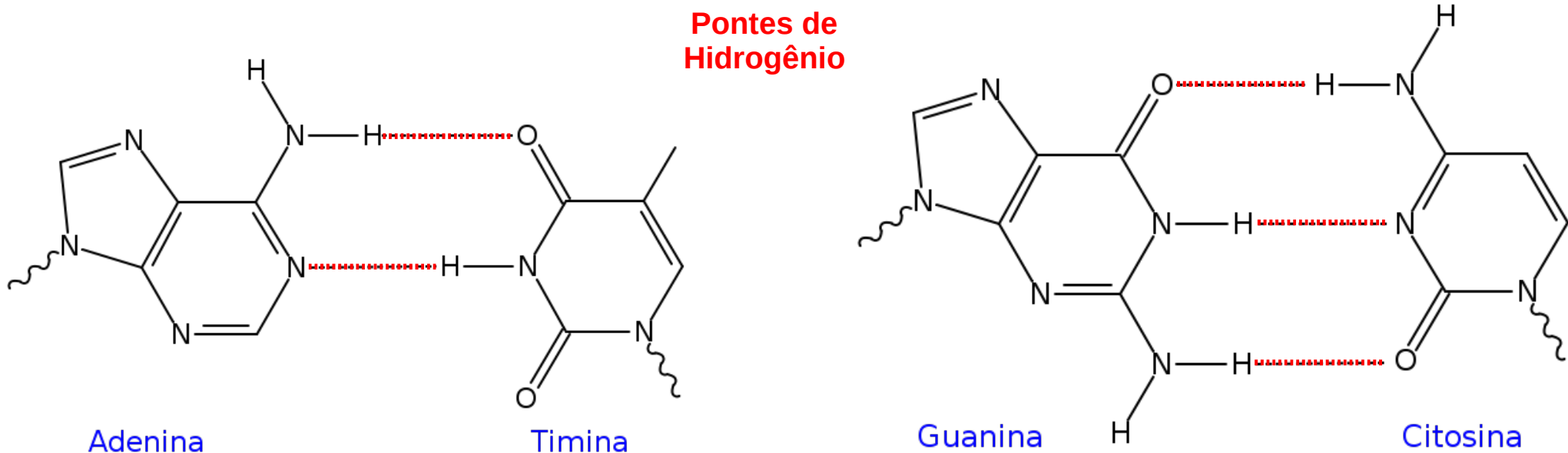
Projeto de *Primers*

Base na extremidade 3'

Extremidade pela qual a enzima polimerase inicia a extensão do *primer*

Base C ou G é preferida na extremidade 3' do *primer*

Ligação C – G mais estável do que ligação A – T



Projeto de *Primers*

Runs e Repeats

A repetição consecutiva de uma única base na sequência do *primer* define um *run*

A ocorrência repetida de uma subsequência de nucleotídeos em posições consecutivas na sequência de um *primer* define um *repeat*.

Projeto de *Primers*

T_m e T_a

Temperatura de *melting* (T_m): temperatura na qual metade das moléculas de DNA estão na forma desnaturada

Temperatura de *annealing* (T_a): temperatura na qual a extensão do *primer* ocorre

Projeto de *Primers*

T_m e T_a

Temperatura de *melting* (T_m): temperatura na qual metade das moléculas de DNA estão na forma desnaturada

Temperatura de *annealing* (T_a): temperatura na qual a extensão do *primer* ocorre

Diferença preferida entre as T_m dos *primers* F e R de 5°C

T_a deve ser de 3°C a 5°C abaixo da T_m

Cálculo da Temperatura de *Melting*

Aproximações para o cálculo da T_m

Cálculo da Temperatura de *Melting*

Aproximações para o cálculo da T_m

- 1) Básicas
- 2) Dependentes do Sal
- 3) Baseadas na Termodinâmica da reação

Cálculo da Temperatura de *Melting*

Aproximações para o cálculo da T_m

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

$$T_m = \frac{64.9 + 41 * (|C| + |G| - 16.4)}{(|A| + |T| + |C| + |G|)}$$

$$T_m = 100.5 + 41 * \frac{|C| + |G| - 6.4}{|A| + |T| + |C| + |G|} - \frac{820}{|A| + |T| + |C| + |G|} + 16.6 * \log[Na^+]$$

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

$$T_m = \frac{64.9 + 41 * (|C| + |G| - 16.4)}{(|A| + |T| + |C| + |G|)}$$

$$T_m = 100.5 + 41 * \frac{|C| + |G| - 6.4}{|A| + |T| + |C| + |G|} - \frac{820}{|A| + |T| + |C| + |G|} + 16.6 * \log[Na^+]$$

$$T_m = \frac{\Delta H}{\Delta S + R * \ln \frac{\gamma}{4}} - 273.15 + 16.6 * \log[Na^+]$$

Cálculo da Temperatura de *Melting*

Aproximações para o cálculo da T_m

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

$$T_m = \frac{64.9 + 41 * (|C| + |G| - 16.4)}{(|A| + |T| + |C| + |G|)}$$

$$T_m = 100.5 + 41 * \frac{|C| + |G| - 6.4}{|A| + |T| + |C| + |G|} - \frac{820}{|A| + |T| + |C| + |G|} + 16.6 * \log[Na^+]$$

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

$$T_m = \frac{64.9 + 41 * (|C| + |G| - 16.4)}{(|A| + |T| + |C| + |G|)}$$

$$T_m = 100.5 + 41 * \frac{|C| + |G| - 6.4}{|A| + |T| + |C| + |G|} - \frac{820}{|A| + |T| + |C| + |G|} + 16.6 * \log[Na^+]$$

$$T_m = \frac{\Delta H}{\Delta S + R * \ln \frac{\gamma}{4}} - 273.15 + 16.6 * \log[Na^+]$$

Atividade 1

O objetivo geral desta atividade é a motivação quanto a necessidade da utilização de softwares para realização da tarefa de desenho de *primers*.

Base de dados de *primers*



MASSACHUSETTS
GENERAL HOSPITAL



The Center for Computational
and Integrative Biology



HARVARD
MEDICAL SCHOOL

PrimerBank

PCR Primers for Gene Expression Detection and Quantification

[Home/Search](#)[PCR Protocol](#)[Primer Statistics](#)[Comments](#)[Primer
Submission](#)[Links](#)[Citation Policy](#)[Help/FAQ](#)

Primer Search

Search for PCR Primers

Search by

Species

For text

You can blast your sequence against the primerbank
sequence DB [here](#).

Order Oligos

You can have primers synthesized and PCR reaction products
sequenced at:

DNA Core Facility
Center for Computational and Integrative Biology

PrimerBank is a public resource for PCR primers. These primers are designed for gene expression detection or quantification (real-time PCR). PrimerBank contains over 306,800 primers covering most known human and mouse genes. There are several ways to search for primers: GenBank Accession, NCBI protein accession, NCBI Gene ID, Gene Symbol ^{New!}, PrimerBank ID or Keyword (gene

Ferramenta para análise de *primers*

AutoDimer

<http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/AutoDimerHomepage>

MultiPLX

<http://bioinfo.ut.ee/multiplx/>

OligoAnalyser

<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>

OligoTM

<http://bioinfo.ut.ee/oligotm/>

Ferramentas para projeto de *primers*

- * Online e/ou standalone
- * comercial ou livre
- * específica

Ferramentas para projeto de *primers*

* Online e/ou standalone

* comercial ou livre

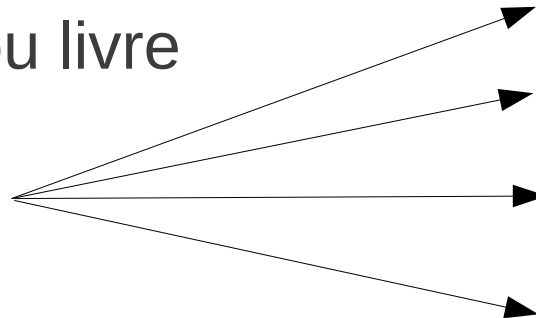
* específica

Amplificação

Clonagem

Deteção

Sequenciamento



Ferramentas para projeto de *primers*

* Online e/ou standalone

* comercial ou livre

* específica

Amplificação

Clonagem

Deteccção

Sequenciamento

http://www.humgen.nl/primer_design.html

Ferramentas para projeto de *primers*

Primers para Detecção

OligoPerfect™ Design

<http://tools.invitrogen.com/content.cfm?pageid=9716>

BatchPrimer3

<http://probes.pw.usda.gov/batchprimer3/index.html>

Primer3Plus

<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>

PrimerQuest

<http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/PrimerQuest/Default.aspx>

NCB/Primer-Blast

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

Ferramentas para projeto de *primers*

Real Time PCR (<http://www.youtube.com/watch?v=QVeVIM1yRMU>)

GenScript Real-time PCR (TaqMan) Primer Design

<https://www.genscript.com/ssl-bin/app/primer>

Multiplex PCR

O que falta?

Problemas relacionados:

Dado um conjunto $S = \{s_1, s_2, s_3, \dots, s_k\}$ de k sequências em uma mesma amostra, pede-se:

- *primers* específicos para que uma região de tamanho w seja amplificada de s_i , para $1 \leq i \leq k$
- *primers* específicos para que regiões de tamanho mínimo w sejam amplificadas de s_i e s_j para $1 \leq i, j \leq k$ e $i \neq j$
- *primers* específicos para que regiões de tamanho mínimo w sejam amplificadas de s_i e s_j para $1 \leq i, j \leq k$ e $i \neq j$