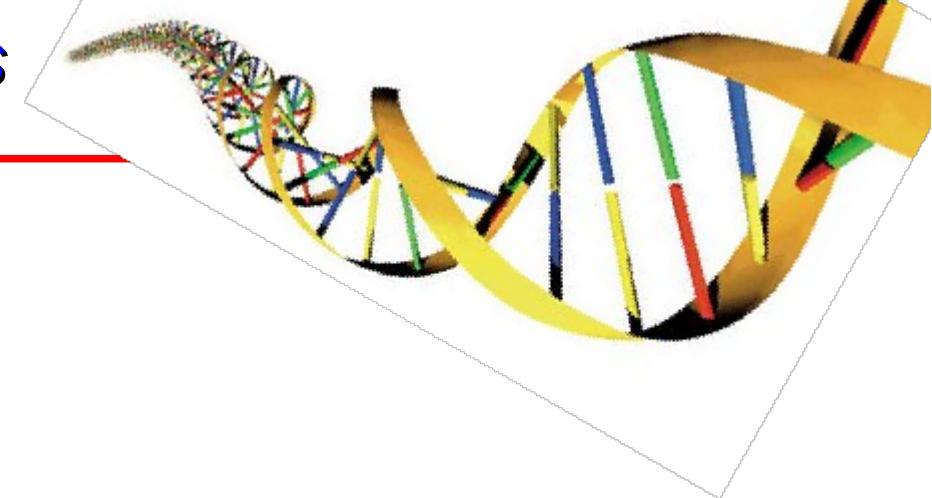




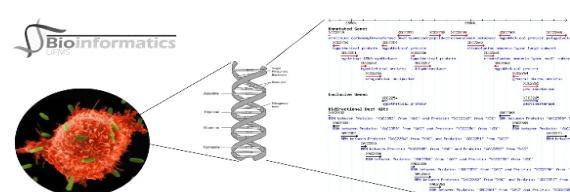
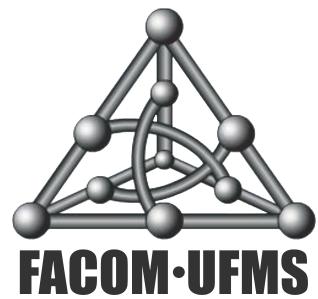
**BSB
EBB 2012**

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

Ferramentas para projeto de *primers*

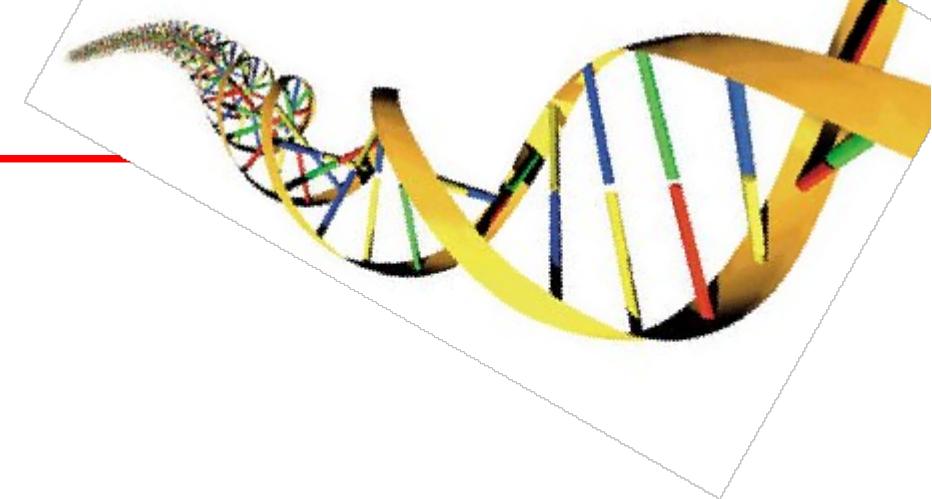


Luciana Montera
montera@facom.ufms.br



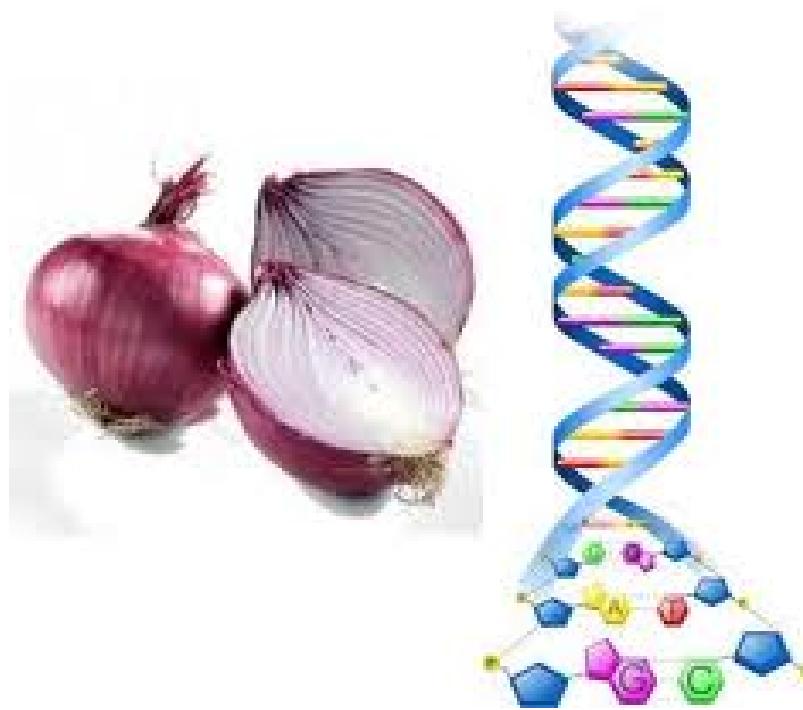
Bia Walter
bia.walter@gmail.com

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



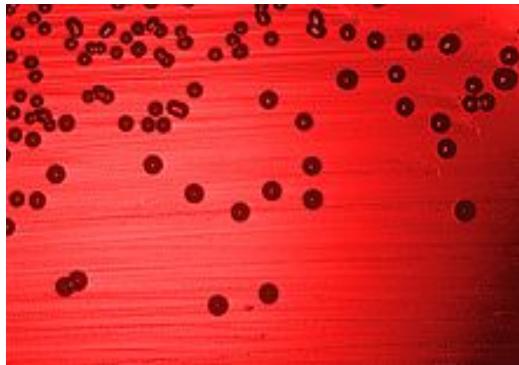
Haemophilus influenzae plasmid pA1209, complete sequence

GenBank: JQ783055.1

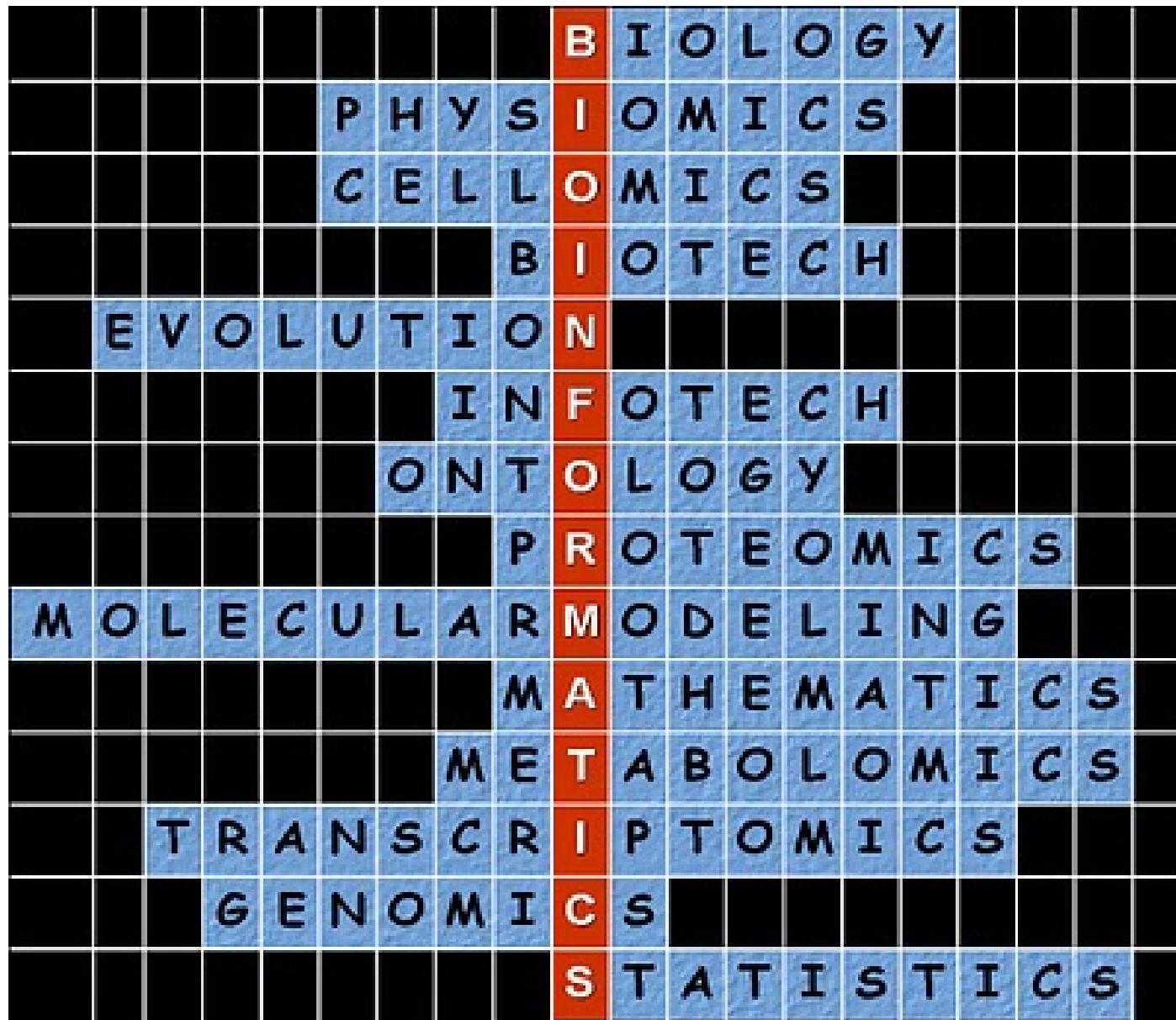
[GenBank Graphics](#)

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

AAAAAAACAGGGCTGAAAGCCCCAAAAGAGCCGAAAGGCCTATTTTTTATATTTTATATTTTATCTTG
TTTCGGATAGGCTAGAGCCTTATTGCAAGGGTTGGATTTAAATATGTAGAAATTGCGTTAA
TATGTAGAAATTGCGTTAATATGTAGAAATTGCGTTAATATGTAGAAATTGCGTTACTATGT
AAACCATACTTACATAGTTTGTATTATGTAGAAAGATAATTCTTACATAGATTGGTGA
CCTATGACAATGACCTTACAGTGGTAAAGCGAACAGTGGTATTGAGGCTAGTTATGCCGTACATTGG
ACGAAATGAGATTGTTAGCTTAACGATTGGAACAATGAACCCAAAAGCGATCAGCAAGTGGTCAAGT
TTCGGTGTCTGAATTGTAATCAATTCTGTAGTGAACGTAGATAGGGCGTACACACAAATAAATCA
GCGATTGAGCGTATTCTGAACGTTGGTAAAGACGGAAGATGAAAGGCACGTTACTAAATTAGTGG
TGTGCTCTAACGTATTCAAGAAAGAGGGCGATTAAAATAGCCCTAACCAATGAAATTATGCCCTA
TTAACGCACTTAAAGGGCAATTACCAATATCAACTTAATCATATCTGGTTTACGAGTGTTCAT
ACAATGCGTTTATGAGTTGCTAACTCAATACAACGGGTTGGACAACGCTATATCACTATTGAAGATT
TGAAAAAATGGTTGCAACTTGAAGATAAACATTGTTGGCTGAGTTAACACGTTGGTTATAAAC
GTCGTTAAATGAAATTACGAAAAATCAGATCTTGTGAATATGAGCCAATGAAAAAGGGCGAAAA
GTTACAGGTATTGAGTTAGTATCACATACGAAAAACAGTAAAAAACGCCAGCATTCCGATAAAA
ACAAGTACGGTACTTCGTTAAATTAAATGCTCAAGATCAAATTCTCACGAATATTCAAGTTA
TGCTAAAGATTGCCAAAAACTAGATGATTTATAGTGTAGCTGATGTTACGTTAGAAGATTG
GTTTTTATGCGAAGTTTAGCGGTCAATCAAAGCCATAATCAAAGTTGGAAAGAGCGAAATATCT
GGGCTGAATTGAAAAAGAGGGTTATAAGCTATCGCAATATGAATTGGTTGAAATACCAAAAAATCAAAT
AGATTGTTGAGTAAACTATGAAAAAATTGAACAATAAGGTGGTTATAATGTTACTTAATGCAA
AAGATAGCTTAATTCTTACTGCTGAAGCTCAAGCAACATTAACATTAAGAATTGATCCAGGGTCTG
ACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTGTCATGAGATTATCAAAGGATCTCACCTA
GATCCTTTAAATTAAAATGAAGTTAAATCAATCTAAAGTATATGAGTAAACTGGTCTGACAGT
TACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATGTCTATTGCTTACATCCATAGTTGCCTGAC
TCCCCGTCGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGCCCGAGCTGCTGCAATGATACCGCG
AGACCCACGCTCACGGCTCAGATTATCAGCAATAAACCGAGCCAGCCGGAGGGCCGAGCGCAGAAGT
GGTCCTGCAACTTATCCGCCCTCATCCAGCTTATTAAATTGTCAGGCTGAGTAAAGTGTAGTTGCG
CAGTTAATAGTTGCGAACGTTGCCATTGCTGAGGCTGAGTAAAGTGGCAGCAGTGTACTCATGGTATGG
GGCTTCATTCACTCCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGCAAAAAAGCG
GTTAGCTCTCGGTCTCGATCGTGTAGAAGTAAGTGGCAGCAGTGTACTCATGGTATGG
CAGCACTGCATAATTCTTACTGTCATGCCATCGTAAGATGTTCTGTGACTGGTAGTACTAAC
CAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCAGCGAGTTGCTCTTGGCCCGCTCAACACGGGATAATACC
GCACCAACATAGCAGAACATTAAAAGTGTCACTCATTGGAAAACGTTCTCGGGCGAAAACCTCAAGGA
TCTTACCGCTGAGATCCAGTCAGTGTAAACCACTCGTCACCCACTGACCCACTGATCTTCAGCA

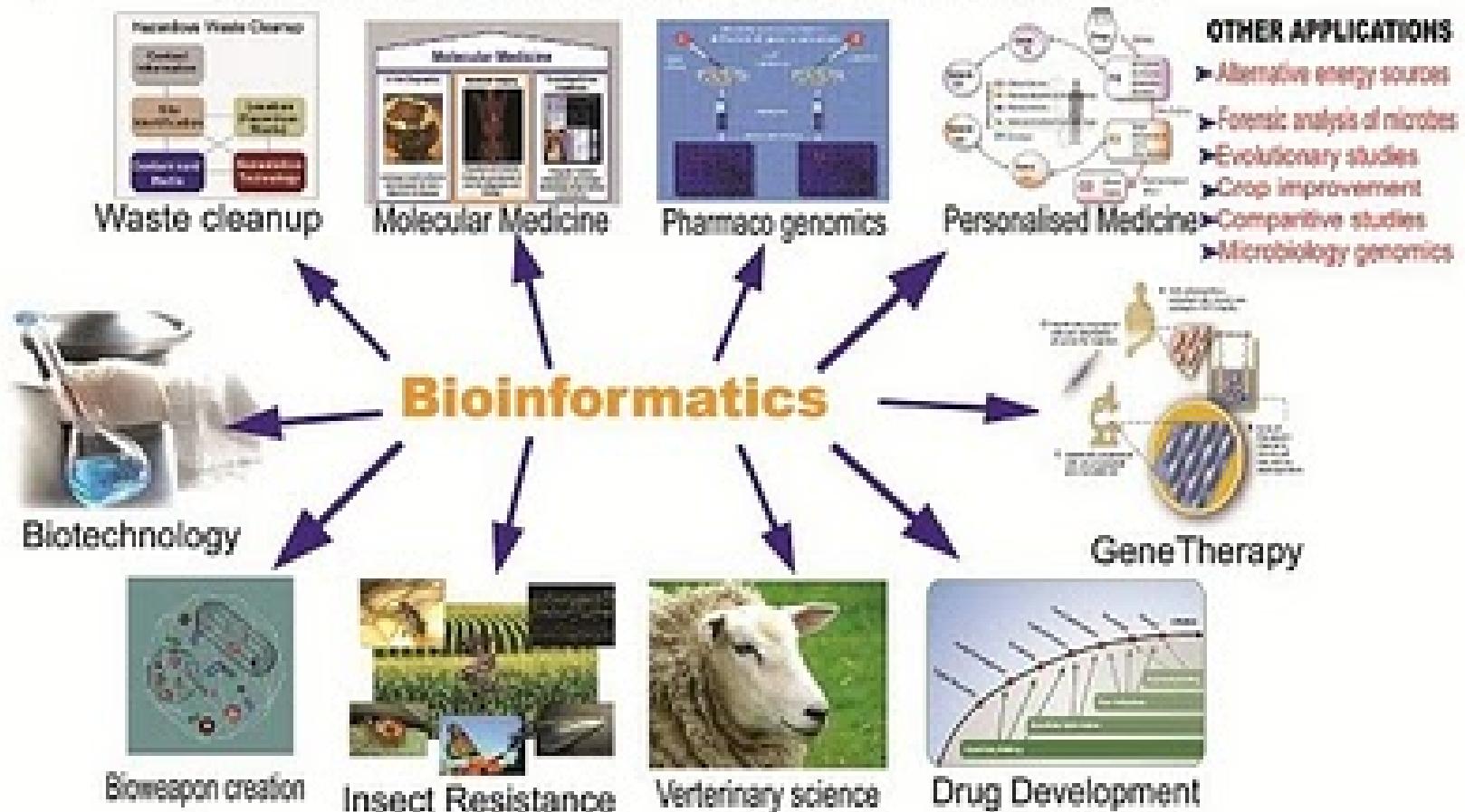


Bioinformática



Bioinformática

APPLICATIONS OF BIOINFORMATICS

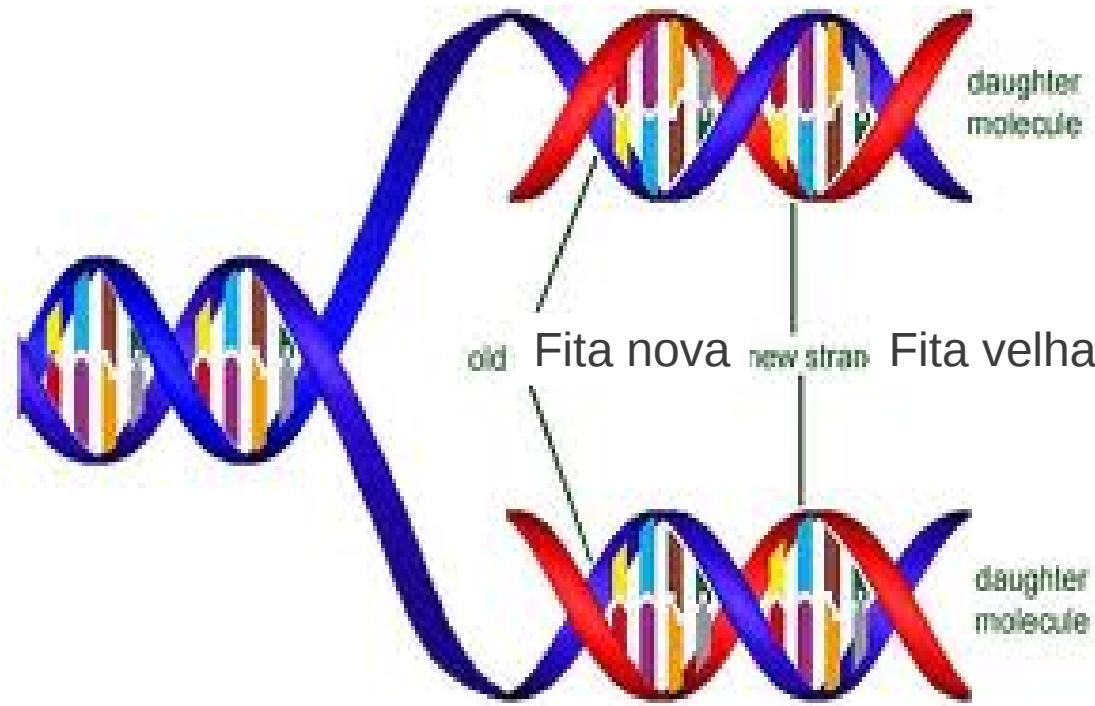


O que são *primers*?

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

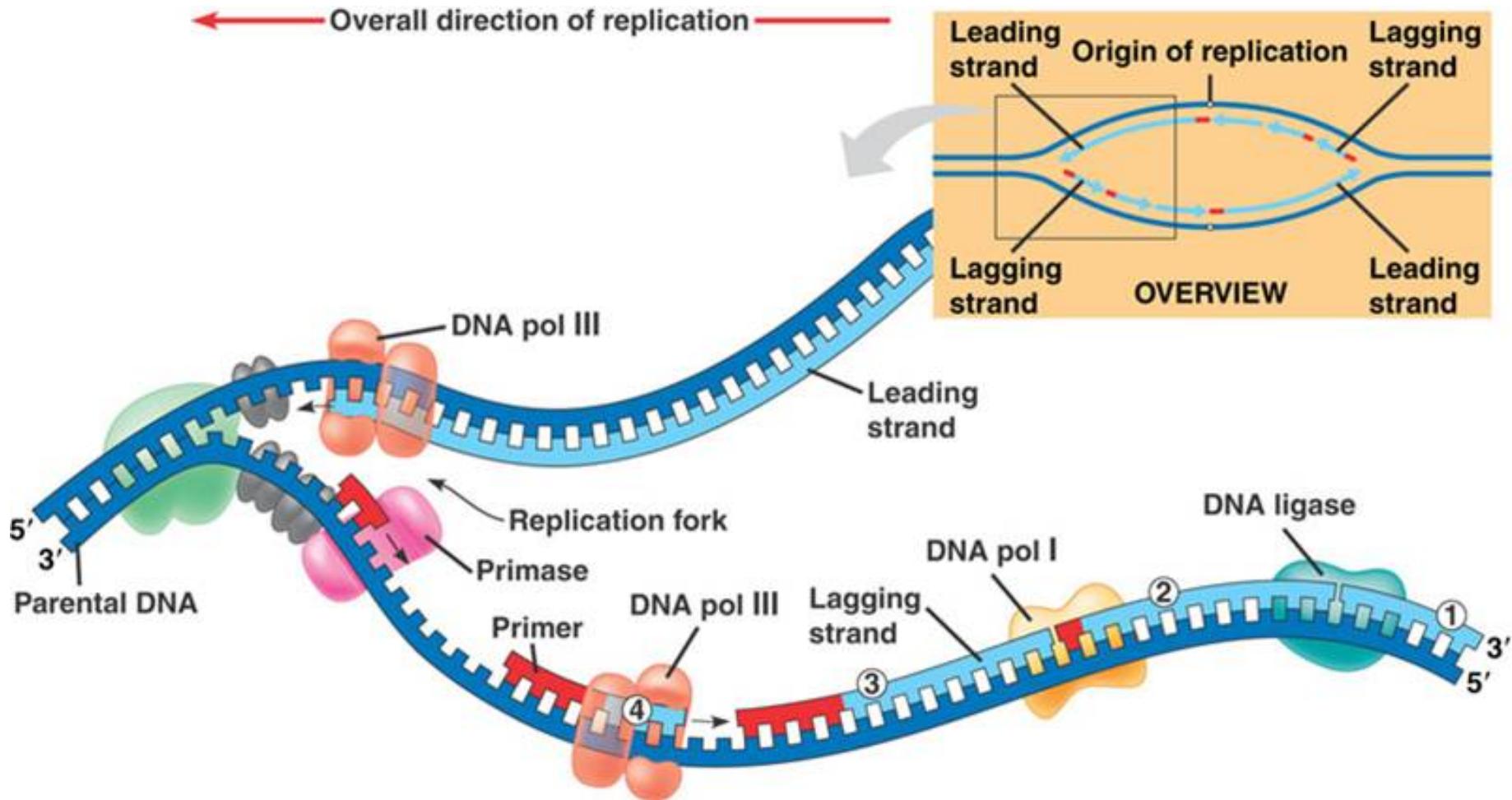
O que são *primers*?

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**

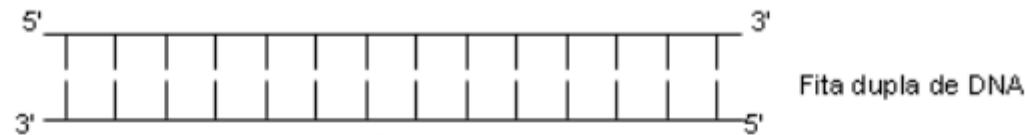


O que são *primers*?

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

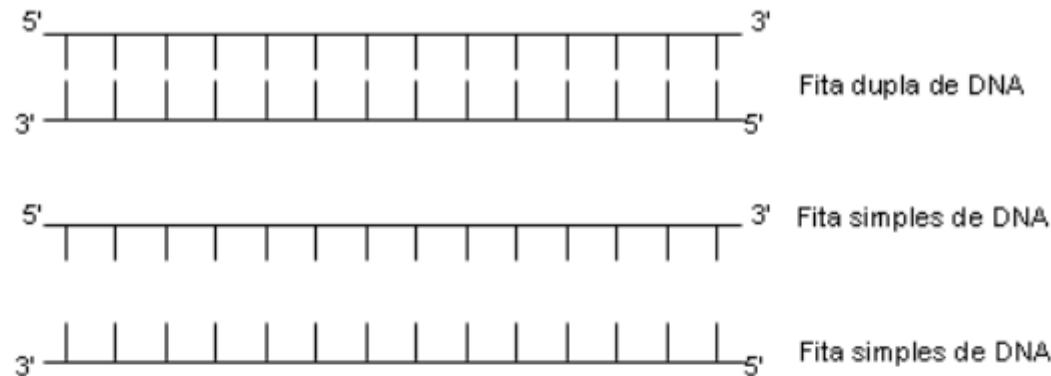
O que são *primers*?

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



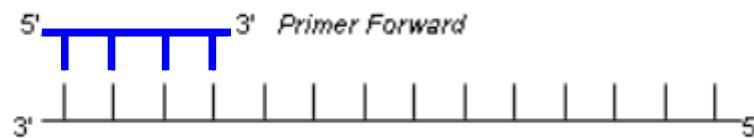
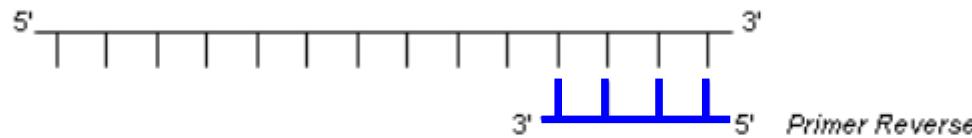
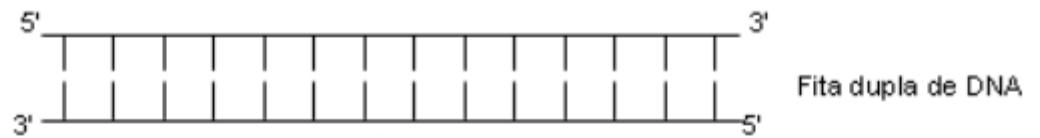
O que são *primers*?

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*?

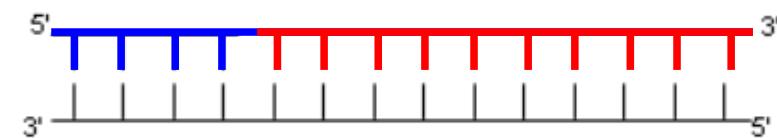
Cadeias **sintéticas** de nucleotídeos que atuam como iniciadores do processo de **replicação de DNA**



O que são *primers*?

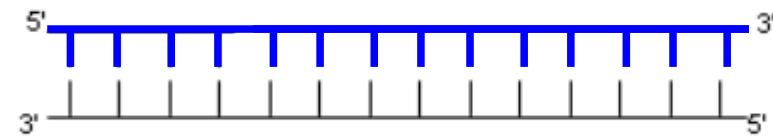
Cadeias **sintéticas** de nucleotídeos que atuam como iniciadores do processo de **replicação de DNA**

ATCCGCGTAGACTCGCACAGTAGCGCAT
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
TAGGCGCATCTGAGCGTGTCAATCGCGTA



O que são *primers*?

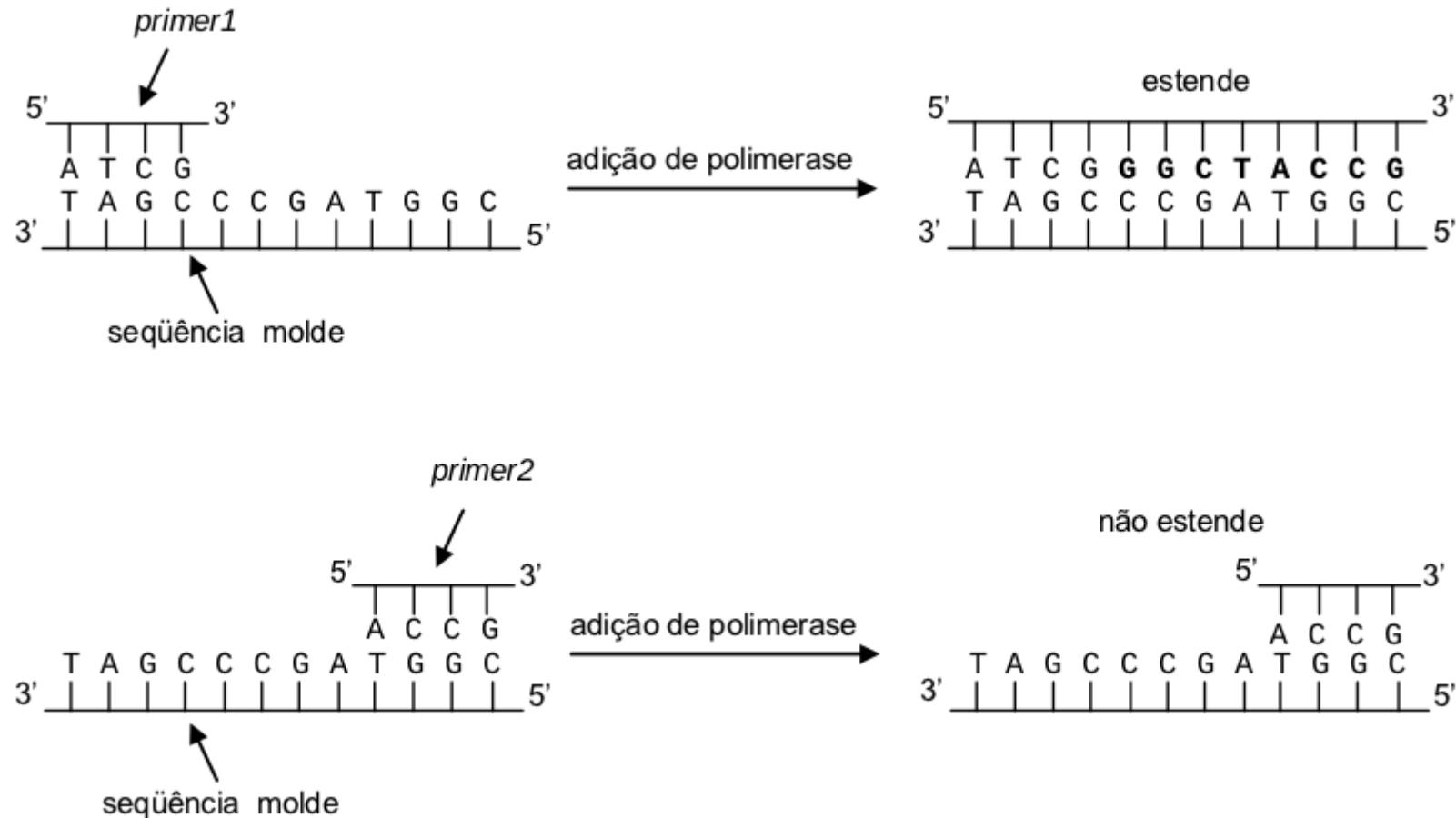
Cadeias **sintéticas** de nucleotídeos que atuam como iniciadores do processo de **replicação de DNA**



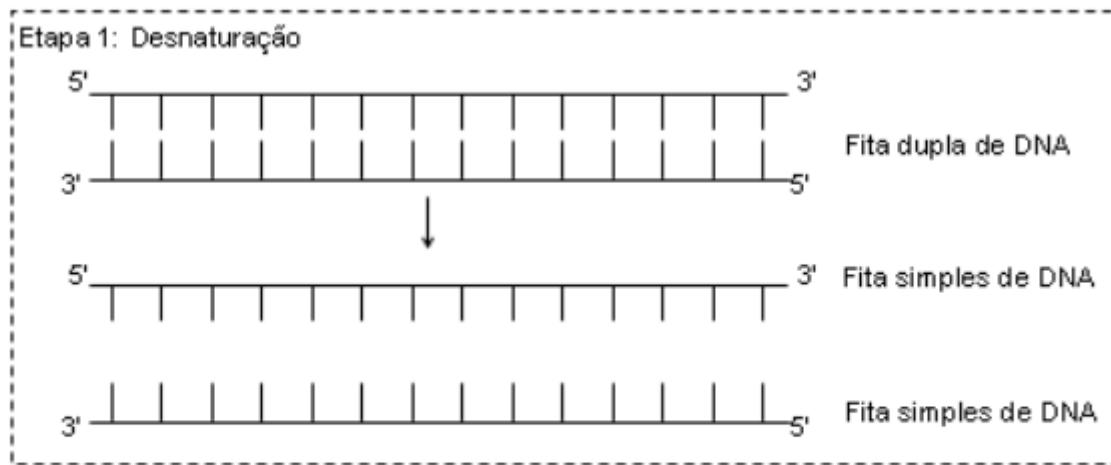
O que são *primers*?



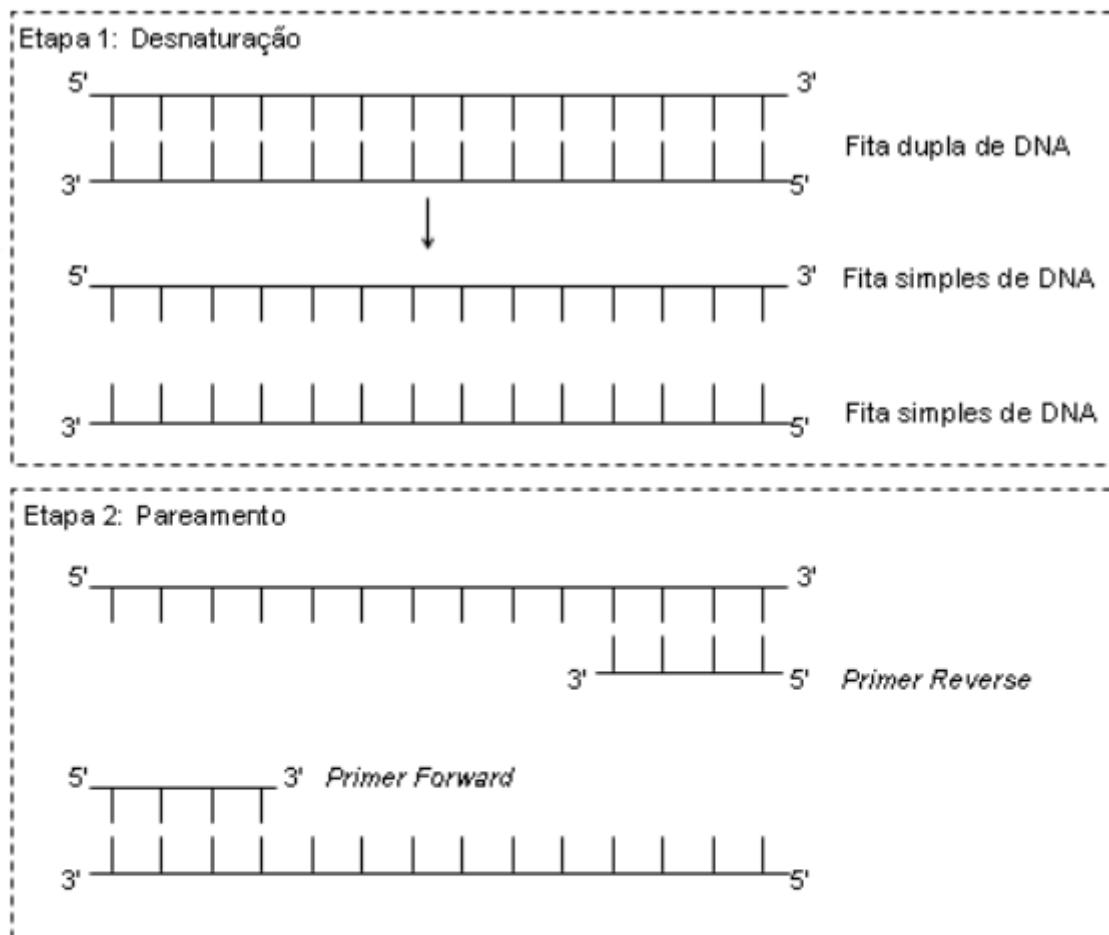
O que são *primers*?



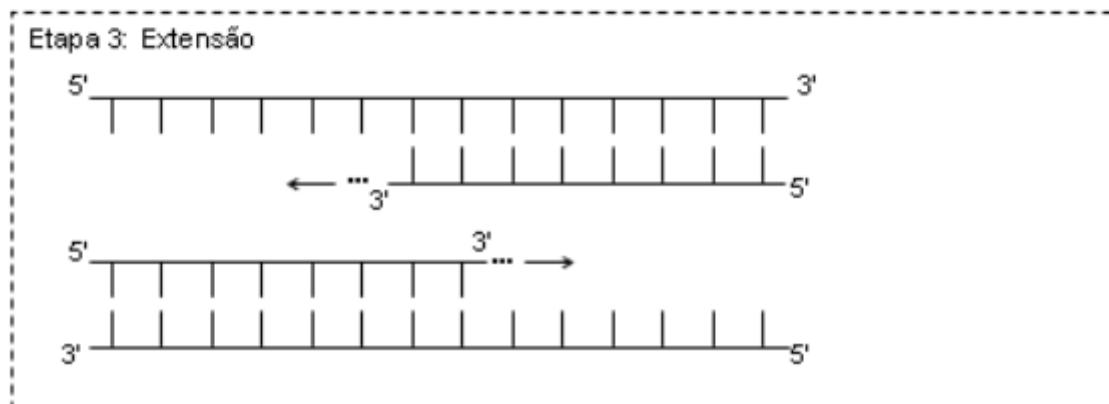
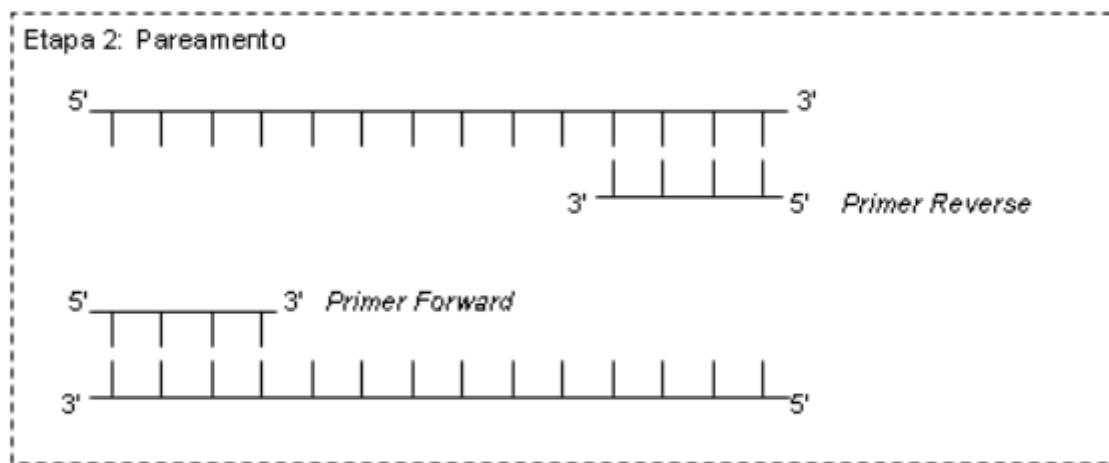
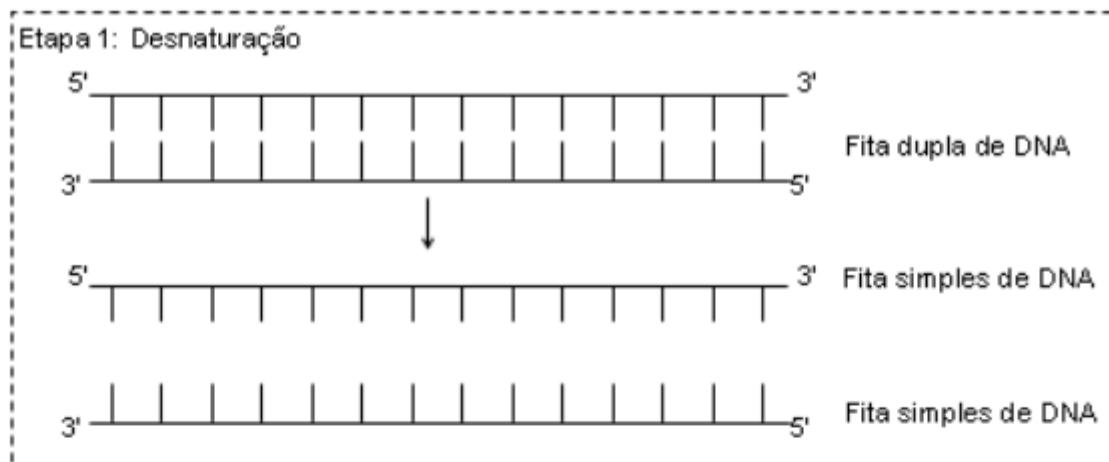
Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)



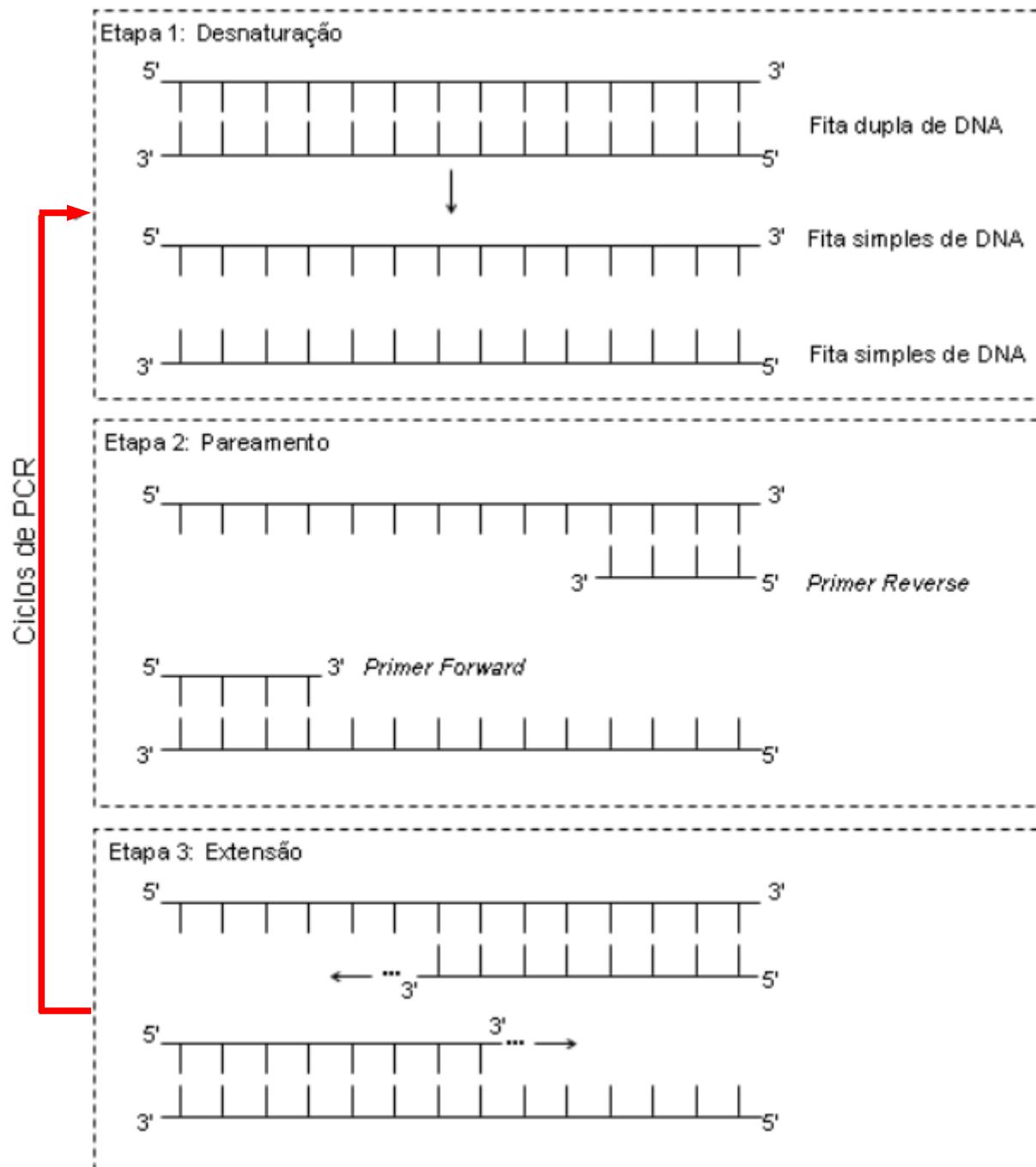
Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)



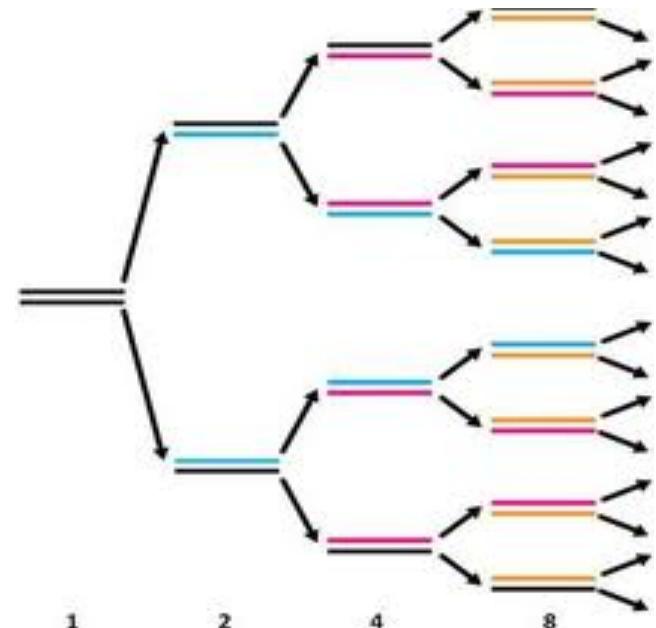
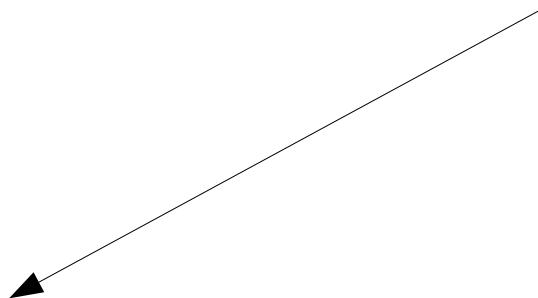
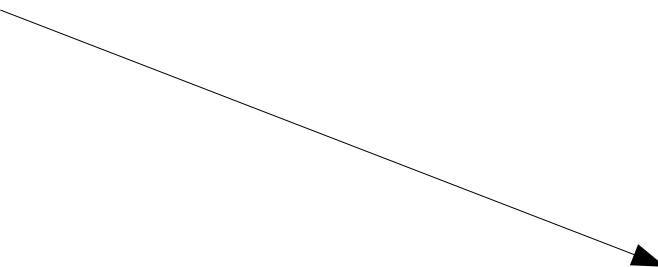
Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)



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

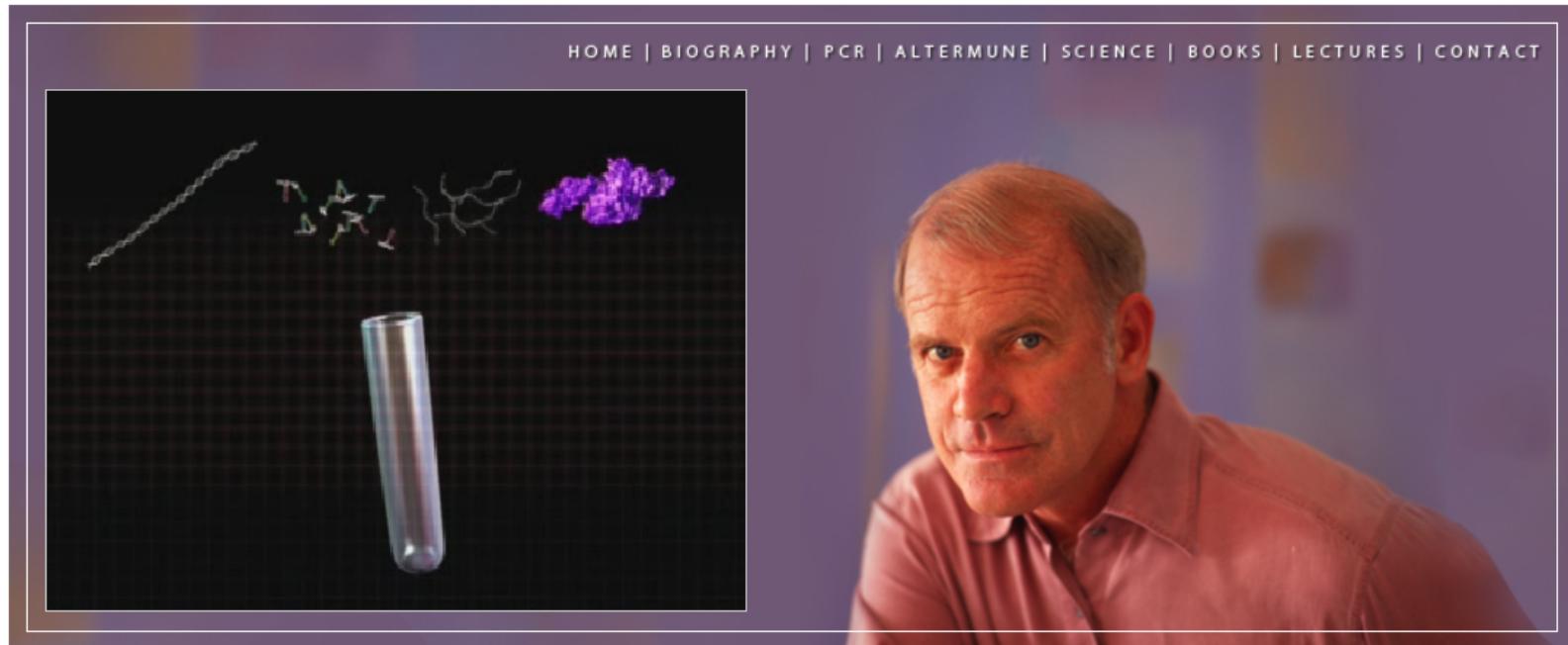
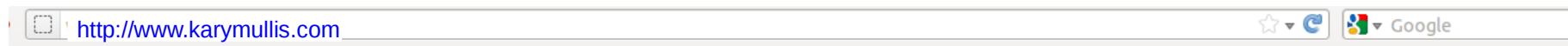
Exemplo de Programa de ciclagem

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

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)



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 Tm 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 *melting/annealing*:** entre 45 e 55 °C
- **Diferença entre as Tm 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 separeia 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 separeia 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*

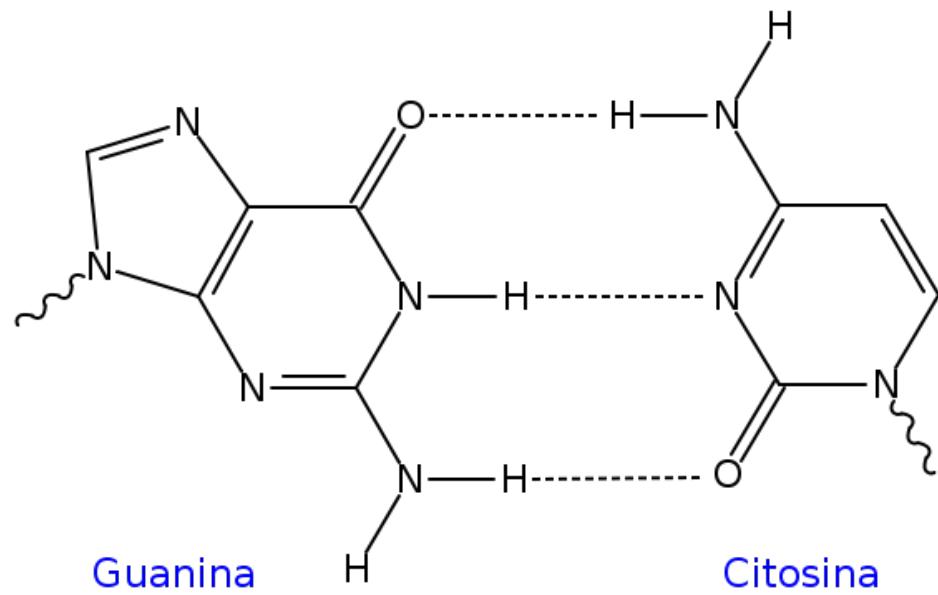
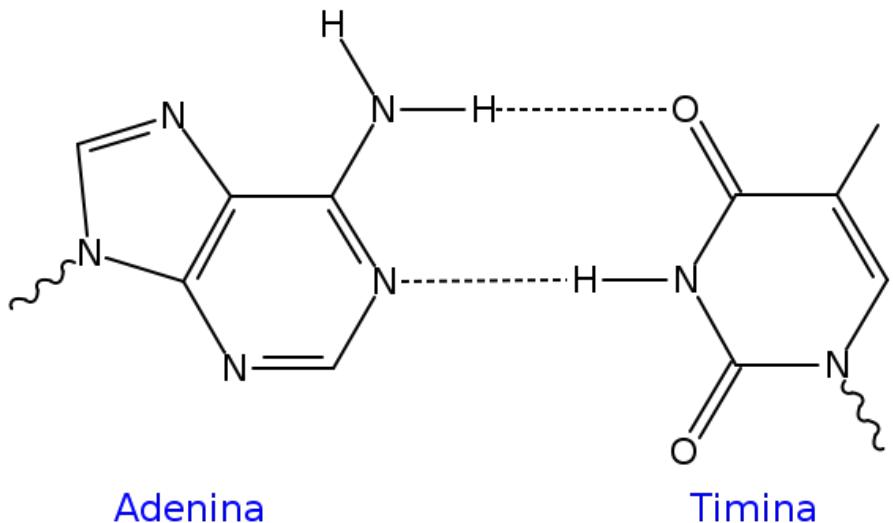
Ligaçāo C – G mais estável do que ligação A – T

Projeto de *Primers*

Base na extremidade 3'

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

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

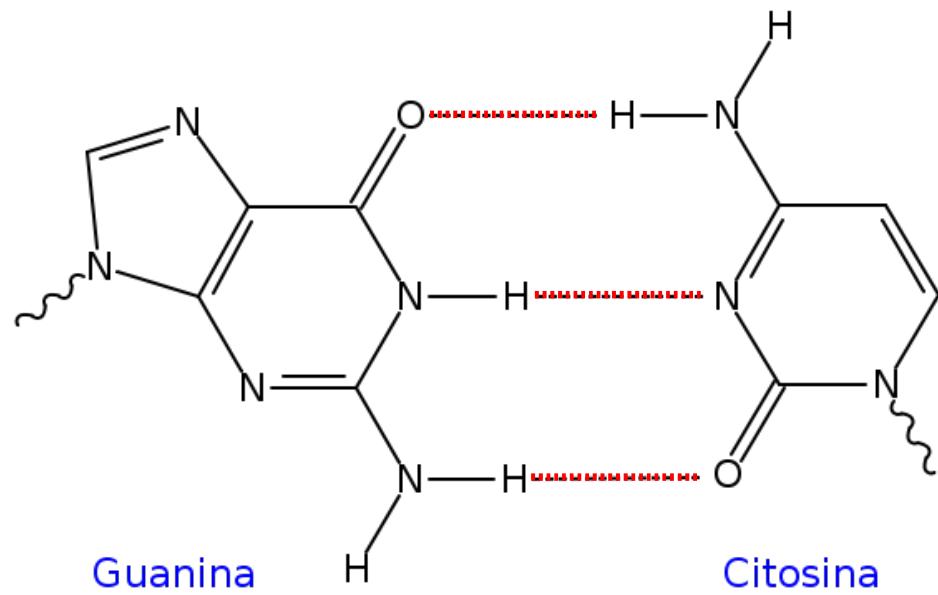
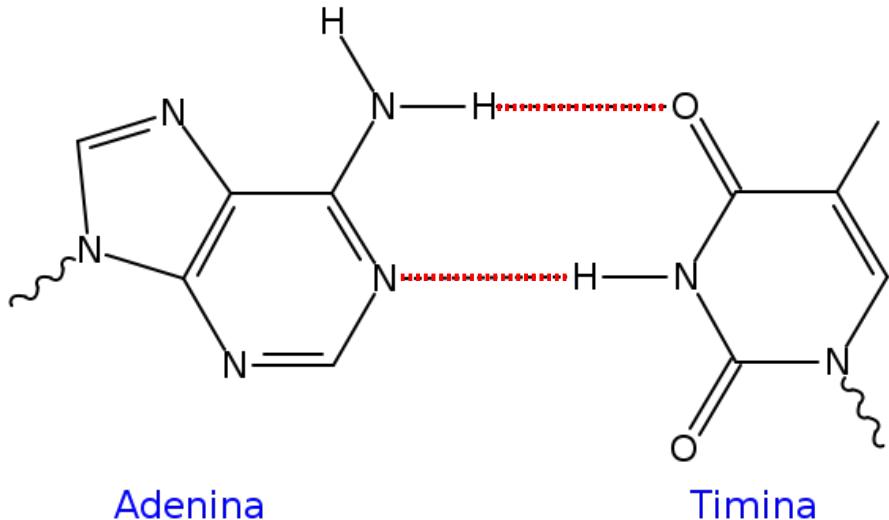


Projeto de *Primers*

Base na extremidade 3'

Extremidade pela qual a enzima polimerase inicia a extensão do primer

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



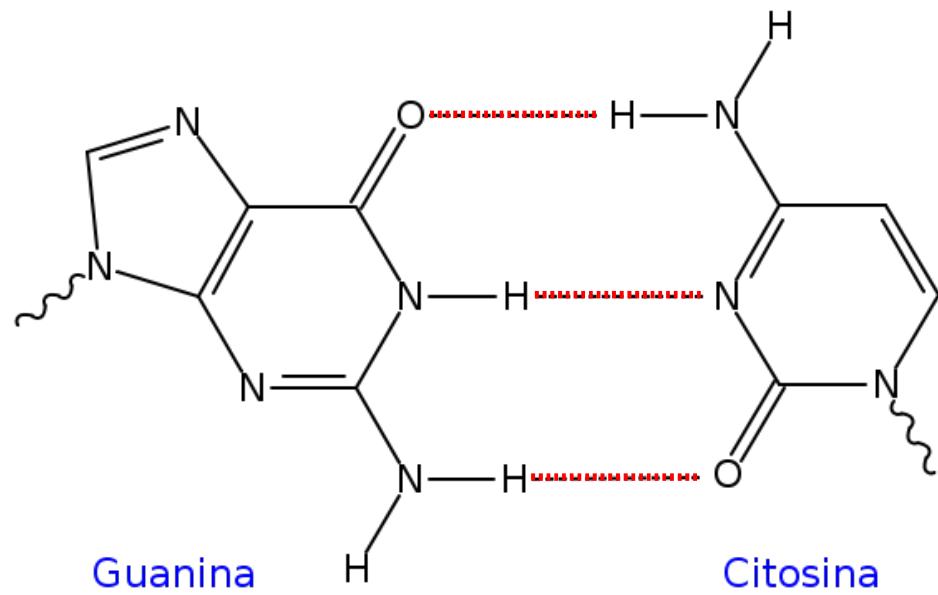
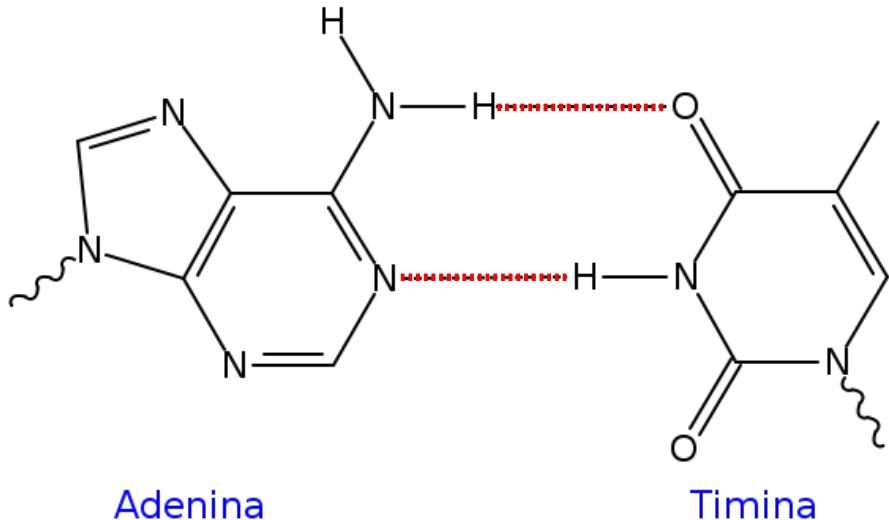
Projeto de *Primers*

Base na extremidade 3'

Extremidade pela qual a enzima polimerase inicia a extensão do primer

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

Ligaçāo 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*

Tm e Ta

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

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

Projeto de *Primers*

Tm e Ta

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

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

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

Ta deve ser de 3°C a 5°C abaixo da Tm

Cálculo da Temperatura de *Melting*

Aproximações para o cálculo da Tm

Cálculo da Temperatura de *Melting*

Aproximações para o cálculo da Tm

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

Cálculo da Temperatura de Melting

Aproximações para o cálculo da Tm

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

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

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

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

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

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

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

Cálculo da Temperatura de Melting

Aproximações para o cálculo da Tm

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

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

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

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

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

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

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

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
 - Detecção
 - Sequenciamento

Ferramentas para projeto de *primers*

- * Online e/ou standalone
- * comercial ou livre
- * específica
 - Amplificação
 - Clonagem
 - Detecção
 - 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 $i \neq j$