



UNIVERSITAS
GADJAH MADA

Teori Pembuatan Primer dan Pohon Filogenetik

Rini Widayanti

PENDAHULUAN



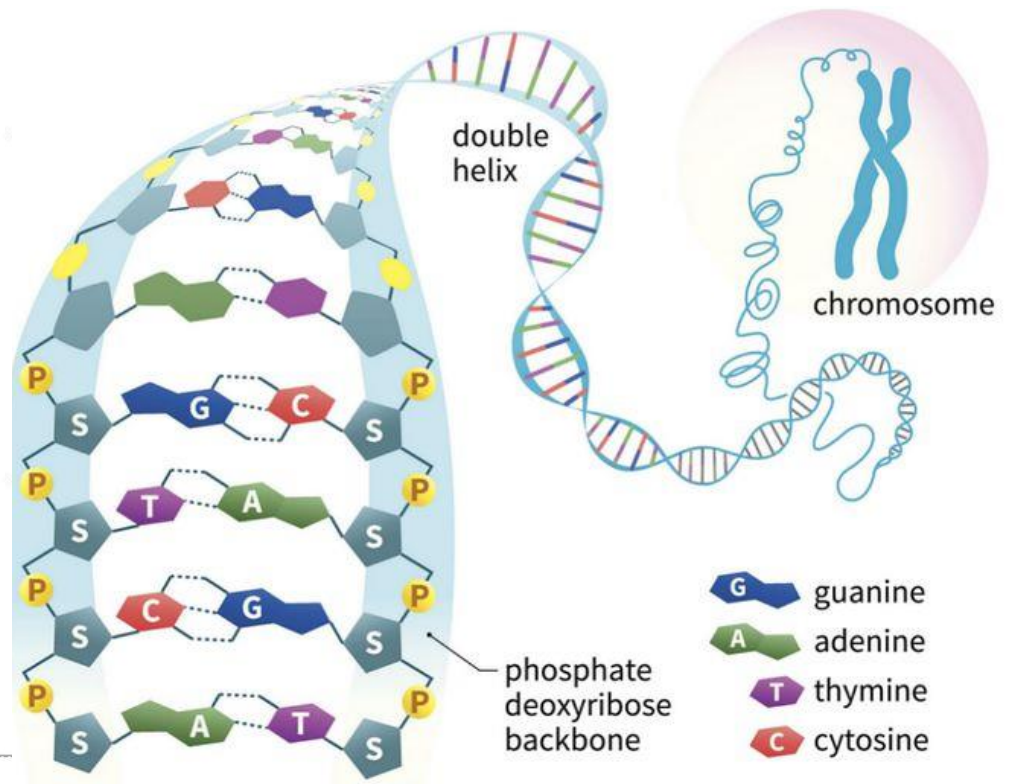
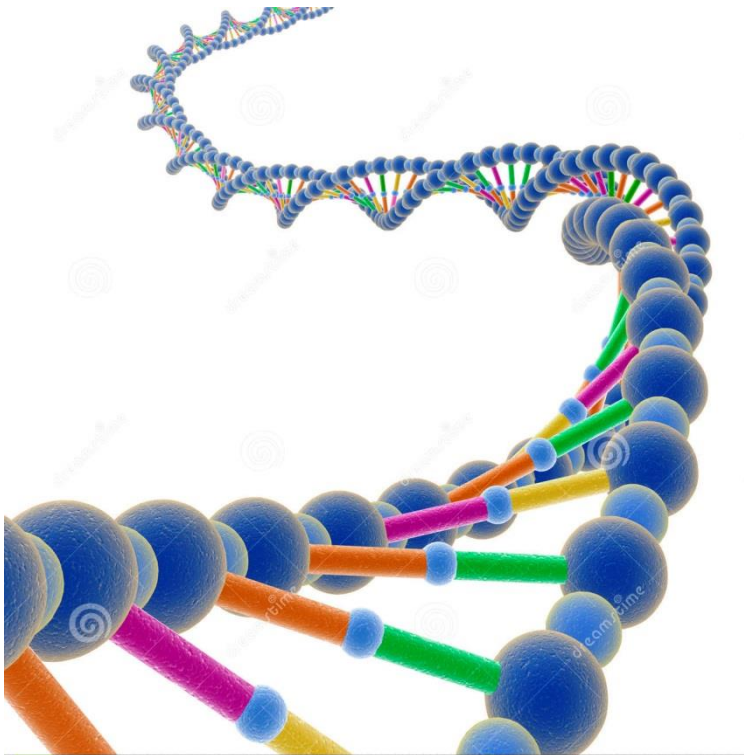
UNIVERSITAS GADJAH MADA

- DNA untai ganda, anti paralel
- Untai yang satu adalah komplemen unta
yang lainnya
- DNA terdiri dari nukleotida A,T,G,C
- $A \equiv T$; $C \equiv G$

DNA



UNIVERSITAS GADJAH MADA

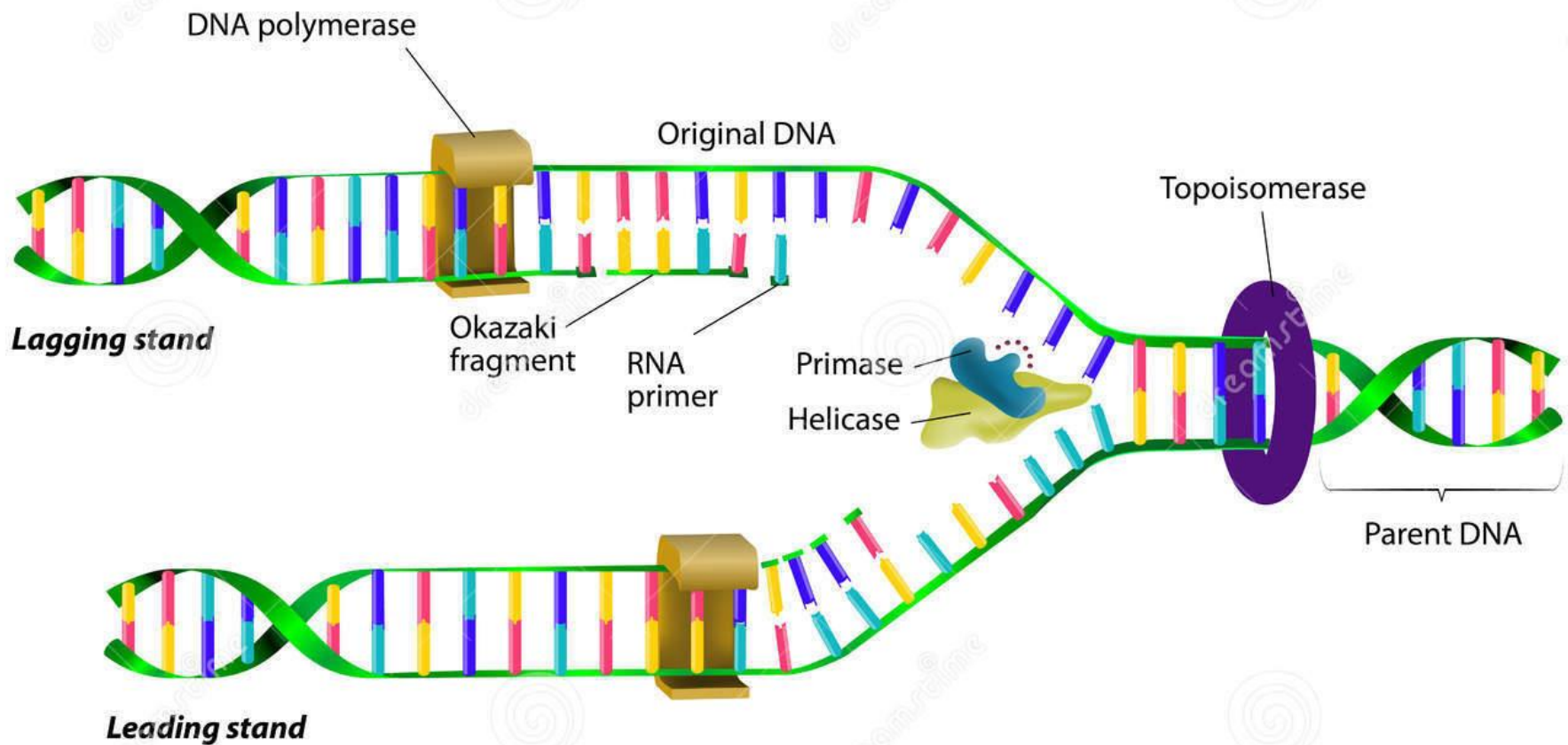


Download from
Dreamstime.com

6352334
Benjamin Abilach Galan | Dreamstime.com



DNA replication



Apa itu Primer?



- Primer merupakan sepotong DNA pendek untai tunggal (oligonukleotida), panjangnya antara 10 sampai sekitar 40 basa.
- Primer berfungsi sebagai **penginisiasi** reaksi polimerisasi DNA secara in vitro, karena tanpa primer, reaksi polimerisasi DNA tidak akan terjadi meskipun enzim dan komponen lainnya sudah tersedia.
- primer juga berfungsi untuk **membatasi** daerah mana yang akan diamplifikasi pada reaksi PCR.



idealnya primer memiliki urutan basa nukleotida yang **tepat berpasangan** dengan urutan basa DNA target yang akan diamplifikasi, dan **tidak menempel di bagian lainnya**



Parameter apa saja yang harus diperhatikan dalam mendesain primer?

- **1. Tentukan Tujuan**
- **2. Menyiapkan Sekuen Referensi**
- **3. Manual atau perlu bantuan software?**
- **4. Siap mendesain primer**
- **5. Menguji spesifisitas primer**



1. Tentukan Tujuan

- Untuk mengamplifikasi gen universal seperti gen 16S ribosomal RNA bakteri, 18S?
- Mendeteksi keberadaan suatu virus penyakit tertentu?
- Walking primer untuk analisa DNA sequencing fragment yang panjang?
- Atau untuk tujuan lainnya?



2. Menyiapkan Sekuen Referensi

- Misal targetnya adalah virus Rabies, maka harus mengumpulkan sekuen virus Rabies sebagai referensi.
- Usahakan agar pencarian lebih spesifik dengan cara menentukan gen targetnya.
- sekuen referensi dapat dicari dari database GenBank di situs NCBI.



Manual atau perlu bantuan software?

- Pada dasarnya mengambil sembarang daerah tertentu pada sekuen referensi dapat untuk dijadikan primer, tanpa perlu bantuan software khusus. Namun cara ini amat berisiko karena tidak dapat mengetahui bagaimana kualitas primer nantinya. Sebab ada beberapa parameter yang harus diperhatikan dalam mendesain primer.
- Ada beberapa software yang bisa membantu, ada yang *free* dan ada juga yang berbayar, ada yang *online* dan ada juga yang harus diinstall di komputer. Satu contoh Software yang *free* dan tersedia secara *online* yaitu **Primer3** atau **Primer3Plus** di situs <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>
- **Primer blast** yang ada di NCBI



Browser tabs: (37) WhatsApp, National Center for Biotechnolog

Address bar: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

NCBI Resources How To Sign in to NCBI

NCBI National Center for Biotechnology Information

Nucleotide dropdown menu: mitochondrial DNA Hemibagrus nemurus Search

COVID-19 Information

[Public health information \(CDC\)](#) | [Research information \(NIH\)](#) | [SARS-CoV-2 data \(NCBI\)](#) | [Prevention and treatment information \(HHS\)](#) | [Español](#)

UNITE
A new NIH initiative to end structural racism and achieve racial equity in the biomedical research enterprise.
[LEARN MORE](#)

NCBI Home
Resource List (A-Z)
All Resources
Chemicals & Bioassays
Data & Software
DNA & RNA
Domains & Structures
Genes & Expression
Genetics & Medicine

Welcome to NCBI
The National Center for Biotechnology Information advances science and health by providing access to biomedical and genomic information.
[About the NCBI](#) | [Mission](#) | [Organization](#) | [NCBI News & Blog](#)

Submit
Deposit data or manuscripts into NCBI databases

Download
Transfer NCBI data to your computer

Learn
Find help documents, attend a class or watch a tutorial

Popular Resources
[PubMed](#)
[Bookshelf](#)
[PubMed Central](#)
BLAST
[Nucleotide](#)
[Genome](#)
[SNP](#)
[Gene](#)

Windows taskbar: Type here to search, 29°C Berawan, 19:39 28/07/2021



38) WhatsApp x mitochondrial DNA Hemibagrus x +

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore

Apps Meeting is in progr...

Customize ...

Source databases
INSDC (GenBank) (24)
Customize ...

Sequence Type
Nucleotide (24)

Genetic compartments
Mitochondrion (23)

Sequence length
Custom range...

Release date
Custom range...

Revision date
Custom range...

[Clear all](#)

[Show additional filters](#)

Filters activated: genomic DNA/RNA. [Clear all](#)

☐ [Hemibagrus nemurus isolate 01 12S ribosomal RNA gene, partial sequence; tRNA-Val gene, complete sequence; and 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial](#)
2,040 bp linear DNA
Accession: HQ257344.1 GI: 345522528
[Taxonomy](#)
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#)

☐ [Hemibagrus nemurus isolate 01 cytochrome b \(cytb\) gene, partial cds; mitochondrial](#)
22. 1,102 bp linear DNA
Accession: HQ257286.1 GI: 345522421
[Protein](#) [Taxonomy](#)
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#)

☐ [Hemibagrus nemurus mitochondrion, complete genome](#)
23. 16,526 bp circular DNA
Accession: KM454860.1 GI: 700587582
[Protein](#) [PubMed](#) [Taxonomy](#)
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)

☐ [Hemibagrus nemurus isolate 01 recombination activating protein 1 \(rag1\) gene, partial cds](#)
24. 803 bp linear DNA
Accession: HQ257317.1 GI: 345522483
[Protein](#) [Taxonomy](#)
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#)

<< First < Prev Page 2 of 2 Next > Last >>

Find items

Search details

((("mitochondrial"[All Fields] AND "dna"[All Fields]) OR "mitochondrial dna"[All Fields]) AND ("Hemibagrus nemurus"[Organism] OR Hemibagrus nemurus[All Fields])) AND

Search See more...

Recent activity

[Turn Off](#) [Clear](#)

mitochondrial DNA Hemibagrus nemurus (0) Genome

mitochondrial DNA Hemibagrus nemurus AND (biomol_genomic[PROP]) (24) Nucleotide

Reproductive performance of beef cattle with ovarian hypofunction and repeat bre...

Hemibagrus nemurus mitochondrion, complete genome Nucleotide

Elephas antiquus mitochondrion, partial genome Nucleotide

See more...

Type here to search

29°C Berawan 19:44 28/07/2021



Hemibagrus nemurus mitochondrion, complete genome - Microsoft Word (Product Activation Failed)

File Home Insert Page Layout References Mailings Review View Acrobat

Clipboard Font Paragraph Styles

Hemibagrus nemurus mitochondrion, complete genome
GenBank: KJ573466.1
[FASTA Graphics](#)
[Go to:](#)

LOCUS KJ573466 16526 bp DNA circular VRT 03-JUN-2014

DEFINITION Hemibagrus nemurus mitochondrion, complete genome.

ACCESSION KJ573466

VERSION KJ573466.1

KEYWORDS ..

SOURCE mitochondrion Hemibagrus nemurus (Asian redtail catfish)

ORGANISM Hemibagrus nemurus
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Ostariophysi;
Siluriformes;

Page: 1 of 18 Words: 2,609 150% 8:49 PM 11/13/2017



Hemibagrus nemurus mitochondrion, complete genome - Microsoft Word (Product Activation Failed)

File Home Insert Page Layout References Mailings Review View Acrobat

Paste Cut Copy Format Painter Clipboard

Arial 10 Font

Paragraph

Styles

Find Replace Select Editing

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/kj573466.1?from=8778&to=9561&sat=4&sat_key=114206323
Ctrl+Click to follow link

A CDS

gene="cox3"
8778..9561
/gene="cox3"
/note="TAA stop codon is completed by the addition of 3'
residues to the mRNA"
/codon_start=1
/transl_except=(pos:9561,aa:TERM)
/transl_table=2
/product="cytochrome c oxidase subunit 3"
/protein_id="AIA61491.1"

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/kj573466.1?from=8778&to=9561&sat=4&sat_key=114206323

150%

8:52 PM
11/13/2017



Hemibagrus nemurus mi... x

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KJ573466.1?from=8778&to=9561&sat=4&sat_key=114206323

GenBank

Hemibagrus nemurus mitochondrion, complete genome

GenBank: KJ573466.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to: ▾

LOCUS KJ573466 784 bp DNA linear VRT 03-JUN-2014

DEFINITION Hemibagrus nemurus mitochondrion, complete genome.

ACCESSION [KJ573466](#) REGION: 8778..9561

VERSION KJ573466.1

KEYWORDS .

SOURCE mitochondrion Hemibagrus nemurus (Asian redbellied catfish)

ORGANISM [Hemibagrus nemurus](#)

REFERENCE 1 (bases 1 to 784)

AUTHORS Meganathan, P., Tan, M.H. and Austin, C.M.

TITLE Complete mitochondrial genome of Hemibagrus nemurus

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 784)

AUTHORS Meganathan, P., Tan, M.H. and Austin, C.M.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (12-MAR-2014) School of Science, Monash University Malaysia, Jalan Lagoon Selatan, Bandar Sunway, Selangor 46150, Malaysia

COMMENT ##Assembly-Data-START##

Assembly Method :: MITObim v. 1.6

Assembly Name :: Hnemurus_200bp_v1

Coverage :: 44.7

Sequencing Technology :: IonTorrent

##Assembly-Data-END##

FEATURES

source

Location/Qualifiers

1..784

/organism="Hemibagrus nemurus"

/organelle="mitochondrion"

Change region shown

☐ Whole sequence

☒ Selected region

from: 8778 to: 9561

Update View

Customize view ▾

Analyze this sequence

Run BLAST

Pick Primers

Find in this Sequence

Related information

Protein

Taxonomy

Gene

Recent activity

Turn Off Clear

Hemibagrus nemurus mitochondrion, complete genome Nucleotide

Escherichia coli stx2tA, stx2tB genes, strain T4/97 Nucleotide

Top-Down Proteomic Identification of Shiga Toxin 2 Subtypes from Shiga Toxin-Producing Bacteria

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KJ573466.1?report=fasta

Windows taskbar icons: Windows, File Explorer, Firefox, Opera, VLC, Adobe Reader, Excel, Word, PowerPoint, Internet Explorer, Google Chrome

8:54 PM 11/13/2017



Hemibagrus nemurus mi... x

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KJ573466.1?report=fasta&sat=4&satkey=114206323&from=8778&to=9561

NCBI Resources How To 1963r My NCBI Sign Out

Nucleotide Nucleotide Search Advanced Help

FASTA

Hemibagrus nemurus mitochondrion, complete genome

GenBank: KJ573466.1

[GenBank](#) [Graphics](#)

>KJ573466.1:8778-9561 Hemibagrus nemurus mitochondrion, complete genome
ATGGCCCCACCAAGCACATGCATATCATATGGTCGACCCCTAGCCCATGGCCCCCTTACCGGTGCAGTAGCTG
CTCTTCTAATAACATCAGGTTTAGCAATCTGATTCCACTTCCACTCTACAACATTAATAACCTTAGGATT
AATCCTGCTTCTACTCACAATACTCCAATGATGACGGGACATTATCCGAGAGGGAACCTTCCAAGGACAT
CATACGCCCCCTGTACAAAAGGTCTACGATATGGTATAATCTTATTATTACCTCAGAAATATTCTCT
TCTTAGGATTCTTTGAGCCTTTTACCCTCTAGCCTTGCCCCAACCCAGAACTTGAGGATGTTGACC
ACCAACAGGTATTACAACACTTGACCCATTGCAAGTGCCCTCTACTTAACACCGCGCTCTCTAGCATCT
GGGTAAACAGTAACCTGAGCTCACCACAGCCTGATAGAAGGAGCCGAAAAACAAGCAATTCAATCACTAG
CTCTTACAATCCTCCTAGGCTATATTTCACTGCCCTGCAAGCCATAGAATATTATGAAGCCCCCTTTCAC
CATTGCAGACGGTGTGACGGCTCTACCTTCTTCGTAGCGACAGGTTTCCACGGACTCCATGTTATTATT
GGCTCATCTTTCCTTGCTGTCTGTTTCTTCCGACAAGTCCGATATCATTTTACATCAGAACATCACTTG
GGTTTGAAGCAGCTGCCGTGATATTGACATTTCGTAGATGTGTATGATTATTCCTATATGCTCTATTTA
CTGATGAGGCTCAT

Send to: Change region shown

☐ Whole sequence
☒ Selected region
from: 8778 to: 9561
Update View

Customize view

Analyze this sequence

Run BLAST

Pick Primers

Find in this Sequence

Related information

Protein

Taxonomy

Gene

Recent activity

Turn Off Clear

Hemibagrus nemurus mitochondrion,



Primer3

(v. 0.4.0) Pick primers from a DNA sequence.

[Checks for mispriming in template.](#)

[disclaimer](#)

[Primer3 Home](#)

[Primer3plus interface](#)

[cautions](#)

[FAQ/WIKI](#)

There is a newer version of Primer3 available at <http://primer3.ut.ee>

Paste source sequence below (5'→3', string of ACGTNacgtn -- other letters treated as N -- numbers and blanks ignored). FASTA format ok. Please N-out undesirable sequence (vector, ALUs, LINEs, etc.) or use a [Mispriming Library \(repeat library\)](#):

☒ Pick left primer, or use left primer below:	☐ Pick hybridization probe (internal oligo), or use oligo below:	☒ Pick right primer, or use right primer below (5' to 3' on opposite strand):

[Sequence Id:](#) A string to identify your output.

[Targets:](#) E.g. 50,2 requires primers to surround the 2 bases at positions 50 and 51. Or mark the [source sequence](#) with [and]: e.g. ...ATCT[CCCC]TCAT.. means that primers must flank the central CCCC.

[Excluded Regions:](#) E.g. 401,7 68,3 forbids selection of primers in the 7 bases starting at 401 and the 3 bases at 68. Or mark the [source sequence](#) with < and >: e.g. ...ATCT<CCCC>TCAT.. forbids primers in the central CCCC.

[Product Size Ranges](#)

[Number To Return](#) [Max 3' Stability](#)

[Max Repeat Mispriming](#) [Pair Max Repeat Mispriming](#)

[Max Template Mispriming](#) [Pair Max Template Mispriming](#)



SINTA - Science and Tech X dna - Google Search X Nucleic Acids - Types, Str X DNA 1 stock illustration. In X New Tab X Primer3 Input (version 0.4.0) X

bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/

Primer3 (v. 0.4.0) Pick primers from a DNA sequence.

Checks for mispriming in template.	disclaimer	Primer3 Home
Primer3plus interface	cautions	FAQ/WIKI

There is a newer version of Primer3 available at <http://primer3.ut.ee>

Paste source sequence below (5'→3', string of ACGTNacgtn -- other letters treated as N -- numbers and blanks ignored). FASTA format ok. Please N-out undesirable sequence (vector, ALUs, LINEs, etc.) or use a [Mispriming Library \(repeat library\)](#):

```
ACCAACAGGTATTACACACTTGACCCATTGCAAGTGCCTCTACTTAACACCCGCCCTCCTAGCATCT
GGTGTAAACAGTAACCTGAGCTCACCACAGCCTGATAGAAGGAGCCCGAAAACAGCAATTCAATCACTAG
CTCTTACAAATCCTCCTAGGCTATATTTCACTGCCCCTGCAAGCCATAGAAATATTATGAAGCCCCCTTTCAC
CATTCAGACGGTGTGACGGCTCACCCTTCCTAGCGACAGGTTTCCACGGACTCCATGTTATTATT
GGCTCACTTTCTTGTGCTGTCTTCTCCGACAGTCCGATATCAITTTACATCAGAACATCACTTTG
GGTTTGAAGCAGCTGCCGATAATGACATTTCTAGATGTTGATGATTATTCCTATATGCTCTATTTA
CTGATGAGGCTCAT
```

☒ Pick left primer, or use left primer below:
☐ Pick hybridization probe (internal oligo), or use oligo below:
☒ Pick right primer, or use right primer below (5' to 3' on opposite strand):

[Sequence Id:](#) A string to identify your output.

[Targets:](#) E.g. 50,2 requires primers to surround the 2 bases at positions 50 and 51. Or mark the [source sequence](#) with [and]: e.g. ...ATCT[CCCC]TCAT.. means that primers must flank the central CCCC.

[Excluded Regions:](#) E.g. 401,7 68,3 forbids selection of primers in the 7 bases starting at 401 and the 3 bases at 68. Or mark the [source sequence](#) with < and >: e.g. ...ATCT<CCCC>TCAT.. forbids primers in the central CCCC.

[Product Size Ranges](#)

[Number To Return](#) [Max 3' Stability](#)

[Max Repeat Mispriming](#) [Pair Max Repeat Mispriming](#)

[Max Template Mispriming](#) [Pair Max Template Mispriming](#)



```
CAATTGCAGACGGTGTGTACGGCTCTACCTTCTTCGTAGCGACAGGTTTCCACGGACTCCATGTTATTATT  
GGCTCACTTCTTCCCTTGTCTGTCTTCTTCCGACAAGTCCGATATCAITTTACATCAGAACATCACTTIG  
GGTTTGAAGCAGCTGCCGTGATATTGACATTTCGTAGATGTTGTATGATTATTCCTATATGTCCTATTTA  
CTGATGAGGCTCAT
```

☒ Pick left primer, or use left primer below:	☐ Pick hybridization probe (internal oligo), or use oligo below:	☒ Pick right primer, or use right primer below (5' to 3' on opposite strand):

Pick Primers Reset Form

Sequence Id: A string to identify your output.

Targets: E.g. 50,2 requires primers to surround the 2 bases at positions 50 and 51. Or mark the [source sequence](#) with [and]: e.g. ...ATCT[CCCC]TCAT.. means that primers must flank the central CCCC.

Excluded Regions: E.g. 401,7 68,3 forbids selection of primers in the 7 bases starting at 401 and the 3 bases at 68. Or mark the [source sequence](#) with < and >: e.g. ...ATCT<CCCC>TCAT.. forbids primers in the central CCCC.

Product Size Ranges

Number To Return **Max 3' Stability**

Max Repeat Mispriming **Pair Max Repeat Mispriming**

Max Template Mispriming **Pair Max Template Mispriming**

Pick Primers Reset Form

General Primer Picking Conditions

Primer Size Min: Opt: Max:

Primer Tm Min: Opt: Max: **Max Tm Difference:** [Table of thermodynamic parameters:](#)

Product Tm Min: Opt: Max:

Primer GC% Min: Opt: Max:

Max Self Complementarity: **Max 3' Self Complementarity:**



SINTA - Science and Tech X dna - Google Search X Nucleic Acids - Types, Str X DNA 1 stock illustration. In X New Tab X Primer3 Input (version 0.4.0) X

bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/

Pick Primers Reset Form

General Primer Picking Conditions

Primer Size	Min: 18	Opt: 20	Max: 27	
Primer Tm	Min: 57.0	Opt: 60.0	Max: 63.0	Max Tm Difference: 100.0 Table of thermodynamic parameters: Breslauer et al. 1986
Product Tm	Min:	Opt:	Max:	
Primer GC%	Min: 20.0	Opt: 50	Max: 80.0	
Max Self Complementarity:	8.00	Max 3' Self Complementarity:	3.00	
Max #N's:	0	Max Poly-X:	5	
Inside Target Penalty:		Outside Target Penalty:	0	Note: you can set Inside Target Penalty to allow primers inside a target.
First Base Index:	1	CG Clamp:	0	
Concentration of monovalent cations:	50.0	Salt correction formula:	Schildkraut and Lifson 1965	
Concentration of divalent cations	0.0	Concentration of dNTPs	0.0	
Annealing Oligo Concentration:	50.0	(Not the concentration of oligos in the reaction mix but of those annealing to template.)		
☒ Liberal Base ☐ Show Debugging Info ☒ Do not treat ambiguity codes in libraries as consensus ☐ Lowercase masking				

Pick Primers Reset Form

Other Per-Sequence Inputs

[Included Region:](#) E.g. 20,400: only pick primers in the 400 base region starting at position 20. Or use { and } in the [source sequence](#) to mark the beginning and end of the included region: e.g. in ATC{TTC...TCT}AT the included region is TTC...TCT.

[Start Codon](#)
[Position:](#)

Sequence Quality

Windows taskbar showing various application icons (File Explorer, Firefox, Opera, 371, PDF, Excel, Word, PowerPoint, etc.) and system tray icons (network, volume, etc.) with the time 9:03 PM and date 11/13/2017.



Langkah desain primer

- Pada kotak yang tersedia, masukkan sekuen referensi, dapat juga mengunggah (*upload*) sekuen dari file di komputer.
- Pilih jenis primer yang ingin didesain, sense primer (*left primer*), antisense (*right primer*) dan probe untuk hibridisasi (*internal oligo*). Kotak yang ada di bawahnya bisa diisi jika sudah memiliki kandidat primer.
- Tentukan beberapa parameter lain jika diperlukan seperti *excluded region* (daerah dimana primer tidak boleh menempel di situ), *targets* (primer harus mengapit daerah tersebut) dan *included region* (kedua primer harus berada di dalam daerah ini).



- Beberapa opsi yang lebih mendalam bisa ditambahkan pula pada tab *General Settings*, *Advance Settings*, *Internal Oligo*, *Penalty Weights* dan *Sequence Quality*.
- Jika semua opsi sudah terisi, tekan tombol **PICK PRIMERS** untuk memulai pencarian primer yang terbaik.
- Hasil pencarian akan muncul pada slide selanjutnya. Di sana tertera beberapa hal mengenai primer yang didisain, yaitu:



- Primer3 akan memberikan beberapa alternatif pasangan primer yang dapat dipilih. Pada gambar di atas terlihat pasangan primer pertama.
- Nama *Left Primer* dan *Right Primer*
- Sekuen kedua primer
- Posisi primer pada sekuen referensi, panjang primer, Titik Leleh (T_m), % GC dan beberapa parameter terkait struktur sekunder yang mungkin terjadi.
- Ukuran produk PCR



5. Menguji spesifisitas primer

- Primer yang baru saja didesain harus diuji spesifisitasnya agar yakin bahwa primer tersebut akan mengamplifikasi target yang diinginkan. Pengujian spesifisitas dapat dilakukan dengan bantuan BLAST di NCBI.
- Dapat juga untuk menguji primer yg tidak didesain sendiri, misal dari jurnal.



Primer yang telah didesain tersebut harus diuji spesifisitasnya agar yakin bahwa:

- Primer tersebut hanya akan mengamplifikasi daerah yang diinginkan
- Tidak menempel pada daerah lain di genom organisme target (dalam contoh ini misalnya memiliki materi genetik berupa **RNA**)
- Tidak menempel pada DNA organisme lain yang mungkin tercampur bersama DNA target ketika isolasi DNA. Misalnya DNA host-nya Rabies yaitu anjing.
- Pengujian spesifisitas dapat dilakukan dengan bantuan BLAST di NCBI. Jenis BLAST yang digunakan adalah **blastn** (*nucleotide blast*). Berikut ini adalah langkah-langkah-nya:



BLAST®

Home Recent Results Saved Strategies Help

Basic Local Alignment Search Tool

BLAST finds regions of similarity between biological sequences. The program compares nucleotide or protein sequences to sequence databases and calculates the statistical significance.

[Learn more](#)

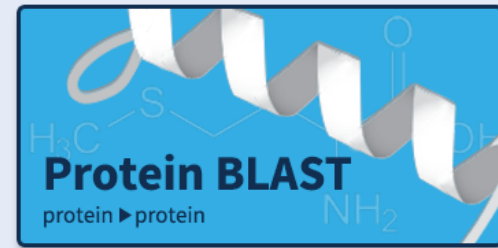
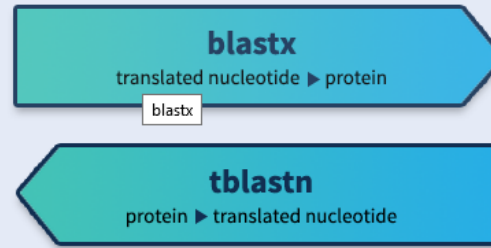
NEW

BLAST+ 2.7.1 released

A new version (2.7.1) of the BLAST+ executables is now available.
Mon, 23 Oct 2017 08:00:00 EST

[More BLAST news...](#)

Web BLAST



BLAST Genomes

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastx&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome



SINTA - Science and X dna - Google Search X Nucleic Acids - Type X DNA 1 stock illustrati X New Tab X Primer3 Output (primer3 X Nucleotide BLAST: S X + - X

bioinfo.ut.ee/cgi-bin/primer3-0.4.0/primer3_results.cgi

721 TATTGACATTTCTAGTAGTTGTGTAIGATTATTCCTATATGTCTCTATTTACTGATGAGGC

781 TCAT

KEYS (in order of precedence):
>>>>> left primer
<<<<< right primer

ADDITIONAL OLIGOS

	start	len	tm	gc%	any	3'	seq
1 LEFT PRIMER	93	20	56.76	45.00	7.00	1.00	AGCAATCTGATTCCACTTCC
RIGHT PRIMER	702	20	56.49	45.00	3.00	0.00	CCCAAAGTGATGTTCT
PRODUCT SIZE: 610, PAIR ANY COMPL: 5.00, PAIR 3' COMPL: 1.00							
2 LEFT PRIMER	58	20	57.44	55.00	6.00	3.00	GGTGCAGTAGCTGCT
RIGHT PRIMER	702	20	56.49	45.00	3.00	0.00	CCCAAAGTGATGTTCT
PRODUCT SIZE: 645, PAIR ANY COMPL: 3.00, PAIR 3' COMPL: 1.00							
3 LEFT PRIMER	58	20	57.44	55.00	6.00	3.00	GGTGCAGTAGCTGCT
RIGHT PRIMER	661	20	57.51	50.00	2.00	0.00	GGAAGAAACAGACAGCAAGG
PRODUCT SIZE: 604, PAIR ANY COMPL: 5.00, PAIR 3' COMPL: 3.00							
4 LEFT PRIMER	58	20	57.44	55.00	6.00	3.00	GGTGCAGTAGCTGCTCTTCT
RIGHT PRIMER	667	20	56.43	45.00	4.00	2.00	CTTGTTCGGAAGAAACAGACA
PRODUCT SIZE: 610, PAIR ANY COMPL: 5.00, PAIR 3' COMPL: 3.00							

Statistics

	con	too	in	in	no	tm	tm	high	high		high
	sid	many	tar	excl	bad	GC	too	too	any	3'	poly
	ered	Ns	get	reg	GC%	clamp	low	high	compl	compl	X
Left	1689	0	0	0	0	0	479	508	15	14	0
Right	1663	0	0	0	0	0	547	420	0	1	0

Pair Stats:
considered 874, unacceptable product size 857, high end compl 3, ok 14
primer3 release 1.1.4

(primer3_results.cgi release 0.4.0)

Copy
Select All
Search Google for "AGCAATCTGATTCCA..."
View Selection Source
Inspect Element (Q)

Windows Taskbar: 9:16 PM 11/13/2017



BLAST® » blastn suite

Home Recent Results Saved Strategies Help

Standard Nucleotide BLAST

blastn blastp blastx tblastn tblastx

BLASTN programs search nucleotide databases using a nucleotide query. [more...](#) [Reset page](#) [Bookmark](#)

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) [Clear](#) Query subrange [Query subrange](#)

AGCAATCTGATTCACITCQ

From To

Or, upload file [Browse...](#) No file selected.

Job Title

Enter a descriptive title for your BLAST search

☐ Align two or more sequences

Choose Search Set

Database ☐ Human genomic + transcript ☐ Mouse genomic + transcript ☒ Others (nr etc.):

Nucleotide collection (nr/nt)

Organism Optional

Enter organism name or id--completions will be suggested ☐ Exclude

Enter organism common name, binomial, or tax id. Only 20 top taxa will be shown

☐ Models (XM/XP) ☐ Uncultured/environmental sample sequences

☐ Sequences from type material

Limit to

Entrez Query Optional

Enter an Entrez query to limit search [YouTube](#) [Create custom database](#)



SINTA - Science and x dna - Google Search x Nucleic Acids - Type x DNA 1 stock illustrat x New Tab x Primer3 Output (primer3 x Nucleotide BLAST: S x + - x

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=Bl Search

Enter a descriptive title for your BLAST search

☐ Align two or more sequences

Choose Search Set

Database
☐ Human genomic + transcript ☐ Mouse genomic + transcript ☒ Others (nr etc.):
Nucleotide collection (nr/nt)

Organism
Optional
Enter organism name or id--completions will be suggested ☐ Exclude +
Enter organism common name, binomial, or tax id. Only 20 top taxa will be shown

Exclude
Optional
☐ Models (XM/XP) ☐ Uncultured/environmental sample sequences

Limit to
Optional
☐ Sequences from type material

Entrez Query
Optional
Enter an Entrez query to limit search [YouTube](#) [Create custom database](#)

Program Selection

Optimize for
☒ Highly similar sequences (megablast)
☐ More dissimilar sequences (discontiguous megablast)
☐ Somewhat similar sequences (blastn)
[Choose a BLAST algorithm](#)

BLAST Search database Nucleotide collection (nr/nt) using Megablast (Optimize for highly similar sequences)
☐ Show results in a new window

[+ Algorithm parameters](#)

BLAST is a registered trademark of the National Library of Medicine

Support center Mailing list [YouTube](#)

Windows taskbar: 9:20 PM 11/13/2017



SINTA - Science and X dna - Google Search X Nucleic Acids - Type X DNA 1 stock illustrati X New Tab X Primer3 Output (primer3 X BLAST: Basic Local A X

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

Human Mouse Rat Microbes

Standalone and API BLAST

- Download BLAST**
Get BLAST databases and executables
- Use BLAST API**
Call BLAST from your application
- Use BLAST in the cloud**
Start an instance at a cloud provider

Specialized searches

SmartBLAST Find proteins highly similar to your query	Primer-BLAST Design primers specific to your PCR template	Global Align Compare two sequences a Global alignment span (Needleman-Wurisch)	CD-search Find conserved domains in your sequence
GEO Find matches to gene expression profiles	IgBLAST Search immunoglobulins and T cell receptor sequences	VecScreen Search sequences for vector contamination	CDART Find sequences with similar conserved domain architecture

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&PROG_DEF=blastn&BLAST_PROG_DEF=blastn&BLAST_SPEC=GlobalAln&LINK_LOC=BlastHomeLink

Windows taskbar: 9:27 PM 11/13/2017



SINTA - Science and X dna - Google Search X Nucleic Acids - Type X DNA 1 stock illustrati X New Tab X Primer3 Output (primer3 X Primer designing too X

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=Blast

Primer-BLAST

A tool for finding specific primers

► **NCBI/ Primer-BLAST:** Finding primers specific to your PCR template (using Primer3 and BLAST).

[Reset page](#) [Save search parameters](#) [Retrieve recent results](#) [Publication](#) [Tips for finding specific primers](#)

PCR Template

Enter accession, gi, or FASTA sequence (A refseq record is preferred) [Clear](#)

Range

Forward primer From To [Clear](#)

Reverse primer

Or, upload FASTA file No file selected.

Primer Parameters

Use my own forward primer (5'→3' on plus strand) [Clear](#)

Use my own reverse primer (5'→3' on minus strand) [Clear](#)

PCR product size

Min Max

of primers to return

Primer melting temperatures (T_m)

Min Opt Max Max T_m difference [Clear](#)

Exon/intron selection

A refseq mRNA sequence as PCR template input is required for options in the section [Clear](#)

Exon junction span [Clear](#)

Exon junction match

Exon at 5' side Exon at 3' side

Minimal number of bases that must anneal to exons at the 5' or 3' side of the junction [Clear](#)

Intron inclusion

☐ Primer pair must be separated by at least one intron on the corresponding genomic DNA [Clear](#)

Windows Taskbar: 9:29 PM 11/13/2017



SINTA - Science and X dna - Google Search X Co Nucleic Acids - Type X DNA 1 stock illustrati X New Tab X Primer3 Output (primer3 X Primer designing too X

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=Blast

Exon junction match
Exon at 5' side: 7
Exon at 3' side: 4
Minimal number of bases that must anneal to exons at the 5' or 3' side of the junction

Intron inclusion
☐ Primer pair must be separated by at least one intron on the corresponding genomic DNA

Intron length range
Min: 1000
Max: 1000000

Primer Pair Specificity Checking Parameters

Specificity check
☒ Enable search for primer pairs specific to the intended PCR template

Search mode
Automatic

Database
Refseq mRNA

Exclusion
Refseq mRNA

Organism
Refseq representative genomes
Genomes for selected organisms (primary reference assembly only)
nr
Refseq RNA (refseq_rna)
Custom

Exclude uncultured/environmental sample sequences

Entrez query (optional)

Primer specificity stringency
Primer must have at least 2 total mismatches to unintended targets, including at least 2 mismatches within the last 5 bps at the 3' end.
Ignore targets that have 6 or more mismatches to the primer.

Max target size
4000

Allow splice variants
☐ Allow primer to amplify mRNA splice variants (requires refseq mRNA sequence as PCR template input)

Get Primers
☐ Show results in a new window ☒ Use new graphic view

Advanced parameters

Windows taskbar: 9:30 PM 11/13/2017



SINTA - Science and X dna - Google Search X Co Nucleic Acids - Type X DNA 1 stock illustrati X New Tab X Primer3 Output (primer3 X Primer designing too X

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=Blast

Exon junction match
Exon at 5' side: 7
Exon at 3' side: 4
Minimal number of bases that must anneal to exons at the 5' or 3' side of the junction
Intron inclusion: ☐ Primer pair must be separated by at least one intron on the corresponding genomic DNA
Intron length range: Min: 1000, Max: 1000000

Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow

Primer Pair Specificity Checking Parameters

Specificity check: ☒ Enable search for primer pairs specific to the intended PCR template
Search mode: Automatic
Database: nr
Exclusion: ☐ Exclude predicted Refseq transcripts (accession with XM, XR prefix) ☐ Exclude uncultured/environmental sample sequences
Organism: Homo sapiens
Entrez query (optional):
Primer specificity stringency: at least 2 total mismatches to unintended targets, including mismatches within the last 5 bps at the 3' end. Ignore targets that have 6 or more mismatches to the primer.
Max target size: 4000
Allow splice variants: ☐ Allow primer to amplify mRNA splice variants (requires refseq mRNA sequence as PCR template input)

Get Primers ☐ Show results in a new window ☒ Use new graphic view

Advanced parameters

Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow

Windows taskbar: 9:31 PM 11/13/2017

dihapus



SINTA - Science and X dna - Google Search X Nucleic Acids - Type X DNA 1 stock illustrat X New Tab X Primer3 Output (primer3 X Primer-Blast results X

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/primertool.cgi?ctg_time=1

Primer-BLAST Primer-Blast results

NCBI/ Primer-BLAST : results: Job id=trxp5R7-E1Y0blNpgmnW_QStmnZaa102A more...

Input PCR template none
Specificity of primers Target templates were found in selected database: Nucleotide collection (nt)
Other reports Search Summary

Detailed primer reports

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AGCAATCTGATTCCACTTCC	20	55.41	45.00	7.00	1.00
Reverse primer	CCCAAAGTGATGTTCTGATG	20	54.27	45.00	3.00	0.00

Products on target templates

>KM454860.1 Hemibagrus nemurus mitochondrion, complete genome

product length = 610

Forward primer	1	AGCAATCTGATTCCACTTCC	20
Template	8871		8890
Reverse primer	1	CCCAAAGTGATGTTCTGATG	20
Template	9480		9461

>KJ624624.1 Hemibagrus wyckioides mitochondrion, complete genome

product length = 610

Forward primer	1	AGCAATCTGATTCCACTTCC	20
Template	8869		8888
Reverse primer	1	CCCAAAGTGATGTTCTGATG	20
Template	9478		9459

Windows taskbar: 9:33 PM 11/13/2017



Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TACCATATACATTACACCAA	21	49.52	28.57	4.00	0.00
Reverse primer	CTTTCCTTGGATTITAACCA	20	51.16	35.00	4.00	4.00

Products on target templates

>[KU870467.1](#) Horabagrus brachysoma mitochondrion, complete genome

product length = 1272

```
Forward primer 1 TACCATATACATTACACCAA 21
Template      8374 ..... 8394
```

```
Reverse primer 1 CTTTCCTTGGATTITAACCA 20
Template      9645 ..... 9626
```

>[KU870465.1](#) Mystus cavasius mitochondrion, complete genome

product length = 1272

```
Forward primer 1 TACCATATACATTACACCAA 21
Template      8378 ..... 8398
```

```
Reverse primer 1 CTTTCCTTGGATTITAACCA 20
Template      9649 ..... 9630
```

>[KM454860.1](#) Hemibagrus nemurus mitochondrion, complete genome

product length = 1272

```
Forward primer 1 TACCATATACATTACACCAA 21
Template      8361 ..... 8381
```

```
Reverse primer 1 CTTTCCTTGGATTITAACCA 20
Template      9632 ..... 9613
```

>[KJ624624.1](#) Hemibagrus wyckioides mitochondrion, complete genome

product length = 1272

```
Forward primer 1 TACCATATACATTACACCAA 21
```



Sequences producing significant alignments

Download

Manage Columns

Show

100



☒ select all 100 sequences selected

GenBank

Graphics

Distance tree of results

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
☒	Hemibagrus nemurus mitochondrion complete genome	42.1	793	100%	1e-06	100.00%	NC_044863.1
☒	Hemibagrus wyckioides mitochondrion complete genome	42.1	791	100%	1e-06	100.00%	KJ624624.1
☒	Hemibagrus nemurus mitochondrion complete genome	42.1	773	100%	1e-06	100.00%	KJ573466.1
☒	Hemibagrus spilopterus mitochondrion complete genome	34.2	908	100%	3e-04	95.24%	JQ343983.1
☒	Hemibagrus macropterus voucher SWU10090910 mitochondrion complete genome	26.3	514	100%	0.075	100.00%	JF834542.1
☒	Hemibagrus sp. RCH-2015 mitochondrion complete genome	22.3	827	100%	1.2	100.00%	KM507291.1
☒	Hemibagrus wyckioides mitochondrion complete genome	20.3	577	100%	4.6	92.86%	MN807278.1
☒	Hemibagrus sp. SWH mitochondrion complete genome	20.3	577	100%	4.6	92.86%	KM577633.1
☒	Hemibagrus nemurus isolate KLT7 tRNA-Pro gene and D-loop partial sequence; mitochondrial	18.3	32.7	76%	18	100.00%	KX268708.1
☒	Hemibagrus nemurus isolate KLT6 tRNA-Pro gene and D-loop partial sequence; mitochondrial	18.3	32.7	76%	18	100.00%	KX268707.1
☒	Hemibagrus nemurus isolate KLT5 tRNA-Pro gene and D-loop partial sequence; mitochondrial	18.3	32.7	76%	18	100.00%	KX268706.1
☒	Hemibagrus nemurus isolate KLT4 tRNA-Pro gene and D-loop partial sequence; mitochondrial	18.3	32.7	76%	18	100.00%	KX268705.1
☒	Hemibagrus nemurus isolate KLT3 tRNA-Pro gene and D-loop partial sequence; mitochondrial	18.3	32.7	76%	18	100.00%	KX268704.1
☒	Hemibagrus nemurus isolate KLT2 tRNA-Pro gene and D-loop partial sequence; mitochondrial	18.3	32.7	76%	18	100.00%	KX268703.1
☒	Hemibagrus nemurus isolate KLT1 tRNA-Pro gene and D-loop partial sequence; mitochondrial	18.3	32.7	76%	18	100.00%	KX268702.1
☒	Hemibagrus nemurus isolate PRK5 tRNA-Pro gene and D-loop partial sequence; mitochondrial	18.3	32.7	76%	18	100.00%	KX268701.1
☒	Hemibagrus nemurus isolate PRK4 tRNA-Pro gene and D-loop partial sequence; mitochondrial	18.3	47.1	80%	18	100.00%	KX268700.1

Feedback



- Untuk mengetahui primer hasil disain spesifik atau tidak adalah dengan cara melihat hasil pencarian BLAST.
- Jika primer memiliki kesamaan dengan DNA organisme lain atau bahkan sama, berarti primer tidak spesifik.
- Hal ini dapat berbahaya karena primer menempel kemana-mana, akibatnya akan muncul banyak produk PCR yang tidak diinginkan.

hasil BLAST seperti di atas masih bisa ditoleransi jika.



UNIVERSITAS GADJAH MADA

- Sekuen DNA tersebut berasal dari organisme lain yang secara praktiknya tidak mungkin ada bersama-sama dengan organisme target (dalam contoh ini virus Rabies) ketika mengambil sampel untuk ekstraksi RNA. Misalnya *Oryza sativa* (tanaman padi), atau *Ascaris* (cacing gelang), yang sepertinya tidak mungkin ada bersama virus rabies.
- Hanya satu dari sepasang primer tersebut yang diduga tidak spesifik. Jika memang sulit menemukan alternatif lain yang lebih baik, maka kondisi ini masih dapat diterima, tapi jumlah primer yang ditambahkan ketika PCR nantinya harus dioptimasi.



- Boleh jadi kedua primer diduga tidak spesifik, tapi posisi penempelan tidak spesifik mereka itu pada gen lain terpisah sangat jauh sehingga secara teori tidak akan mungkin menghasilkan produk PCR, misalnya jika jaraknya lebih dari 10000 bp.
- Sekuen primer tersebut tidak benar-benar match 100%, terutama jika 5 basa terakhirnya tidak match (terhadap DNA organisme lain atau fragmen dari DNA tsb).



- **1. Panjang Primer**

Secara umum disepakati bahwa panjang primer PCR yang optimal adalah 18-22 nukleotida. Ukuran ini cukup panjang untuk mencapai spesifisitas yang cukup, dan cukup pendek bagi primer untuk terikat dengan mudah pada DNA template pada suhu *annealing*-nya.



- **2. Suhu Leleh Primer**

- Suhu leleh atau *melting temperature* (T_m) adalah temperatur dimana setengah dari duplex DNA akan terpisah menjadi untai tunggal dan T_m juga mengindikasikan stabilitas duplex.
- Hasil terbaik biasanya diperoleh jika primer memiliki T_m 52-58 °C. Primer dengan nilai T_m di atas 65 °C memiliki kecenderungan untuk terjadinya annealing sekunder. Nilai T_m bisa diindikasikan dari *GC content* dan dapat dihitung secara akurat menggunakan rumus-rumus tertentu.



3. Suhu Annealing Primer (T_a)

- Nilai Temperatur Leleh (T_m) merupakan estimasi stabilitas hibrid DNA-DNA dan penting untuk menentukan suhu annealing. Jika T_a terlalu tinggi maka akan menyebabkan hibridisasi primer-template yang kurang baik sehingga *yield* produk PCR pun akan rendah. Sebaliknya jika T_a terlalu rendah maka bisa menyebabkan banyaknya produk-produk non-spesifik karena akan terjadi banyak mismatch yang menurunkan spesifisitas PCR.
- Bagaimana cara menghitung T_a ?



4. GC Content

- *GC content* (prosentase jumlah G dan C terhadap jumlah basa total pada primer) harus berkisar antara 40-60%.

5. GC Clamp

- Ketika mendesain primer biasanya memilih primer yang memiliki G atau C pada posisi 5 terakhir ujung 3', karena dapat meningkatkan ikatan spesifik pada ujung 3' karena ikatan G atau C lebih kuat. Namun perlu dihindari lebih dari 3 basa G atau C pada 5 basa terakhir ujung 3' karena ujung 3'-nya dapat melipat membentuk GC clamp yang mengakibatkan ujung 3' primer tidak terikat pada template.



- **6. Struktur Sekunder Primer**

- Struktur sekunder primer dapat disebabkan oleh interaksi intra dan inter-molekuler primer. Hal ini juga amat mempengaruhi kualitas dan kuantitas produk PCR, karena akan mengurangi kemampuan primer menempel pada template.



Beberapa jenis struktur sekunder primer:

i) Hairpins

- Hairpins terbentuk akibat interaksi intramolekuler primer sehingga membentuk semacam lipatan.

ii) Self Dimer

- Self dimer terbentuk oleh interaksi intermolekuler antara dua molekul primer yang sama, dimana primer homolog terhadap dirinya sendiri. Biasanya oleh karena menambahkan primer dalam jumlah besar dibanding jumlah DNA template, dan ketika primer lebih suka membentuk dimer intermolekuler ketimbang berhibridisasi dengan DNA template, maka yield produk tentu akan berkurang.



iii) Cross Dimer

- Primer cross dimer terbentuk karena interaksi intermolekuler antara primer sense dan antisense, dimana keduanya memiliki homologi.



7. Repeats

- Repeat adalah suatu di-nukleotida yang terjadi berulang-ulang secara berurutan dan harus dihindari karena mereka dapat menyebabkan mispriming. Contohnya: ATATATAT. Jumlah repeat **maksimum** yang dapat ditoleransi adalah **4 di-nukleotida**.

8. Runs

- Runs mirip dengan repeat, tetapi pada run pengulangannya hanya 1 jenis basa. Runs juga harus dihindari karena dapat menyebabkan mispriming. Contohnya: TCAGGGGGTAGCGGGGTA memiliki run basa G 5 dan 4. Jumlah **maksimum** run yang dapat diterima adalah 4 basa.



Parameter untuk Pasangan Primer

1. Panjang ampikon

- Panjang ampikon (produk PCR) ditentukan oleh tujuan eksperimen itu sendiri. Jika tahu posisi primer pada template, maka:

$$\text{Panjang produk} = (\text{Posisi primer antisense} - \text{posisi primer sense}) + 1$$

2. Selisih Tm pasangan primer

- Sepasang primer harus memiliki Tm yang nilainya berdekatan. Jika selisihnya lebih dari 5 °C maka dapat menyebabkan tidak terjadinya amplifikasi.

Summary ~ when is a “primer” a primer?

