DESAIN PRIMER

Rini Widayanti

PENDAHULUAN

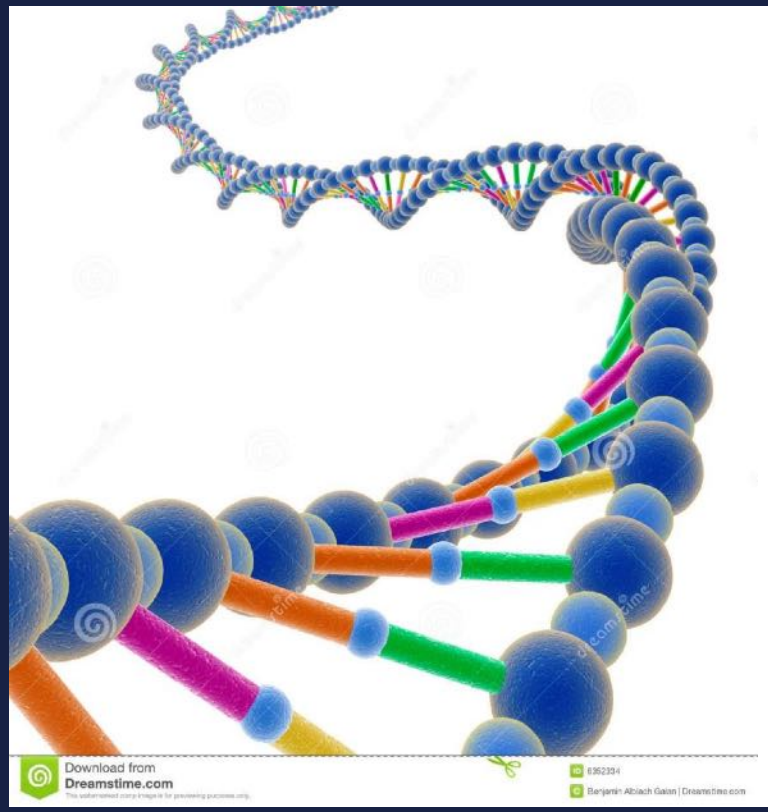
A =T ; C≡ G

DNA terdiri dari nukleotida A,T,G,C

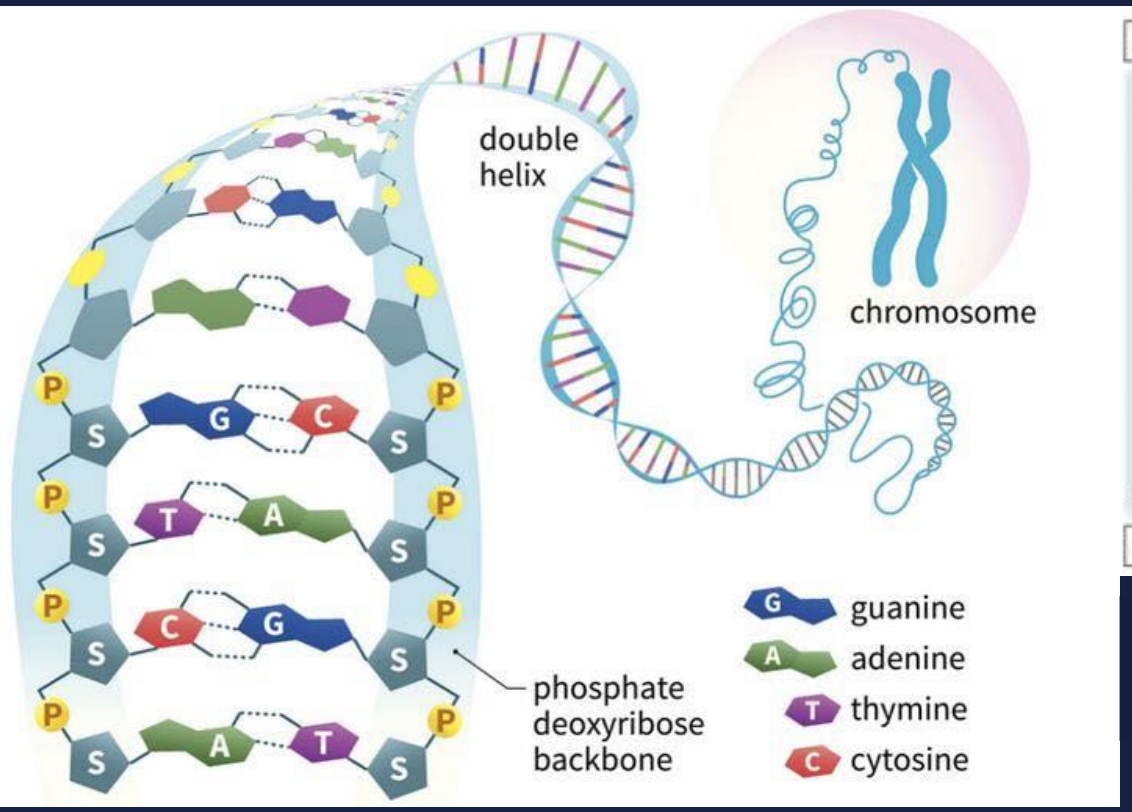
Untai yang satu adalah komplemen untai yang lainnya

DNA untai ganda , anti paralel

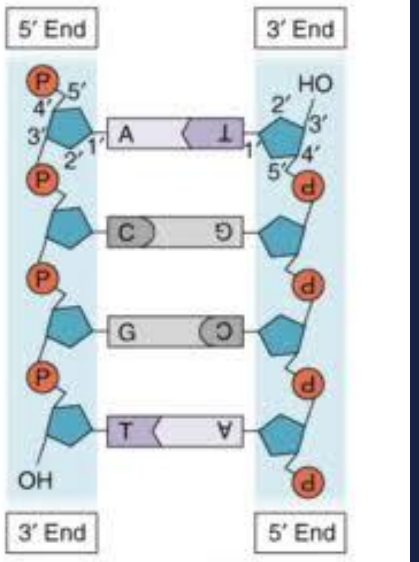
DNA



Doble helix

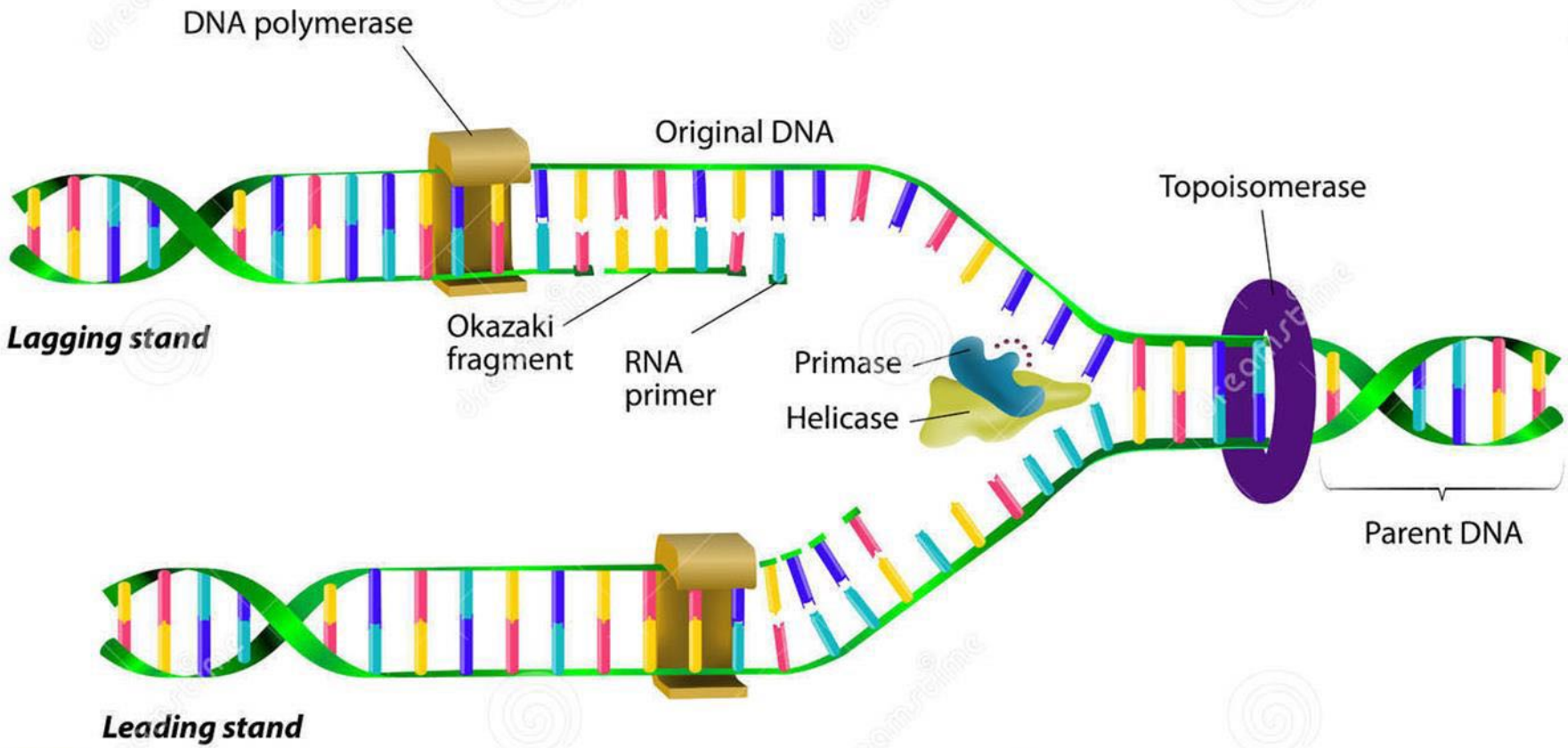


komplementer



Anti paralel

DNA replication



Apa itu Primer?

1

Primer merupakan sepotong DNA pendek untai tunggal (oligonukleotida), panjangnya antara 10 sampai sekitar 40 basa..

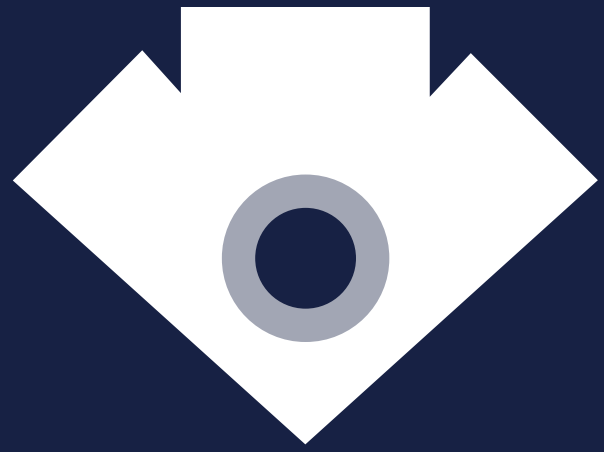
2

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

3

primer juga berfungsi untuk membatasi daerah mana yang akan diamplifikasi pada reaksi PCR.

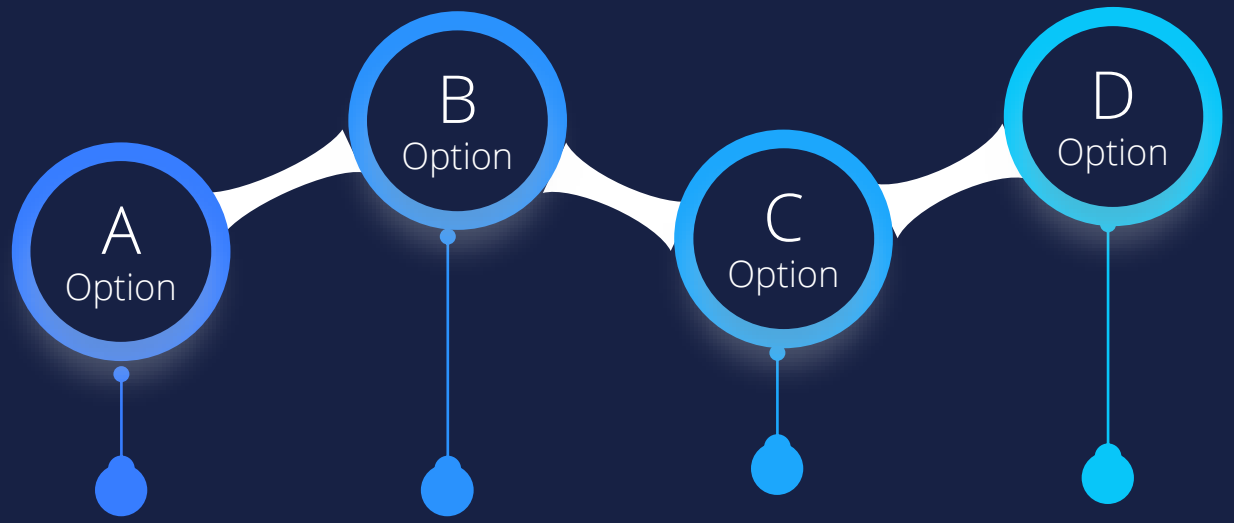
Primer yang ideal



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



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

Gen target
Usahakan agar pencarian lebih spesifik dengan cara menentukan gen targetnya.

NCBI
sekuen referensi dapat dicari dari database GenBank di situs NCBI

Organisme
Misal targetnya adalah virus Corona, maka harus mengumpulkan sekuen virus Corona sebagai referensi.

3. Manual atau perlu bantuan software?

M

Manual

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.

P

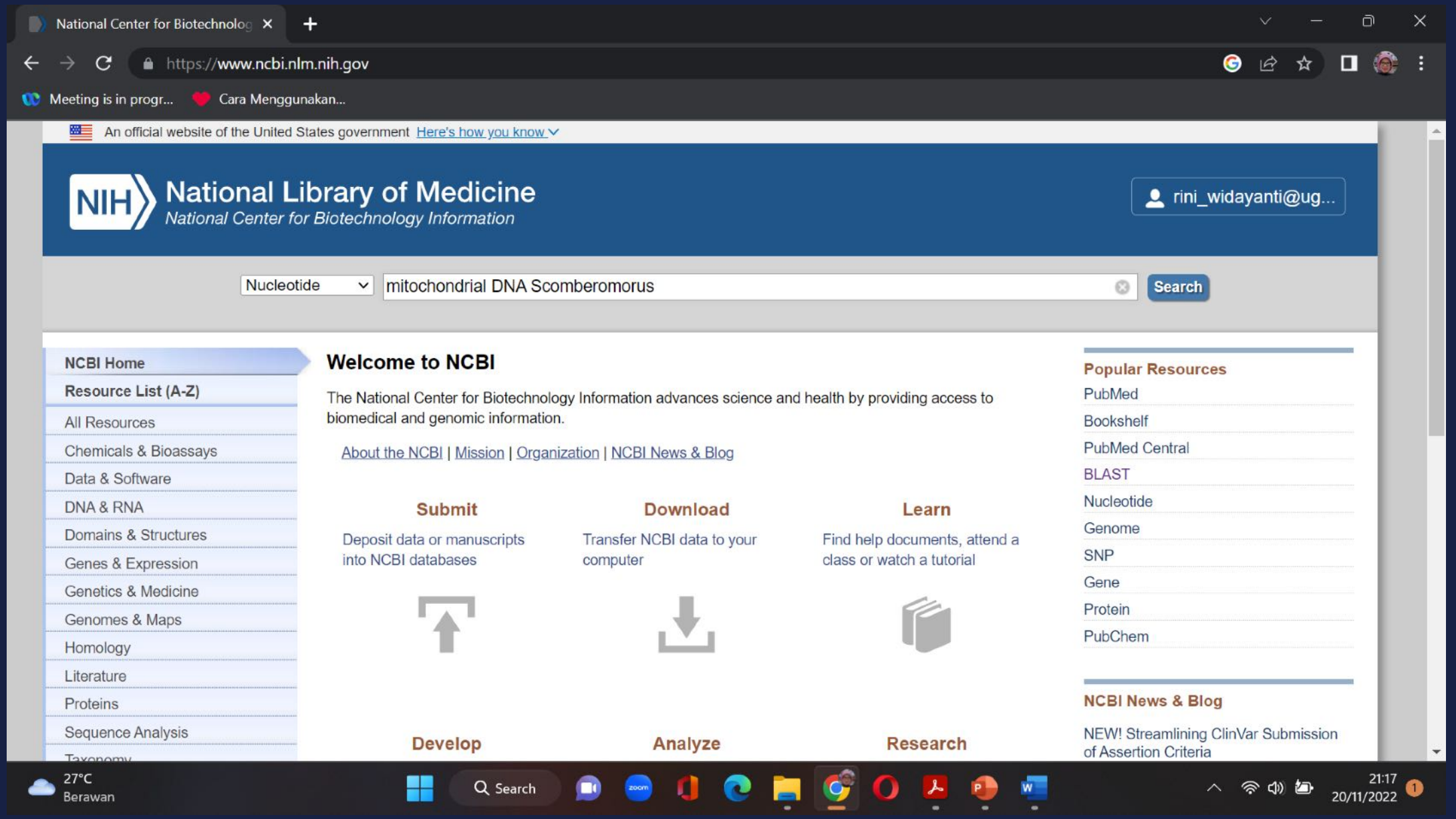
Software

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.b ioinformatics.nl/cgi-bin /primer3plus /primer3plus.cgi

B

Primer blast yang ada di NCBI

2. Menyiapkan Sekuen Referensi



Nucleotide

Nucleotide | mitochondrial DNA Scomberomorus | Search

Create alert Advanced Help

Species
Animals (773)
Customize ...

Molecule types
genomic DNA/RNA (773)
Customize ...

Source databases
INSDC (GenBank) (772)
RefSeq (1)
Customize ...

Sequence Type
Nucleotide (773)

Genetic compartments
Mitochondrion (741)

Sequence length
Custom range...

Summary | 20 per page | Sort by Default order | Send to:

Filters: Manage Filters

Items: 21 to 40 of 773

<< First < Prev Page 2 of 39 Next > Last >>

21. **Scomberomorus** niphonius **mitochondrial DNA**, control region, partial sequence, haplotype: HAP92
305 bp linear **DNA**
Accession: AB844544.1 GI: 569532213
Taxonomy
GenBank FASTA Graphics

22. **Scomberomorus** niphonius **mitochondrial DNA**, control region, partial sequence, haplotype: HAP91
305 bp linear **DNA**
Accession: AB844543.1 GI: 569532212
Taxonomy
GenBank FASTA Graphics

Results by taxon

Top Organisms [Tree]
- Scomberomorus commerson *(336)*
- Scomberomorus niphonius *(268)*
- Scomberomorus regalis *(32)*
- Scomberomorus cavalla *(32)*
- Scomberomorus maculatus *(24)*
- All other taxa *(81)*

More...

Find related data

Database: Select

Find items

Cytochrome B gene mitochondri

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=Cytochrome+B+gene+mitochondrial+DNA+Scomberomorus

Meeting is in progr... Cara Menggunakan...

Nucleotide

Nucleotide | Cytochrome B gene mitochondrial DNA Scomberomorus | Search

Create alert Advanced Help

Species
Animals (39)
Customize ...

Molecule types
genomic DNA/RNA (39)
Customize ...

Source databases
INSDC (GenBank) (38)
RefSeq (1)
Customize ...

Sequence Type
Nucleotide (39)

Genetic compartments
Mitochondrion (38)

Sequence length
Custom range...

Release date
Custom range...

Revision date
Custom range...

Summary | 20 per page | Sort by Default order | Send to:

See **Gene** information for b cytochrome **cytochrome b dna mitochondrial**
b in Drosophila melanogaster (2) Escherichia virus Lambda All 50 **Gene** records
cytochrome in Cricetulus griseus Tripterygium wilfordii (2) All 4 **Gene** records
cytochrome b in Pongo abelii 1 **Gene** record
dna in Zea mays 1 **Gene** record
mitochondrial in Arabidopsis thaliana 1 **Gene** record

Items: 1 to 20 of 39

<< First < Prev Page 1 of 2 Next > Last >>

1. **Scomberomorus** maculata **mitochondrial cytochrome b gene**, partial cds
595 bp linear **DNA**
Accession: L11545.1 GI: 294832
Protein PubMed Taxonomy
GenBank FASTA Graphics

2. **Scomberomorus** cavalla **mitochondrial cytochrome b gene**, partial cds
590 bp linear **DNA**
Accession: L11543.1 GI: 294830
Protein PubMed Taxonomy
GenBank FASTA Graphics

Filters: Manage Filters

Results by taxon

Top Organisms [Tree]
Scomberomorus commerson *(20)*
Scomberomorus niphonius *(7)*
Scomberomorus guttatus *(6)*
Scomberomorus munroi *(1)*
Scomberomorus semifasciatus *(1)*
All other taxa *(4)*
More...

Find related data

Database: Select

Find items

Search details

```
cytochrome b[All Fields] AND
gene[All Fields] AND
(("mitochondrial"[All Fields] AND
"dna"[All Fields]) OR "mitochondrial
dna"[All Fields]) AND
```

27°C Berawan | Search | 21:23 20/11/2022

Protein Taxonomy

GenBank FASTA Graphics PopSet

36. **Scomberomorus** commerson isolate NBM1 **cytochrome b gene**, partial cds; **mitochondrial**
404 bp linear **DNA**
Accession: KF777803.1 GI: 575461009
Protein Taxonomy

GenBank FASTA Graphics PopSet

37. **Scomberomorus** niphonius mitochondrion, complete genome
16,646 bp circular **DNA**
Accession: NC_016420.1 GI: 359421978
BioProject Protein Taxonomy

GenBank FASTA Graphics

38. **Scomberomorus** niphonius mitochondrion, complete genome
16,646 bp circular **DNA**
Accession: GU109281.1 GI: 261888513
Protein Taxonomy

GenBank FASTA Graphics

39. Dendroctonus ponderosae isolate FM_Combo_2020 Dpon_F_20191213_1, whole genome shotgun sequence
63,639,454 bp linear **DNA**
Accession: JAFETG010000001.1 GI: 2112722214
Assembly BioProject BioSample Protein Taxonomy

GenBank FASTA Graphics

GenBank
Send to:

Scomberomorus niphonius mitochondrion, complete genome

NCBI Reference Sequence: NC_016420.1

FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       NC_016420              16646 bp    DNA     circular VRT 20-DEC-2011
DEFINITION  Scomberomorus niphonius mitochondrion, complete genome.
ACCESSION   NC_016420
VERSION     NC_016420.1
DBLINK      Project: 78505
            BioProject: PRJNA78505
KEYWORDS    RefSeq.
SOURCE      mitochondrion Scomberomorus niphonius (Japanese Spanish mackerel)
  ORGANISM  Scomberomorus niphonius
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
            Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Neoteleostei;
            Acanthomorphata; Pelagiaria; Scombriformes; Scombridae;
            Scomberomorus.
REFERENCE   1  (bases 1 to 16646)
  AUTHORS   Liu,S.F. and Zhuang,Z.M.
  TITLE     Complete sequence and gene organization in mitochondrial DNA of
            Scomberomorus niphonius
  JOURNAL   Unpublished
```

reference sequence is identical to GU109281.
COMPLETENESS: full length.

FEATURES Location/Qualifiers

```
     source          1..16646
                     /organism="Scomberomorus niphonius"
                     /organelle="mitochondrion"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /db_xref="taxon:321164"
     tRNA            1..68
                     /product="tRNA-Phe"
     rRNA            69..1023
                     /product="s-rRNA"
                     /note="12S ribosomal RNA"
     tRNA            1024..1095
                     /product="tRNA-Val"
     rRNA            1096..2787
                     /product="l-rRNA"
                     /note="16S ribosomal RNA"
     tRNA            2788..2861
                     /product="tRNA-Leu"
                     /codon_recognized="UUR"
     gene            2862..3836
                     /gene="ND1"
                     /db_xref="GeneID:11452024"
     CDS             2862..3836
                     /gene="ND1"
                     /codon_start=1
                     /transl_table=2
                     /product="NADH dehydrogenase subunit 1"
                     /protein_id="YP_004935397.1"
                     /db_xref="GeneID:11452024"
                     /translation="MITALMIHILNPLAFIVPVLLAVAFLTLIERKVLGYMQLRKGPN
                     IVGPYGLLQPIADGVKLFIKEPVRPSTSSPVLFLLAPMLALTLALTLWAPMPLPYPVT
                     NSKYALIGALRAVAQTISYEVSLGLILLNAI
```

Cytochrome B gene mitochondrial DNA Scomberomorus (39) Nucleotide
mitochondrial DNA Scomberomorus (773) Nucleotide
Gallus gallus breed Five black chicken mitochondrion, complete genome Nucleotide
Gallus gallus mitochondrial DNA, complete genome, breed: Tosa-Jidori Nucleotide
See more...

```
                     LTWIGGMPAEQPFIIIGQVASVLYFSLFLIFFPLAGWTENKVLEMP"
     tRNA            15547..15618
                     /product="tRNA-Thr"
     tRNA            complement(15618..15687)
                     /product="tRNA-Pro"
     D-loop          15688..16646
                     /note="control region"
ORIGIN
        1 gctggcgtag cttacttaaa gcataacact gaagatgtta agatgggccc tagaaagctc
       61 cgcaggcaca aaggtttggt cctgactttg ctgtcagctt tagccagatt tacacatgca
      121 agtatccgca ccccgtgag aatgcccccc agttttctgc ccgaaaacaa ggagctggta
      181 tcaggcacac ccatatatta agcccatgac gccttgctta gccacaccct caagggaact
      241 cagcagtgat aaaccttaag ccataagcgc aagcttgact tagttaaggc taagagggcc
      301 ggtaaaactc gtgccagcca ccgcggttat acgagaggcc caagttgaca accaccggcg
      361 taaagcgtgg ttaagatata atcaaaacta aagccgaatg tcttcaaggc agtcatacgc
      421 ttccgaagac acgaagcccc accacgaaag tggctttaac aatccctgaa cccacgaaag
      481 ctaggacaca aactgggatt agataccca ctatgcctag ccgtaaacat tgatagaatt
      541 gtacaccctc tatccgcctg ggtactacga gcattagctt aaaacccaaa ggacttggcg
      601 gtactttaga tccccctaga ggagcctgtt ctgtaaccga taaccccgt tcaacctcac
      661 cctcccttgt ttttcccgcc tatataccgc cgtcgtaagc ttaccctgtg aaggcctaat
      721 agtaagcaaa attggcaccg cccagaacgt caggtcgagg tgtagcatat gagaggggaa
      781 gaaatgggct acattcgcta atctagcgaa cacgaatgat actgctgaaa acgcatatct
      841 gaaggaggat ttagcagtaa gtggaaaaca gagtgttcca ctgaagttgg ctctgaagtg
      901 cgtacacacc gcccgtcact ctccccgagc ttacaaatat agttatacat aaaatgcttt
      961 aatcgctaag gggaggcaag tcgtaacatg gtaagtgtac cggaaggtgc acttggagaa
     1021 aatcagagta tagctaagat agtatagcat ttcccttaca ctgaaaaatc atccgtgcaa
     1081 gccggattac cctgacgcca acaagctagc ccacctccac taaaacaaca gtccaacata
     1141 aataacccct aatacacgca ctcccgctaa accaaaccat ttttcccct tagtatgggc
     1201 gacagaaaag gaatcatcgg cgcgatagag aaagtaccgc aagggaacgc tgaaaaagta
     1261 aatgaaacaa tccagtgaag cctagaaaag cagagattac cccccgtacc ttttgcatca
     1321 tgatttagcc agtatcttaa ccaggcagag agaactttag tttggacccc cgaaactacg
```

69..1023
/product="s-rRNA"
/note="12S ribosomal RNA"

rRNA Feature 1 of 2 NC_016420 : 1 segment

Details Display: FASTA GenBank Help

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_016420.1?from=69&to=1023&report=fasta

FASTA

Send to:

Scomberomorus niphonius mitochondrion, complete genome

NCBI Reference Sequence: NC_016420.1

GenBank Graphics

```
>NC_016420.1:69-1023 Scomberomorus niphonius mitochondrion, complete genome
CAAAGGTTTGGTCCTGACTTTGCTGTCAGCTTTAGCCAGATTTACACATGCAAGTATCCGCACCCCCGTG
AGAATGCCCCCCAGTTTTCTGCCCGAAAACAAGGAGCTGGTATCAGGCACACCCATATATTAAGCCCATG
ACGCCTTGCTTAGCCACACCCTCAAGGGAACTCAGCAGTGATAAACCTTAAGCCATAAGCGCAAGCTTGA
CTTAGTTAAGGCTAAGAGGGCCGGTAAAACTCGTGCCAGCCACCGCGGTTATACGAGAGGCCCAAGTTGA
CAACCACCGGCGTAAAGCGTGGTTAAGATATAATCAAAACTAAAGCCGAATGTCTTCAAGGCAGTCATAC
GCTTCCGAAGACACGAAGCCCCACCACGAAAGTGGCTTTAACAATCCCTGAACCCACGAAAGCTAGGACA
CAAACTGGGATTAGATACCCCACTATGCCTAGCCGTAAACATTGATAGAATTGTACACCCTCTATCCGCC
TGGGTACTACGAGCATTAGCTTAAAACCCAAAGGACTTGGCGGTACTTTAGATCCCCCTAGAGGAGCCTG
TTCTGTAACCGATAACCCCCGTTCAACCTCACCCTCCCTTGTTTTTCCCGCCTATATACCGCCGTCGTAA
GCTTACCCTGTGAAGGCCTAATAGTAAGCAAAATTGGCACCGCCCAGAACGTCAGGTCGAGGTGTAGCAT
ATGAGAGGGGAAGAAATGGGCTACATTCGCTAATCTAGCGAACACGAATGATACTGCTGAAAACGCATAT
CTGAAGGAGGATTTAGCAGTAAGTGGAAAACAGAGTGTTCCACTGAAGTTGGCTCTGAAGTGCGTACACA
CCGCCCGTCACTCTCCCCGAGCTTACAAATATAGTTATACATAAAATGCTTTAATCGCTAAGGGGAGGCA
AGTCGTAACATGGTAAGTGTACCGGAAGGTGCACTTGGAGAAAAT
```

Change region shown

- Whole sequence
- Selected region

from: 69 to: 1023

Update View

Customize view

Analyze this sequence

Run BLAST

Pick Primers

Highlight Sequence Features

Related information

BioProject

Protein

Taxonomy

GenBank ▾ Send to: ▾

Scomberomorus niphonius mitochondrion, complete genome

NCBI Reference Sequence: NC_016420.1

FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       NC_016420               955 bp    DNA     linear   VRT 20-DEC-2011
DEFINITION  Scomberomorus niphonius mitochondrion, complete genome.
ACCESSION   NC_016420 REGION: 69..1023
VERSION     NC_016420.1
DBLINK      Project: 78505
            BioProject: PRJNA78505
KEYWORDS    RefSeq.
SOURCE      mitochondrion Scomberomorus niphonius (Japanese Spanish mackerel)
  ORGANISM  Scomberomorus niphonius
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
            Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Neoteleostei;
            Acanthomorphata; Pelagiaria; Scombriformes; Scombridae;
            Scomberomorus.
REFERENCE   1  (bases 1 to 955)
  AUTHORS   Liu,S.F. and Zhuang,Z.M.
  TITLE     Complete sequence and gene organization in mitochondrial DNA of
            Scomberomorus niphonius
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 955)
  CONSRTM   NCBI Genome Project
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (06-DEC-2011) National Center for Biotechnology
                                                    20894, USA
```

Change region shown

Whole sequence
Selected region
from: 69 to: 1023
Update View

Customize view

Analyze this sequence
Run BLAST
Pick Primers
Highlight Sequence Features
Find in this Sequence

Related information
BioProject
Protein
Taxonomy
Gene

LinkOut to external resources

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): NONE

☑ 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: 150-250 100-300 301-400 401-500 501-600 601-700 701-850 851-1000

Number To Return: 5 Max 3' Stability: 9.0

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

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): NONE

```
CAACCACCGGCGTAAAGCGTGGTTAAGATATAATCAAAACTAAAGCCGAATGTCTTCAAGGCAGTCATAC
GCTTCCGAAGACACGAAGCCCCACCACGAAAGTGGCTTTAACAATCCCTGAACCCACGAAAGCTAGGACA
CAAACTGGGATTAGATACCCCACTATGCCTAGCCGTAAACATTGATAGAATTGTACACCCTCTATCCGCC
TGGGTACTACGAGCATTAGCTTAAAACCCAAAGGACTTGGCGGTACTTTAGATCCCCCTAGAGGAGCCTG
TTCTGTAACCGATAACCCCCGTTCAACCTCACCCTCCCTTGTTTTTCCCGCCTATATACCGCCGTCGTAA
GCTTACCCTGTGAAGGCCTAATAGTAAGCAAAATTGGCACCGCCCAGAACGTCAGGTCGAGGTGTAGCAT
```

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: 150-250 100-300 301-400 401-500 501-600 601-700 701-850 851-1000

Number To Return: 5 — Max 3' Stability: 9.0

Scomberomorus niphonius mitoc | Primer3 Input (version 0.4.0)

https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/

Meeting is in progr... | Cara Menggunakan...

Regions: ...ATCT<CCCC>TCAT.. forbids primers in the central CCCC.

Product Size Ranges: 650-750

Number To Return: 5 | Max 3' Stability: 9.0

Max Repeat Mispriming: 12.00 | Pair Max Repeat Mispriming: 24.00

Max Template Mispriming: 12.00 | Pair Max Template Mispriming: 24.00

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 Debuging Info ☑ Do not treat ambiguity codes in libraries as consensus ☐ Lowercase masking

Pick Primers | Reset Form

26°C Berawan

Search

21:39 20/11/2022

Primer3 Output

```
No mispriming library specified
Using 1-based sequence positions
OLIGO            start  len       tm      gc%    any    3'  seq
LEFT PRIMER        186   20    60.00    50.00   7.00   2.00 CCTTAAGCCATAAGCGCAAG
RIGHT PRIMER       835   20    60.06    50.00   4.00   3.00 ACGCACTTCAGAGCCAACTT
SEQUENCE SIZE: 955
INCLUDED REGION SIZE: 955

PRODUCT SIZE: 650, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 3.00

    1 CAAAGGTTTGGTCCTGACTTTGCTGTCAGCTTTAGCCAGATTTACACATGCAAGTATCCG


   61 CACCCCCGTGAGAATGCCCCCCAGTTTTCTGCCCGAAAACAAGGAGCTGGTATCAGGCAC


  121 ACCCATATATTAAGCCCATGACGCCTTGCTTAGCCACACCCTCAAGGGAACTCAGCAGTG


  181 ATAAACCTTAAGCCATAAGCGCAAGCTTGACTTAGTTAAGGCTAAGAGGGCCGGTAAAAC
         >>>>>>>>>>>>>>>>>>>


  241 TCGTGCCAGCCACCGCGGTTATACGAGAGGCCCAAGTTGACAACCACCGGCGTAAAGCGT


  301 GGTTAAGATATAATCAAAACTAAAGCCGAATGTCTTCAAGGCAGTCATACGCTTCCGAAG


  361 ACACGAAGCCCCACCACGAAAGTGGCTTTAACAATCCCTGAACCCACGAAAGCTAGGACA
```

```
  781 ATTTAGCAGTAAGTGGAAAACAGAGTGTTCCACTGAAGTTGGCTCTGAAGTGCGTACACA
                                      <<<<<<<<<<<<<<<<<<<

  841 CCGCCCGTCACTCTCCCCGAGCTTACAAATATAGTTATACATAAAATGCTTTAATCGCTA


  901 AGGGGAGGCAAGTCGTAACATGGTAAGTGTACCGGAAGGTGCACTTGGAGAAAAT


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

ADDITIONAL OLIGOS
                    start  len      tm      gc%   any    3'  seq

 1 LEFT PRIMER        221   20   60.10   55.00  4.00  1.00 GCTAAGAGGGCCGGTAAAAC
   RIGHT PRIMER       944   20   60.04   55.00  6.00  0.00 GTGCACCTTCCGGTACACTT
   PRODUCT SIZE: 724, PAIR ANY COMPL: 5.00, PAIR 3' COMPL: 2.00

 2 LEFT PRIMER         21   20   59.89   50.00  7.00  2.00 TGCTGTCAGCTTTAGCCAGA
   RIGHT PRIMER       723   20   60.03   50.00  2.00  0.00 TAGCCCATTTCTTCCCCTCT
   PRODUCT SIZE: 703, PAIR ANY COMPL: 3.00, PAIR 3' COMPL: 3.00

 3 LEFT PRIMER         21   20   59.89   50.00  7.00  2.00 TGCTGTCAGCTTTAGCCAGA
   RIGHT PRIMER       672   20   60.13   45.00  5.00  1.00 CGGTGCCAATTTTGCTTACT
   PRODUCT SIZE: 652, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 1.00

 4 LEFT PRIMER        108   20   59.80   50.00  4.00  2.00 TGGTATCAGGCACACCCATA
   RIGHT PRIMER       835   20   60.06   50.00  4.00  3.00 ACGCACTTCAGAGCCAACTT
   PRODUCT SIZE: 728, PAIR ANY COMPL: 3.00, PAIR 3' COMPL: 1.00

Statistics
         con   too    in    in          no    tm    tm  high  high        high
         sid  many   tar  excl   bad    GC   too   too   any    3'  poly   end
        ered    Ns   get   reg   GC% clamp   low  high compl compl     X  stab    ok
```

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:

S

Primer tersebut hanya akan mengamplifikasi daerah yang diinginkan

R

Tidak menempel pada daerah lain di genom organisme target (dalam contoh ini misalnya memiliki materi genetik berupa RNA)

H

Tidak menempel pada DNA organisme lain yang mungkin tercampur bersama DNA target ketika isolasi DNA. Misalnya DNA host-nya Cocid-19 yaitu manusia.

B

Pengujian spesifisitas dapat dilakukan dengan bantuan BLAST di NCBI. Jenis BLAST yang digunakan adalah PRIMER BLAST

Berikut ini adalah langkah-langkah-nya

National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

BLAST ®

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

NEWS

BLAST+ 2.13.0 is here!

Starting with this release, we are including the blastn_vdb and tblastn_vdb executables in the BLAST+ distribution.

Thu, 17 March 2022

More BLAST news...

Web BLAST

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 across their entire span (Needleman-Wunsch)

CD-search
Find conserved domains in your sequence

IgBLAST
Search immunoglobulins and T cell receptor sequences

VecScreen
Search sequences for vector contamination

CDART
Find sequences with similar conserved domain architecture

Multiple Alignment
Align sequences using domain and protein constraints

```
  781 ATTTAGCAGTAAGTGGAAAACAGAGTGTTCCACTGAAGTTGGCTCTGAAGTGCGTACACA
                                      <<<<<<<<<<<<<<<<<<<

  841 CCGCCCGTCACTCTCCCCGAGCTTACAAATATAGTTATACATAAAATGCTTTAATCGCTA


  901 AGGGGAGGCAAGTCGTAACATGGTAAGTGTACCGGAAGGTGCACTTGGAGAAAAT


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

ADDITIONAL OLIGOS
                    start  len      tm    gc%   any   3'  seq

 1 LEFT PRIMER        221   20   60.10   55.00  4.00  1.00 GCTAAGAGGGCCGGTAAAAC
   RIGHT PRIMER       944   20   60.04   55.00  6.00  0.00 GTGCACCTTCCGGTACACTT
   PRODUCT SIZE: 724, PAIR ANY COMPL: 5.00, PAIR 3' COMPL: 2.00

 2 LEFT PRIMER         21   20   59.89   50.00  7.00  2.00 TGCTGTCAGCTTTAGCCAGA
   RIGHT PRIMER       723   20   60.03   50.00  2.00  0.00 TAGCCCATTTCTTCCCCTCT
   PRODUCT SIZE: 703, PAIR ANY COMPL: 3.00, PAIR 3' COMPL: 3.00

 3 LEFT PRIMER         21   20   59.89   50.00  7.00  2.00 TGCTGTCAGCTTTAGCCAGA
   RIGHT PRIMER       672   20   60.13   45.00  5.00  1.00 CGGTGCCAATTTTGCTTACT
   PRODUCT SIZE: 652, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 1.00

 4 LEFT PRIMER        108   20   59.80   50.00  4.00  2.00 TGGTATCAGGCACACCCATA
   RIGHT PRIMER       835   20   60.06   50.00  4.00  3.00 ACGCACTTCAGAGCCAACTT
   PRODUCT SIZE: 728, PAIR ANY COMPL: 3.00, PAIR 3' COMPL: 1.00

Statistics
         con   too    in    in          no    tm    tm  high  high        high
         sid  many   tar  excl   bad    GC   too   too   any    3'  poly   end
        ered    Ns   get   reg   GC% clamp   low  high compl compl     X  stab    ok
```

Scomberomorus niphonius mitoc | Primer3 Output (primer3_results.c | Primer designing tool

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

Meeting is in progr... | Cara Menggunakan...

National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

rini_widayanti@ug...

Primer-BLAST

A tool for finding specific primers

Finding primers specific to your PCR template (using Primer3 and BLAST).

Primers for target on one template | Primers common for a group of sequences

Retrieve recent results | Publication | Tips for finding specific primers | Save search parameters | Reset page

PCR Template

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

Range Clear

	From	To
Forward primer		
Reverse primer		

Or, upload FASTA file Choose File No file chosen

Primer Parameters

Use my own forward primer (5'->3' on plus strand)	GCTAAGAGGGCCGGTAAAAC	Clear
Use my own reverse primer (5'->3' on minus strand)	GTGCACCTTCCGGTACACTT	Clear

	Min	Max
PCR product size	70	1000
# of primers to return	10	

25°C Berawan | Search | 22:11 20/11/2022

Scomberomorus niphonius mitoc | Primer3 Output (primer3_results.c | Primer designing tool

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

Meeting is in progr... | Cara Menggunakan...

Primer melting temperatures (T_m)

Exon/intron selection

A refseq mRNA sequence as PCR template input is required for options in the section

Exon junction span: No preference

Exon junction match

Min 5' match	Min 3' match	Max 3' match
7	4	8

Minimal and maximal 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	Max
1000	10000

Primer Pair Specificity Checking Parameters

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

Search mode: Automatic

Database: Refseq mRNA

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

Exclusion: de uncultured/environmental sample sequences

Organism: organism

dents), taxonomy id or select from the suggestion list as you type.

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.

25°C Berawan | Search | 22:11 20/11/2022

Primer melting temperatures (T_m)

Exon/intron selection

A refseq mRNA sequence as PCR template input is required for options in the section

Exon junction span: No preference

Exon junction match

Min 5' match	Min 3' match	Max 3' match
7	4	8

Minimal and maximal 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	Max
1000	10000

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 — Add organism

Enter an organism name (or organism group name such as enterobacteriaceae, rodents), taxonomy id or select from the suggestion list as you type.

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.

Intron length range Min 1000 Max 10000

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 Add organism

Enter an organism name (or organism group name such as enterobacteriaceae, rodents), taxonomy id or select from the suggestion list as you type.

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 amplicon 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

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

+ Advanced parameters

Primer-BLAST » JOB ID:PTfilVG0XBx7IkYnS0diFTFccyccT2g6HQ

Primer-BLAST Results

Input PCR template none

Specificity of primers Target templates were found in selected database: Nucleotide collection (nt) (Organism limited to Scomberomorus)

Other reports ▸Search Summary

— Detailed primer reports

Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GCTAAGAGGGCCGGTAAAAC	20	58.62	55.00	4.00	1.00
Reverse primer	GTGCACCTTCCGGTACACTT	20	60.25	55.00	6.00	0.00

Products on target templates

>KY228987.1 Scomberomorus niphonius mitochondrion, complete genome

```
Reverse primer  1     GTGCACCTTCCGGTACACTT  20
Template        1013  ....................  994
```

>KX925517.1 Scomberomorus sierra mitochondrion, complete genome

```
product length = 725
Forward primer  1    GCTAAGAGGGCCGGTAAAAC  20
Template        289  ....................  308

Reverse primer  1     GTGCACCTTCCGGTACACTT  20
Template        1013  ....................  994
```

>KY091265.1 Scomberomorus concolor mitochondrion, complete genome

```
product length = 725
Forward primer  1    GCTAAGAGGGCCGGTAAAAC  20
Template        289  ....................  308

Reverse primer  1     GTGCACCTTCCGGTACACTT  20
Template        1013  ....................  994
```

>JX559746.1 Scomberomorus munroi x Scomberomorus semifasciatus strain Grey-SsCRC0703 mitochondrion, complete genome

```
product length = 724
Forward primer  1     GCTAAGAGGGCCGGTAAAAC  20
Template        2422  ....................  2441
```

Hasil pencarian BLAST menunjukkan primer yang kita rancang memiliki kesamaan 100% dengan sekuen *Scomberomorus*

S

Untuk mengetahui primer hasil disain spesifik atau tidak adalah dengan cara melihat hasil pencarian BLAST.

T

Jika primer memiliki kesamaan dengan DNA organisme lain atau bahkan sama, berarti primer tidak spesifik.

B

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:

O

Sekuen DNA tersebut berasal dari organisme lain yang secara praktiknya tidak mungkin ada bersama-sama dengan organisme target (dalam contoh ini virus Corona) ketika mengambil sampel untuk ekstraksi RNA. Misalnya *Oryza sativa* (tanaman padi), atau *Ascaris* (cacing gelang), yang sepertinya tidak mungkin ada bersama virus Corona.

S

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.

J

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.

L

Sekuen primer tersebut tidak benar-benar match 100%, terutama jika 5 basa terakhirnya tidak match (terhadap DNA organisme lain atau fragmen dari DNA tsb).

Parameter untuk Masing-Masing Primer

08 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

07 Repeats

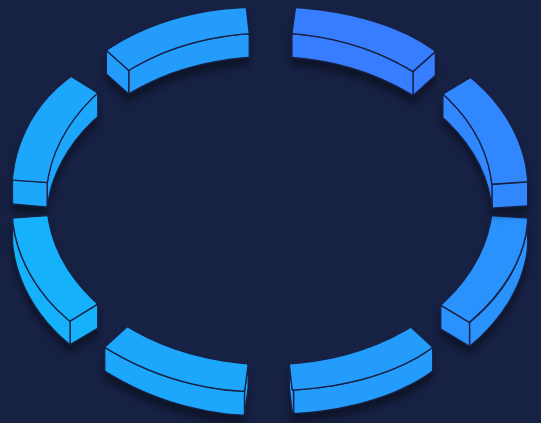
Repeat adalah suatu di-nukleotida yang terjadi berulang-ulang secara berurutan dan harus dihindari karena mereka dapat menyebabkan mispriming. Contohnya: ATATATAT. Jumlah repeat maksimum yang dapat ditoleransi adalah 4 di-nukleotida

01 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.

06 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



02 Suhu Leleh Primer

Hasil terbaik biasanya diperoleh jika primer memiliki Tm 52-58 °C. Primer dengan nilai Tm di atas 65 °C memiliki kecenderungan untuk terjadinya annealing sekunder. Nilai Tm bisa diindikasikan dari *GC content* dan dapat dihitung secara akurat menggunakan rumus-rumus tertentu

05 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

03 Suhu Annealing Primer (Ta)

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

04 GC Content

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

Beberapa jenis struktur sekunder primer:

Hairpins

Hairpins terbentuk akibat interaksi intramolekuler primer sehingga membentuk semacam lipatan

01

02

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

Self Dimer

Cross Dimer

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

03

Parameter untuk Pasangan Primer

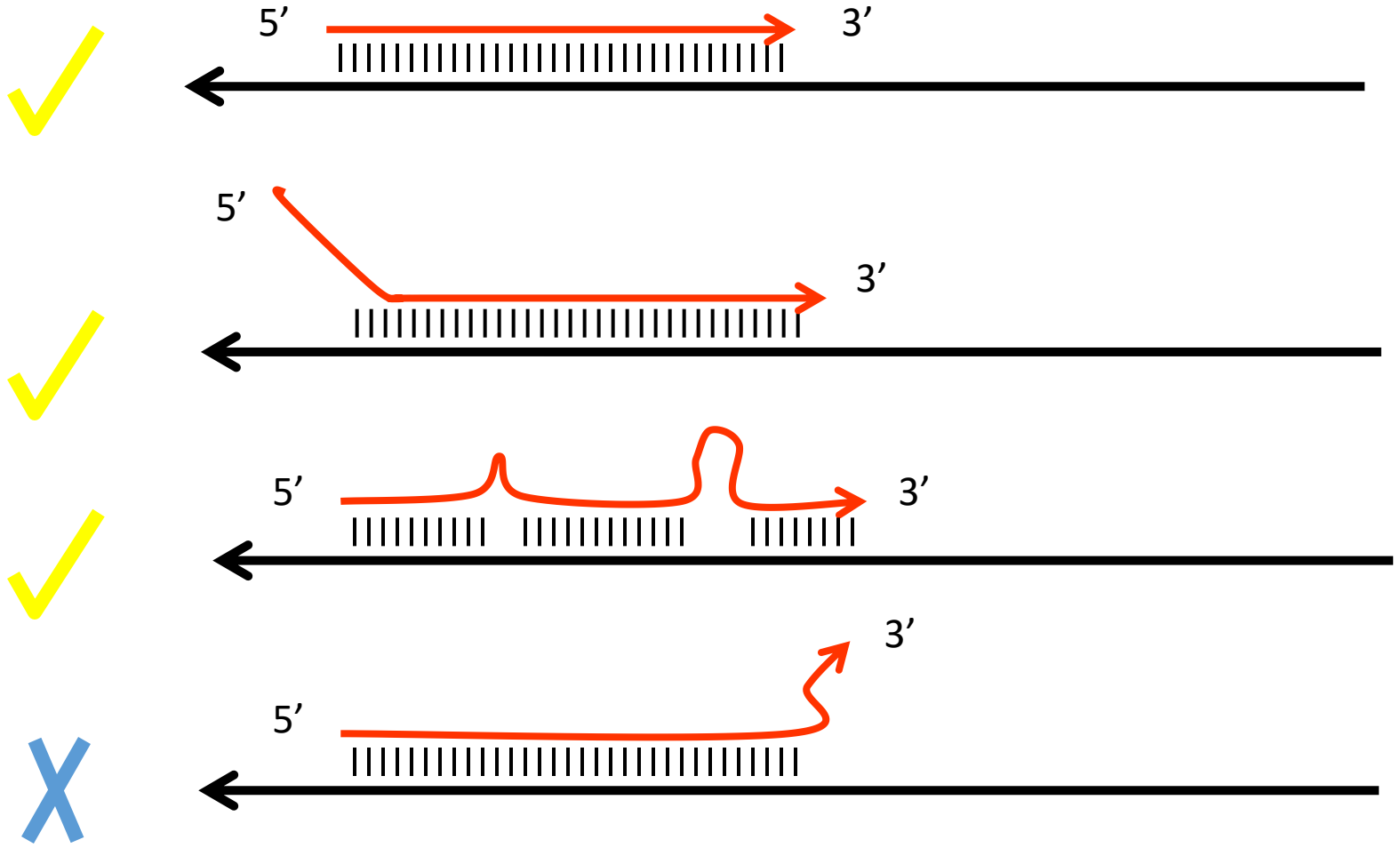
Panjang amplikon

Panjang amplikon (produk PCR) ditentukan oleh tujuan eksperimen itu sendiri. Jika tahu posisi primer pada template, maka:
Panjang produk = (Posisi primer antisense - posisi primer sense) + 1

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?



TERIMA KASIH