Desenho de Primers

Protocolo



Plataforma NCBI*

Na plataforma NCBI, você pode submeter dados ou manuscritos para as bases de dado da NCBI, baixar dados para seu computador, analisar uma ampla variedade de ferramentas de análise de dados que permitem aos usuários manipular, alinhar, visualizar e avaliar dados biológicos, etc. O tutorial a seguir tem como objetivo mostrar e detalhar passo a passo como é realizado o desenho de sequências de oligonucleotídeos (primers) para PCR especificas utilizando as ferramentas do NCBL



Selecione a opção "Gene" em "All Databases" na página inicial do NCBI; na barra à direita procure o gene de interesse (Atf6 na imagem demonstrativa); e clique em "search"

An official website of the United States government Here's how you know



National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information

	Gene Atf6			
	All Databases	A		
	Assembly			
NCBI Home	BioCollections			
Resource List (A-Z)	BioSample	nter for Biotechnology	y Information advances science ar	nd health by providing
All Resources	ClinVar	enomic information.		
Chemicals & Bioassays	Conserved Domains	I <u>Mission</u> <u>Organiz</u>	ation <u>NCBI News & Blog</u>	
Data & Software	dbVar			
DNA & RNA	Gene	Ibmit	Download	Lea
Domains & Structures	Genome GEO DataSets	r manuscripts	Transfer NCBI data to your	Find help docum
Genes & Expression	GEO Profiles	bases	computer	class or watch a
Genetics & Medicine	GTR HomoloGene			
Genomes & Maps	Identical Protein Groups			
Homology	MedGen MeSH			
Literature	NLM Catalog	•		
Proteins				
Sequence Analysis		levelop	Analyze	Pasa
Taxonomy				

	Log in
	Search
	Popular Resources
access to	PubMed
	Bookshelf
	PubMed Central
	BLAST
arn	Nucleotide
arri	Genome
i tutorial	SNP
	Gene
	Protein
	PubChem
	NCBI News & Blog
arch	New dbGaP Subject Sample Telemetry Report Now Available

27 Apr 2023



Selecione o gene correspondente à sua espécie de estudo (homo sapiens na imagem demonstrativa)

NIH National Cent	I Library of Medicine ter for Biotechnology Information	Log in	
Gene	Atf6 Create RSS Save search Advanced	Search Help	R
Gene sources Genomic Categories Alternatively spliced	Tabular - 20 per page - Sort by Relevance - Send to:	Filters: <u>Manage Filters</u> Results by taxon	
Annotated genes Non-coding Protein-coding Sequence content CCDS Ensembl RefSeq RefSeqGene	GENEWas this helpful?Image: Comparison of actor ac	Top Organisms [Tree] Homo sapiens (168) Mus musculus (47) Rattus norvegicus (15) Drosophila melanogaster (13) Caenorhabditis elegans (7) All other taxa (1035) More	
Status clear ✓ Current Clear all Show additional filters Show additional filters	RefSeq transcripts (10) RefSeq proteins (10) RefSeqGene (1) PubMed (221) Orthologs Genome Data Viewer BLAST Download	Find related data Database: Select ✓ Find items	
	RefSeq Sequences		

A página vai gerar informações gerais sobre seu gene, gráficos, artigos relacionados ao gene etc. Clique em "NCBI Reference sequences (RefSeq)" à direita da tela (como mostrado na imagem abaixo) para ser direcionado ao final da página.

Full Re

ATF6

Gene II

🖹 SI

eport 🚽		Send to: -	Hide sidebar >>
activating tra	nscription factor 6 [<i>Homo sapiens</i> (human)]	L Download Datasets	Table of contents Summary
D: 22926, updated on	4-Apr-2023		Genomic context
ummary		2	Genomic regions, transcripts, and products
Official Symbol Official Full Name Primary source See related Gene type RefSeq status Organism Lineage	ATF6 provided by HGNC activating transcription factor 6 provided by HGNC HGNC:HGNC:791 Ensembl:ENSG00000118217 MIM:605537; AllianceGenome:HGNC:791 protein coding REVIEWED Homo sapiens Eukarvota: Metazoa: Chordata: Craniata: Vertebrata: Euteleostomi: Mammalia: Eutheria: Euarchontoc	alires: Primates:	Expression Bibliography Phenotypes Variation HIV-1 interactions Pathways from PubChem
Also known as Summary	Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo ACHM7; ATF6A This gene encodes a transcription factor that activates target genes for the unfolded protein response endoplasmic reticulum (ER) stress. Although it is a transcription factor, this protein is unusual in that it transmembrane protein that is embedded in the ER. It functions as an ER stress sensor/transducer, a induced proteolysis, it functions as a nuclear transcription factor via a cis-acting ER stress response e	(UPR) during is synthesized as a nd following ER stress- lement (ERSE) that is	Interactions General gene information Markers, Clone Names, Homology, Gene Ontology General protein information NCBI Reference Sequences (RefSeq)





Na opção "mRNA and Protein(s)" encontrará dois links, um para a plataforma NM – que é específica para RNA - e um para a plataforma NP específica para proteínas. Clique em NM.

NCBI Reference Sequences (RefSeq)

NEW Try the new <u>Transcript table</u>

□ RefSeqs maintained independently of Annotated Genomes

These reference sequences exist independently of genome builds. Explain

Genomic

1. NG_029773.1 RefSeqGene

Range5077..202827DownloadGenBank, FASTA, Sequence Viewer (Graphics)

mRNA and Protein(s)

1. <u>NM_001410890.1</u> → <u>NP_001397819.1</u> cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-6 alpha isoform 2

Status: REVIEWED

Source sequence(s)	AL359541, AL391825, AL45099
Consensus CDS	CCDS91093.1
UniProtKB/TrEMBL	A0A7P0TAF2





Nota: O número de acesso da sequência de referência de mRNA que iremos utilizar (no caso do exemplo NM_001410890.1) na plataforma Primer-BLAST pode ser copiado e colado diretamente na plataforma em https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/ em "Enter accession, gi, or FASTA sequence". Porém, como realizamos a pesquisa do gene na plataforma NCBI, podemos adquirir os primers diretamente.

A página que abrir terá todas as informações referentes aos nucleotídeos, sequencias gênicas, quantidades de pares de bases (pb), onde foi publicado, aparecerá a sequência nucleotídica de determinado gene, genôma, DNA, primer etc. Com os dados apresentados, você poderá utilizá-los para diversos fins, como desenhos de primers, identificação de sequências genômicas de interesse, produtos gênicos e especificidade de primers, por meio de softwares line contidos no próprio site.



Para desenho e criação de primers de interesse, será utilizado um processo simples, mediado pela opção "Pick Primers" disponível na lateral direita da página, como mostrado na imagem abaixo.

GenBank -

Homo sapiens activating transcription factor 6 (ATF6), transcript variant

NCBI Reference Sequence: NM_001410890.1

FASTA Graphics

<u>Go to:</u> 🕑

LOCUS	NM_001410890	7467 bp	mRNA	linear	PRI 24-MAR-2023
DEFINITION	Homo sapiens activating	transcripti	on facto	r 6 (ATF6	5), transcript
	variant 2, mRNA.				
ACCESSION	NM_001410890 XM_00671122	24			
VERSION	NM_001410890.1				
KEYWORDS	RefSeq.				
SOURCE	Homo sapiens (human)				



Send to: -	Change region shown	•
t 2, mRNA	Customize view	•
	Analyze this sequence	
	Highlight Sequence Features Find in this Sequence Show in Genome Data Viewer	



Copie o código que aparecer (NM_001410890.1 no exemplo em questão)

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	
PCR Template Enter accession, gi, or FASTA sequence (A ref NM_001410890.1 Or, upload FASTA file Escolher	Retrieve recent results Publication Tips for finding specific primers seq record is preferred) ② Clear Range ③ Clear From To Forward primer Reverse primer Reverse primer	Save search parameters Reset page



Ainda nessa página confira e mude alguns parâmetros de busca

- em "PCR product size", em "Primer melting temperatures (Tm)" e em "Exon junction span" selecione os valores/opções apresentados nas imagens abaixo e dentro de "+Advanced Parameters" vá em "Primers Parameters" e digite os valores apresentados na imagem abaixo - conferir se na aba organismo o código é referente ao seu modelo

Primer Parameters			Primer Paramet
Use my own forward primer (5'->3' on plus strand)		Clear	
Use my own reverse primer (5'- >3' on minus strand)	Min Mox	Clear	PCR Product Tm
PCR product size # of primers to return	50 150 10 10		Primer Size
Primer melting temperatures (T _m)	Min Opt Max 58.0 60.0 62.	Max T _m difference	Primer GC content (%
	Exon/intron selection	A refseg mRNA sequence as PC	R template input is required for
	Exon junction span	Primer must span an exon-	exon junction 🖌 😯
	Exon junction match	Min 5' matchMin 3' match74Minimal and maximal number of	Max 3' match 8 f bases that must anneal to exor
	Intron inclusion	Primer pair must be separat	ed by at least one intron on the
	Intron length range	Min Max 1000 10000	3







Algumas considerações:

- Abaixo de "PCR product size", em "# of primers to return", pode-se ainda escolher a quantidade de primers que se deseja encontrar.
 - Em "Primer melting temperatures (Tm)" defini-se a temperatura ideal para anelamento, mas geralmente permanece a temperatura pré-configurada pelo aplicativo, sendo que a temperatura do primer 1 e primer 2 (reverso), devem ser análogos, ou com diferença máxima de 3°C.
- O ideal é que a região do primer escolhido (delimitado em "Exon Junction Span") amplifique exons de regiões diferentes para evitar erro de amplificação (como amplificação de DNA contaminado) -> ao selecionar "Primer must span an exon-exon junction" o programa é direcionado a retornar pelo menos um primer (dentro de um determinado par de primers) que estende uma junção exon-exon; isso é útil para limitar a amplificação apenas para mRNA; você também pode excluir esses primers se quiser amplificar o mRNA, bem como o DNA genômico correspondente.



Ao final da mesma página clique em "Get Primers" e aguarde a página gerar os dados (pode demorar um pouco). Assim que os resultados aparecerem, selecione os genes de acordo com a sua eficiência, normalmente o primeiro é o melhor, mas é bom conferir o parâmetro "Self 3' complementary" (o ideal é que esteja entre 2-3), Tm (variação máxima de 3°) e CG% (desejável de 40-60%) dos demais. Selecione o gene que for conveniente e copie as sequências "Forward primer" e "Reverse primer" para montar sua planilha/documento. É importante que todos as informações estejam registradas e conferidas, pois esses dados serão requisitados pela revista no material suplementar.

Get Primers



Ferramenta BLAST - Basic Local Alignment Search Tool

- A ferramenta BLAST descobre regiões de similaridade local entre as sequências. O programa compara nucleotídeos ou sequências
 - de proteínas com o banco de dados de sequências e calcula a
 - significância estatísticas das correspondências. A ferramenta
 - pode ser usada para inferir relações funcionais e evolucionários
 - entre sequências, bem como ajudar a identificar membros de famílias genéticas.
 - Aqui iremos utilizar o BLAST apenas para para teste in sílico de
 - especificidade e comparar a sequência de nucleotídeo (primer)
- desenhada anteriormente com o banco de dados, no qual iremos
 - obter a função, espécies associadas etc.

similaridade local entre eotídeos ou sequências equências e calcula a lências. A ferramenta ionais e evolucionários entificar membros de

para teste in sílico de e nucleotídeo (primer) e dados, no qual iremos ciadas etc.



Na página inicial do NCBI clique em BLAST na lateral direita

An official website of the United States government Here's how you know V

National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information

All Databases 🗸

NCBI Home

All Resources

Data & Software

Resource List (A-Z)

Chemicals & Bioassays

Welcome to NCBI

The National Center for Biotechnology Information advances science and health by providin biomedical and genomic information.

About the NCBI | Mission | Organization | NCBI News & Blog

DNA & RNA	Submit	Download	Lea
Domains & Structures	Deposit data or manuscripts	Transfer NCBI data to your	Find help docume
Genes & Expression	into NCBI databases	computer	class or watch a
Genetics & Medicine			
Genomes & Maps			
Homology			
Literature			
Proteins			
Sequence Analysis	Develop	Analyze	Pasa
Taxonomy			

	Log in
	Search
ng access to	Popular Resources PubMed Bookshelf
earn ments, attend a a tutorial	BLAST Nucleotide Genome SNP Gene Protein PubChem
earch	NCBI News & Blog NCBI's Remap Tool to Retire in November 2023 04 May 2023



Na página da ferramenta clique no quadro "Nucleotide BLAST"

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.

Fri, 28 Apr 2023





Na página que abrir insira a sequência de nucleotídeos do primer no campo "Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s)" e em "Choose Search Set" selecione "RefSeq Select RNA sequences (refseq_select)".

LAST [®] » blastn suite		Home	Recent Results	Saved Strategies	Help
blastn blastp blastx tblastn tb	Standard Nucleotide BLAST				
BLAST	ograms search nucleotide databases using a nucleotide query. mo	ore		Reset page	
Enter Query Sequence				Bookmark	
Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) 😯 c	Query subrange 😯				
	From				
	То				
Or, upload file Escolher arquivo Nenhum arquivo escol					
Job Title					
Enter a descriptive title for your BLAST search					
Align two or more sequences ?					
Choose Search Set					
Database Standard databases (nr etc.): O rRNA	databases 🔘 Genomic + transcript databases 🔘 Betaco	oronavirus			÷
New O Experimental databases	experimental taxonomic nt databases more info see What are taxonomic nt databases?	J			Eedba
RefSeq Select RNA sequences (refseq_s	t) 🗸 🤇				

Selecione o programa (especificidade da sequência) BLASTN, que otimiza sequências pouco semelhantes, assim a dissimilaridade é maior, podendo ter apenas poucas semelhanças entre as bases do primer e a sequência do banco de dados, clique em BLAST e aguarde a página carregar os resultados.





Todos os dados que apresentaram relação com o primer produzido aparecerão de forma descritiva na aba "Descriptions". Na página será apresentado dados referentes a quais sequencias ou espécies o primer está relacionado. Do lado direito, é mostrado dados relativos à similaridade dos primers com sequencias gênicas de outros dados, chamado de "Query cover", sendo 100% muito similar; "Per. Ident", refere-se a quantas bases são idênticas (em referência aos primers testados); e o ID "Accession" do determinado dado para acesso.

Descriptions	Graphic Summary	Alignments	Taxonomy								
Sequences producing significant alignments Download × Select columns × Show 100 × ?					00 🗸 😮						
Select all 0 sequences selected MSA Viewer											
	Description		Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession	
Homo sapiens interleukin 6 (IL6), transcript variant 1, mRNA				<u>Homo sapiens</u>	37.4	74.7	100%	0.018	100.00%	1127	<u>NM_000600.5</u>

Na aba "Alignments" conseguimos ver isso de forma mais visual.

Descriptions	Graphic Summa	ary Alignments	Taxonomy				
Alignment view	Pairwise		✓ C	DS feature 🛛 Res			
1 sequences select	ed 😮						
La Download	d ✓ <u>GenBank</u> G	Fraphics Sort by: E	alue	~			
Homo sap Sequence ID Range 1: 30	oiens interleukin : <u>NM_000600.5</u> Le 9 to 328 <u>GenBank</u>	6 (IL6), transcript ength: 1127 Number o Graphics	variant 1, mRNA f Matches: 2	A Next Match 🔺 Previous I			
Score 37.4 bits(40	Expect 0) 0.018	Identities 20/20(100%)	Gaps 0/20(0%)	Strand Plus/Plus			
Query 1 AGAGGCACTGGCAGAAAACA 20 							
Range 2: 38	4 to 403 GenBank	<u>Graphics</u>	▼ <u>Next M</u>	latch 🔺 Previous Match			
Score 37.4 bits(40	Expect 0.018	Identities 20/20(100%)	Gaps 0/20(0%)	Strand Plus/Minus			



			_
store default	Download	\sim	
▼ <u>Next</u> ▲	Previous < <u>Descriptions</u>		
_			
Match	Related Information		
	<u>Gene</u> - associated gene		
	details		
	<u> PubChem BioAssay</u> -		
	bioactivity screening		
	<u>Genome Data Viewer</u> -		
	aligned genomic context		
			×
n 🛕 <u>First Matel</u>	<u>n</u>		lba
			Feed

Nota: é possível alinhar duas ou mais sequências para fazer a pesquisa

Enter Query Sequence	
Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) 😯 Clear	Query subrange 😮
AGAGGCACTGGCAGAAAACATCACCAGGCAAGTCTCCTCA	From
	То
Or, upload file Escolher arquivo Nenhum arquivo escolhido 3	
Job Title	
Enter a descriptive title for your BLAST search 😮	
Align two or more sequences ?	
Enter Subject Sequence	
Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) 😯	Clear Subject subrange 😯
	From
	То
Or, upload file Escolher arquivo Nenhum arquivo escolhido	3



Análise in silico

Após o desenho dos primers, seleção do melhor primer e teste de especificidade, as sequências Forward e Reverse podem ser copiadas para as planilhas das empresas que sintetizam os primers. Uma última verificação é recomendada antes de enviar as sequências de primers para serem sintetizadas. Essa etapa é para verificar se o primer desenhado apresenta dímeros e pode ser realizada in sílico pelo site da ThermoFisher Scientific na plataforma Multiple Primer Analyzer. Disponivel em: https://shorturl.at/emDG5



Ao digitar as sequências dos primers (seguindo o modelo mostrado na imagem abaixo - "seq1 bases") no primeiro quadro os resultados vão aparecer instantaneamente no quadro mais para baixo na página, e atualizarão automaticamente caso mudanças na sequência sejam feitas.

- Tm (°C)*
- CG content (%)
- Length of the primers (nt)
- Number of individual bases (A, T, C and G)
 Primer-dimer estimation**
- Extinction coefficient (I/(mol·cm))

- Molecular weight (g/mol)
- Amount / OD unit (nmol/OD260)
- Mass (µg/OD260)

Type or paste (Ctrl-V) sequence(s) of the primer(s) here in FASTA or two column format. Number of primers: 2

seq1 AGAGGCACTGGCAGAAAACA seg2 TCACCAGGCAAGTCTCCTCA

Results for primer dimer detection. To export the results: select all (Ctrl-A), copy (Ctrl-C) and paste (Ctrl-V).

Self-Dimers:

Cross Primer Dimers:





Ficou com alguma dúvida?

Os alunos do laboratório ficarão felizes em lhe ajudar :)

