

Ensayos

Análisis de iniciadores con herramientas bioinformáticas libres en línea

Recibido: 13-12-2016, Aceptado: 12-07-2017, (Artículo Arbitrado)

Resumen

La PCR es una técnica *in vitro* utilizada para amplificar enzimáticamente una región determinada de ácido desoxirribonucleico (ADN), delimitada por dos fragmentos de secuencias cortas de ADN llamados iniciadores. La PCR es apta para el análisis de expresión génica, evolución molecular, genética de poblaciones, genómica, medicina forense entre otros. Para llevar a cabo la reacción de PCR es necesario utilizar iniciadores. Antes de utilizar los iniciadores, es imprescindible analizar la secuencia de cada uno, previo a la realización de la reacción de PCR en el laboratorio, para así, conseguir experimentos exitosos. Los iniciadores deben cumplir ciertos requisitos que son necesarios para ser considerados como óptimos, como: Longitud, especificidad, temperatura de fusión y temperatura de alineamiento. En este trabajo, presentamos una revisión para el análisis de secuencias de iniciadores de manera sencilla, por medio de herramientas bioinformáticas disponibles en línea. Estos tipos de análisis son altamente específicos y es necesario hacerlos antes de realizar estudios en el laboratorio.

Abstract

PCR is an *in vitro* technique used to enzymatically amplify a specific region of deoxyribonucleic acid (DNA), delimited by two fragments of short DNA sequences called primers. PCR is suitable for the analysis of gene expression, molecular evolution, population genetics, genomics, forensic medicine, among others. Primers are needed to carry out the PCR. Before being used, it is essential to analyze the sequence of each primer prior to the completion of the PCR reaction in the laboratory to carry out successful experiments. The primers must meet certain requirements to be considered optimal, such as length, specificity, melting temperature and alignment temperature. In this paper, we present a review for the analysis of primer sequences in a simple way, using bioinformatic tools available online. This type of analyzes are very specific and need to be carried out prior to conducting studies in the laboratory.

Résumé

La PCR est une technique *in vitro* utilisée pour amplifier de manière enzymatique une région déterminée de l'acide désoxyribonucléique (ADN) et délimitée par deux fragments de séquences courtes d'ADN appelées sondes. La PCR est appropriée entre autres pour l'analyse de l'expression de gènes, l'évolution moléculaire, la génétique de population, la recherche génomique et la médecine légale. Pour mener à son terme la réaction de PCR, l'utilisation de sondes est nécessaire. Avant d'utiliser ces dernières, il est impératif d'analyser la séquence de chacune antérieurement à la réalisation de la réaction de PCR dans le laboratoire pour garantir la réussite des expériences. Les sondes doivent remplir certains prérequis nécessaires à l'optimisation du procédé tels que la longueur, la spécificité, la température de fusion et celle d'alignement. A travers ce travail, nous présentons une révision de l'analyse de séquences des sondes de manière simple, par le biais d'outils bio-informatiques disponibles en ligne. Ces types d'analyses sont extrêmement spécifiques et il est indispensable de les mener à bien avant de réaliser des études en laboratoire.

C. Hernández-Flores^{1*}, R. Valdez-Mijares^{1**}
*ceci1210@gmail.com, **rvaldezmi@gmail.com

Palabras clave: Análisis de iniciadores, Iniciadores, PCR, RT-PCR, Reacción en cadena de la polimerasa. **Keywords:** Primer analysis, Primers, PCR, RT-PCR, Polymerase chain reaction. **Mots clés :** Analyse de sondes, Sondes, PCR, RT-PCR, Réaction en chaîne de la polymérase.

Introducción

La idea de la reacción en cadena de la polimerasa, PCR (por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction) fue desarrollada en los años 80 por Kary Mullis. Con esta técnica, revolucionó la biología molecular y por ello obtuvo el premio Nobel (Mullis. K. 2017). La PCR es una técnica *in vitro*, utilizada para amplificar enzimáticamente una región específica de ácido desoxirribonucleico (ADN) (Mullis. K. y Faloona F.A. 1987). La región de ADN de interés se limita por dos iniciadores, que son fragmentos cortos

¹ Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra

de ADN. Esta reacción puede iniciar a partir de una sola cadena de ADN, que se amplifica hasta obtener millones de copias del original en unas pocas horas. Para mejorar la especificidad de la reacción, se deben seleccionar cuidadosamente los iniciadores y de esta manera disminuir el riesgo de formación de dímeros y de productos inespecíficos que alterarían el resultado.

La PCR es útil para diversos tipos de análisis como: análisis de expresión génica, molecular, genética de poblaciones, genómica, medicina forense, detección de patógenos y análisis de mutaciones, entre otros.

Existen varios tipos de PCR desarrollados hasta ahora, como: PCR punto final, RT-PCR, PCR multiplex y PCR en tiempo real. Es indispensable analizar la secuencia de cada iniciador previo a la realización de la reacción de PCR en el laboratorio, para lograr experimentos exitosos.

En este trabajo, mostramos una manera sencilla de analizar secuencias de iniciadores, empleando herramientas bioinformáticas disponibles en línea.

2. Tipos de PCR

2.1 PCR punto final o PCR convencional

La PCR punto final (PCR-pf), es una reacción que se lleva a cabo *in vitro*. Para realizar la reacción de PCR-pf, se requiere un par de iniciadores que delimiten la secuencia de ADN a amplificar. La secuencia delimitada se amplifica millones de veces a partir de la copia del original. Los iniciadores utilizados para esta PCR se analizan con herramientas bioinformáticas, estas herramientas bioinformáticas nos arrojan pares de iniciadores con sus ciertas características, se escogen los que cumplan con las características óptimas. Las características que deben cumplir los iniciadores, se mencionan en una sección específica más adelante (Mullis. K. y Faloona F.A. 1987).

2.2 RT-PCR

Es un tipo de PCR en el que se emplea ácido ribonucleico (ARN) como secuencia molde en lugar de ADN. La enzima transcriptasa reversa realiza la síntesis de ARN a ADN complementario (ADNc). En esta primera reacción, se pueden utilizar como iniciadores de secuencia aleatoria que se unen al azar a cualquier región del ARN molde, iniciador poli T o secuencias específicas, esto permite llevar

a cabo la reacción de ADNc a partir del ARN. Una vez que se obtiene el ADNc, se continua la reacción de PCR como en la PCR-pf. En este tipo de PCR, los iniciadores se analizan de la misma forma que para PCR-pf.

2.3 PCR múltiplex

En este tipo de PCR, se amplifica más de una secuencia de interés en una misma reacción. Se emplean múltiples pares de iniciadores (hasta 8) en un solo tubo de reacción, con el fin de amplificar simultáneamente diferentes secuencias de interés. Los amplificadores se ven como múltiples bandas en un gel de agarosa. Requiere una cuidadosa optimización. Los iniciadores para este tipo de PCR, se analizan de la misma manera que para la PCR-pf, además las temperaturas de alineamiento deben ser semejantes.

2.4 PCR anidada o nested

Este tipo de PCR es muy sensible. Para que se lleve a cabo la reacción se requieren cuatro iniciadores. En la primera reacción, se amplifica ADN con un par de iniciadores externos a la región de interés. El amplificado de este primer PCR, se emplea como molde para realizar una segunda reacción. En la segunda reacción, se utiliza otro par de iniciadores, que son iniciadores internos a la región previamente amplificada durante la primera reacción. Al momento de analizar o diseñar iniciadores para este tipo de PCR, se deben tomar en cuenta las regiones a amplificar, un par de iniciadores que amplifique la región externa, además de cumplir con las características óptimas de un iniciador y el segundo par de iniciadores que delimite la región de interés dentro del amplificado obtenido con los iniciadores externos.

2.5 PCR en tiempo real

Este tipo de PCR a diferencia del PCR convencional permite la cuantificación de los productos de la amplificación. La PCR en tiempo real detecta el aumento de fluorescencia durante la reacción, que se relaciona directamente con el número de copias que están siendo amplificadas. A menor número de copias presentes inicialmente, menor el número de ciclos necesarios para detectar fluorescencia. Durante la reacción, se puede visualizar la cinética de cada reacción en tiempo real permitiendo una cuantificación sensible y específica.

Se utilizan principalmente dos tipos de fluorocromos. Se emplean fluoróforos que se unen a DNA de doble cadena, como SYBR Green o Eva Green, éstos se unen inespecíficamente al DNA de doble cadena y producen fluorescencia. Estos fluorocromos no son específicos ya que se unen a toda molécula de ADN de doble cadena, incluyendo los dímeros de primer. Otra alternativa, es el uso de sondas específicas fluorescentes, como las sondas de hidrólisis TaqMan o UPLs. Esta técnica permite la cuantificación específica del ADN de interés. El uso de SYBR Green o Eva Green implica un diseño muy cuidadoso de los iniciadores, de forma que el amplificado contenga secuencias de diferentes exones. Para el análisis de los iniciadores se realiza como para la PCR-pf.

3. Reacción de PCR-pf

La reacción de PCR-pf se lleva a cabo de la siguiente manera (Figura 1). En el primer ciclo se sintetizan los primeros fragmentos a partir de ADN a amplificar (Figura 1A). Se desnaturaliza la doble cadena de ADN entre 94-98°C (Figura 1B), posteriormente se lleva a cabo el alineamiento de los iniciadores entre 40-60°C (Figura 1C), seguido de la unión de la ADNpolimerasa a los iniciadores y la replicación entre 70-72°C (Figura 1D). Estos fragmentos de ADN no tienen el tamaño esperado (delimitado por los iniciadores), ya que la enzima copia a partir de cada iniciador y hasta el final de la cadena de ADN en dirección 5´-3´ (Figura 1E). En el segundo ciclo se repite la reacción (Figura 1F-1H), los iniciadores, además de unirse al ADN del cual se parte, también se unirán a los fragmentos sintetizados del primer ciclo, por lo que en este segundo ciclo la enzima sintetiza dos fragmentos largos (ADN molde) y dos fragmentos del tamaño de ADN delimitado entre los iniciadores (Figura 1H). Así, con cada ciclo aumenta el número de fragmentos del tamaño deseado. Como cada fragmento nuevo sintetizado sirve como molde para sintetizar otros, en el siguiente ciclo el número de copias aumenta en forma exponencial (Figura 1I-1L). A partir de una sola molécula de ADN en el ciclo uno, se producen millones de fragmentos de ADN de interés al término de la reacción y solo algunos fragmentos tendrán un tamaño mayor, dos por cada ciclo, esta cantidad no es detectable al analizar el producto (Figura 1M), el

número de ciclos comúnmente usados es entre 30 a 40 (Mullis y Faloona 1987; ADNIc 2017; Somma y Querci 2007; Li-Yeh, Yu-Huei, Cheng-Hong 2013; Evans 2009; Bermingham y Luetlich 2003). Los rangos de temperaturas durante la reacción deben optimizarse para cada reacción específica, así como el número de ciclos.

4. Iniciadores

Para que se lleve a cabo exitosamente la PCR es primordial que los iniciadores sean específicos. Los iniciadores como ya lo mencionamos antes, actúan como punto de partida y unión para la ADN polimerasa durante la síntesis de ADN del fragmento a amplificar. Cada iniciador es complementario a una de las cadenas del ADN en estudio, uno de los iniciadores debe tener la misma secuencia que se encuentra en una de las cadenas del ADN (iniciador sentido) y el otro deberá tener la secuencia complementaria que estará al final del fragmento que se quiere amplificar (iniciador antisentido).

Previo a la realización de la reacción es indispensable analizar la secuencia de cada iniciador. Este análisis se lleva a cabo con herramientas bioinformáticas diseñadas para este fin. Antes de realizar el análisis de los iniciadores sentido y antisentido, es indispensable conocer los requisitos que dichos iniciadores deben cumplir para ser considerados como óptimos (ADNIc 2017; Li-Yeh et al., 2013; Dieffenbach, Lowe, Dveksler 1993; Ye, Coulouris, Zaretskaya, Cutcutache, Rozen, Madden 2012) y así poder utilizarlos para la reacción de PCR.

4.1 Características de iniciadores

4.1.1 Longitud del iniciador

Cada iniciador sentido y antisentido debe contar con una longitud de entre 18-24 bases, ya que la cantidad de bases influye en la especificidad de la secuencia a amplificar, siempre y cuando la temperatura de alineamiento sea la óptima. La longitud del iniciador influye en la eficiencia del alineamiento, cuanto más largo sea el iniciador, menos eficaz será la alineación. Al unirse una menor cantidad de iniciador a la secuencia de ADN molde en cada ciclo, se tiene como consecuencia la disminución de la cantidad del producto amplificado de forma significativa. Sin embargo, los iniciadores no deben

ser demasiado cortos, ya que pueden llegar a unirse de forma inespecífica. Esto tiene como consecuencia, amplificados de productos no deseados y una disminución del producto de interés.

4.1.2 Especificidad

Los iniciadores, deben ser específicos para delimitar la región que se quiere amplificar. La especificidad del iniciador depende al menos en parte de su longitud. Los iniciadores deben elegirse de forma que tengan una secuencia única dentro del ADN a amplificar. Como la ADN-polimerasa puede activarse a diferentes temperaturas, la extensión del iniciador se produce a una temperatura inferior a la de alineamiento. Si la temperatura es demasiado baja, puede darse un alineamiento inespecífico. Los mejores resultados se obtienen con una temperatura de fusión de entre 55 a 72°C, que corresponde a una longitud del iniciador de entre 18 y 24 bases.

4.1.3 Temperatura de fusión (Tf)

La Tf es la temperatura a la que la mitad de las hebras de ADN se encuentran como banda simple y la mitad como banda doble. Es deseable que los iniciadores tengan Tf similares o muy próximas, con 5 °C de diferencia como máximo. Si los iniciadores no tienen Tf semejantes, la amplificación es menos eficaz e incluso puede no llevarse a cabo. El iniciador con la Tf mayor, funciona mal a temperaturas más bajas y el iniciador con la Tf más baja, no se une a temperaturas más elevadas. Para evitar estos problemas durante la reacción, se analizan los iniciadores por medio de herramienta bioinformáticas que indican la Tf de cada uno de ellos. Otra forma de conocer la Tf es calculándola por medio de la fórmula $T_f = 4(G+C) + 2(A+T)$, esta fórmula da una buena aproximación del valor de Tf de cada iniciador y es válida para los iniciadores de entre 18 y 24 bases. Existen diversos sitios en internet que son útiles para realizar este cálculo. A continuación, indicamos tres direcciones de páginas Web donde se puede calcular la Tf de iniciadores, así como otros parámetros útiles para la reacción.

<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>
<http://www6.appliedbiosystems.com/support/techtools/calc/>
<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>

4.1.4 Temperatura de alineamiento

Los iniciadores, deben contar con una temperatura de alineamiento de al menos 50 °C. La relación entre temperatura de alineamiento y temperatura de fusión es:

La temperatura de alineamiento debe ser inferior en 5 °C a la temperatura de fusión ($T_{\text{alineamiento}} = T_{\text{iniciador}} - 5 \text{ °C}$).

Esta temperatura sirve de referencia, ya que es posible que la temperatura de alineamiento determinada empleando esta regla no sea la adecuada y se tengan que efectuar varios experimentos para determinar la temperatura óptima de la reacción.

La manera más sencilla de calcular la temperatura de alineamiento, es con un termociclador de gradiente, donde se prueba en una sola corrida varias temperaturas y así determinar la temperatura óptima de una reacción en particular. Una $T_{\text{alineamiento}}$ alta, evita la unión de los iniciadores y una $T_{\text{alineamiento}}$ baja, favorece la unión inespecífica de los iniciadores. Ésto tiene como consecuencia, la obtención de tamaños diversos de amplificados, que al final del proceso se observan en el gel de agarosa como bandas inespecíficas.

4.1.5 Secuencias complementarias del iniciador

Se deben evitar regiones con capacidad para formar estructuras secundarias internas, como la formación de dímeros, complementariedad entre ellos o formación de horquillas. Es indispensable que los iniciadores no presenten secuencias con homología interna de más de 3 pares de bases. Si el iniciador tiene zonas de auto homología, se pueden formar estructuras en horquillas que interfieren con el alineamiento al ADN molde. Una homología parcial en las regiones centrales de los iniciadores también puede interferir con la alineación. Si la homología se produce en el extremo 3' de cualquiera de los iniciadores, pueden formar dímeros de iniciadores, que en general impiden la formación del producto deseado por un mecanismo de competencia. (Figura 2)

4.1.6 Contenido de G/C y tramos de polipirimidina (T, C) o polipurina (A, G)

El contenido de G:C (Guanina:Citocina) debe estar en el rango de entre 40 y 55%. Entre más número de G y C tenga el iniciador, mayor será la temperatura de fusión

(Tf). Por otro lado, también se deben evitar secuencias de poli X (X= G o C o T o A), la presencia de secuencias de poli G o poli C favorecen la hibridación inespecífica. Las secuencias de poli-A y poli-T pueden reducir la eficacia de la amplificación, así como de los tramos de polipirimidinas (T, C) y polipurinas (A, G). Lo ideal es que los iniciadores tenga una mezcla aleatoria de nucleótidos, un contenido de GC del 50 % y una longitud aproximada de 20 bases. De esta manera, la Tf estará entre 56 – 62 °C.

4.1.7 Secuencia en el extremo 3'

Un punto importante es la inclusión de un residuo de G o C en el extremo 3' de los iniciadores. Extremos 3' con G/C son adecuados debido a que los triples enlaces que forman estas bases favorece la eficacia de la reacción. Además, minimizan la posibilidad de que se abra la doble cadena formada entre el iniciador y el ADN a amplificar.

5. Análisis de iniciadores

Un par de iniciadores que no se analizan adecuadamente pueden llevar a obtener poco producto, productos inespecíficos o incluso ningún producto, debido a una amplificación inespecífica y/o a la formación de dímeros de iniciadores que compiten durante la reacción.

Para realizar el análisis de iniciadores se utilizan herramientas bioinformáticas gratuitas que se encuentran en línea. Con estas herramientas bioinformáticas, podemos contrastar las secuencias de los iniciadores contra bases de datos y así caracterizarlos. Con los resultados obtenidos del análisis, determinamos si los iniciadores analizados son adecuados o no, para realizar la reacción de PCR en el laboratorio.

6. Herramientas bioinformáticas para el análisis de iniciadores

Existen varias herramientas bioinformáticas que se pueden utilizar para analizar los iniciadores. En este documento vamos a comentar dos de las herramientas más utilizadas, *BLAST* y *Primer-BLAST*, estas herramientas no son excluyentes, se complementan para el análisis de los iniciadores (Tabla 1).

6.1 BLAST

La herramienta bioinformática de búsqueda de alineamiento local básico *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*), se encuentra dentro de la página de PubMed, www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed, PubMed fue desarrollado por *NCBI* (*National Center for Biotechnology Information*). Es un motor de búsqueda de acceso libre a la base de datos de *MEDLINE* de citas y resúmenes de artículos de investigación biomédica (Figura 3). Dentro *PubMed*, encontramos la opción *BLAST* y dentro de ésta la opción nucleotide blast (nr: no redundantes) (Figura 4 y Figura 5). Transcribimos la secuencia del iniciador sentido, en el sentido 5' a 3' e iniciamos el análisis (Altschul, Gish, Miller, Myers, Lipman, 1990).

Como ejemplo, se analiza un par de iniciadores para el gen gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*gadph*) de *Ovis aries musimon* (Figura 6A). Se transcribe la secuencia del iniciador sentido, en el sentido 5' a 3', señalamos la opción otros (*Others*) y utilizamos la base de datos de colección de nucleótidos *nr/nt* (*Nucleotide collection nr/nt*). Damos clic en la opción *BLAST* (Figura 7). En este momento, la secuencia se compara contra la base de datos *nr/nt*. Se despliegan los resultados (Figura 8A) con las secuencias que *BLAST* reporta como similares (o idénticas) al iniciador que se analiza. El resultado permite ver la distribución de los alineamientos (Figura 8B). Cada banda, representa una secuencia de la base de datos que resulta ser similar a la secuencia de búsqueda. En el ejemplo, es evidente que para la secuencia que se analizó, *BLAST* encontró varias secuencias similares. Esto significa que en varias especies se presenta una secuencia homóloga al iniciador sentido, esta secuencia puede pertenecer a la misma familia de proteínas que se está analizando, para ver la especificidad de la especie de interés se analizan los valores que arroja el análisis.

La tercera sección, corresponde a las descripciones de los alineamientos (Figura 8C). Ésta es una lista de las secuencias encontradas (ordenadas de acuerdo a su valor *E*), cada uno de los alineamientos es evaluado para determinar su significancia estadística. Los alineamientos resultantes, se llaman pares de alta puntuación *High Score Pairs* o *HSPs* y el valor de *E* ó *e*-valor (*e-value*) de corte, permite definir, qué alineamiento es

conveniente de acuerdo a su significancia estadística, cuanto menor sea el valor de E más significativo es un alineamiento. El valor de E , depende de la base de datos empleada y de la longitud de la secuencia del iniciador. Además, se despliega una serie de datos como la(s) especie(s) con las que coincide la secuencia del iniciador sentido y la referencia de la secuencia. Se busca entre las especies la de interés y se comprueba (Figura 8B) que efectivamente sea el gen de interés. Es importante verificar que la referencia del gen analizado sea la misma que se reportó en el artículo de referencia de la secuencia. Si la secuencia del iniciador sentido fue diseñada, se tendrá que verificar que el número de referencia del iniciador sentido reportado en *PubMed*, coincida con la del iniciador antisentido.

Para el análisis del iniciador antisentido, se toma la secuencia de dicho iniciador, se elabora su secuencia complementaria y posteriormente se transcribe la secuencia complementaria de derecha a izquierda (Figura 6B). Con esta secuencia, se analiza el iniciador antisentido de la misma forma en la que se analizó el iniciador sentido. Al desplegarse los datos del análisis, buscamos la especie, gen y el número de referencia (Figura 7). Si ambos iniciadores coinciden con la especie y número de referencia del gen reportado (Figura 8) se continúa con el análisis.

Se busca la secuencia reportada del gen de interés, en este caso, *gadph* de *Ovis aries musimon*, (Figura 9), se da clic en la opción *FASTA* (formato basado en texto, utilizado para representar secuencias de péptidos, ácidos nucleicos y proteínas, en donde las bases o los aminoácidos se representan utilizando un código de letras) (Figura 10A).

Se copia la secuencia que se despliega y posteriormente se pega en una hoja en un procesador de texto. En esta secuencia del gen, se buscan la secuencia de ambos iniciadores tal como se analizaron con *BLAST* (Figura 10B). Si se encuentra coincidencia para ambos iniciadores dentro de la secuencia del gen de interés, se procede a contar el número de pares de bases. Se cuenta desde el inicio de la secuencia del iniciador sentido, hasta el término de la secuencia del iniciador antisentido. El número de bases debe coincidir con el número de bases reportado en el artículo, así como, con el código del gen de la secuencia reportada (Altschu et al.,

1990; NCBI-NHI, 2017; Johnson, Zaretskaya, Raytselis, Merezhuk, McGinnis, Madden, 2008; Acland, Agarwala, Barrett, Beck, Benson, Bollin, et al.) En el caso de la secuencia utilizada como ejemplo, ambos iniciadores coinciden.

La herramienta bioinformática *BLAST*, presenta varias opciones de bases de datos que se despliega en la página como: la base de datos de colección de nucleótidos (*nr/nt*) [*Nucleotide collection (nr/nt)*], Secuencia de referencias de ARN [*Reference RNA sequences (refseq_rna)*] y Secuencia de referencias genómica [*Reference genomic sequences (refseq_genomic)*], entre otras.

6.2 Primer-BLAST

Para el estudio de los iniciadores con *Primer-BLAST*, se utiliza la secuencia de iniciadores para *Ovis aries musimon* del gen *gadph*. La herramienta bioinformática, *Primer-BLAST*, fue diseñada con la opción de analizar secuencias de iniciadores reportados en la literatura de una manera amigable.

En la página de *PubMed*, www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed, en la opción de *Primer-BLAST* (Figura 11 y Figura 12), podemos analizar simultáneamente, un par de iniciadores (iniciador sentido e iniciador antisentido). Ambas secuencias de iniciadores se transcriben en dirección 5' a 3' (Figura 13). En la opción de especie, de manera predeterminada se especifica *Homo sapiens*. En esta opción, se puede especificar la especie que se busca o dejar la opción en blanco. Dejar la opción en blanco, es recomendable, de esta manera la herramienta bioinformática nos indica la especies que coincide con el par de iniciadores analizados.

Al terminar el análisis, se despliegan los resultados (Figura 14) y datos como: secuencia de los iniciadores en dirección 5'-3', longitud, Tf, %GC, auto-complementariedad y auto-complementariedad en 3'. Si los parámetros de los iniciadores analizados cumplen con las especificaciones que se mencionaron en la sección 4.1, se pueden utilizar para realizar la reacción de PCR en el laboratorio. Si los parámetros desplegados se encuentran fuera de los rangos adecuados, es necesario buscar y analizar otro par de iniciadores.

Además de los parámetros del análisis, se puede ver la referencia del gen o genes con los

que coinciden los iniciadores y la especie a la que corresponden, así como el tamaño de la secuencia específica a amplificar (amplificado) y la región del gen en que se encuentran. Si el análisis confirma la especie y gen de los iniciadores, se procede a confirmarlo. Las secuencias de los iniciadores se analizan de igual manera como se mencionó anteriormente con *BLAST*, cotejándolos con la secuencia de *FASTA* del gen de interés (Figura 9 y 10), en este caso, *gadph*. Si existe coincidencia para ambos iniciadores dentro de la secuencia a analizar, se procede a contar el número de pares de bases. Se cuenta, desde el inicio de la secuencia del iniciador sentido, hasta el término de la secuencia del iniciador antisentido. El número de bases debe coincidir con el número de bases reportado en el artículo, así como con el código del gen de la secuencia reportada (Altschu et al., 1990; NCBI-NHI, 2017; Johnson et al., 2008; Acland et al., 2014). En el caso de la secuencia utilizada como ejemplo, ambos iniciadores coinciden.

La herramienta *Primer-BLAST*, en su página de inicio posee como referencia inicial la base *Refseq mRNA (Refseq: base de datos de secuencias de referencia que es mantenida por NCBI)*, se puede utilizar otras bases de datos para confirmar el análisis. Entre las bases de datos que se utilizan se encuentran: *Refseq base de datos de secuencias de referencia genoma representativo, nr* (base de datos de secuencia de nucleótidos no-redundante), *Refseq RNA (refseq_rna)*, *Genome* (conjunto de referencias a partir de organismo seleccionado), *Genome* (cromosoma de todo organismo) y de secuencia personalizada (Altschu et al., 1990; NCBI-NHI, 2017; Johnson et al., 2008; Acland et al., 2014; Npguera, Wright, Camejo, Yilmaz, 2014).

Con la herramienta bioinformática *Primer-BLAST*, se analiza el par de iniciadores, para comparar y confirmar los resultados del análisis de los iniciadores para *gadph* de *Ovis aries musimon* (Figuras 15 y 16).

Utilizando las secuencias de los iniciadores sentido y antisentido para *gadph* de *Ovis aries musimon* con las herramientas bioinformáticas *BLAST* y *Primer-BLAST* con diferentes bases de datos, estas secuencias coinciden para el gen *gadph* de *Ovis aries musimon*, con la referencia reportada XM_012166462.1.

Los resultados indican que este par de iniciadores es adecuado para llevar a cabo la reacción de PCR ya que ambas herramientas bioinformáticas y bases de datos coinciden con la referencia del gen y código reportado.

7. Conclusiones

En este trabajo, utilizamos dos herramientas bioinformáticas para el análisis de iniciadores. Encontramos que al variar la base de datos contra la que se comparan las secuencias de los iniciadores cumplen con los parámetros requeridos. En base al análisis realizado con dos herramientas bioinformáticas, *BLAST* y *Primer-BLAST* y realizando los análisis con tres diferentes bases de datos, podemos tomar una decisión sólida que nos lleva o no, a utilizar el par de iniciadores analizados para una reacción.

Diversos programas de alineamiento de secuencias se han utilizado a lo largo de los años como: algoritmo de alineamiento local Smith-Waterman en 1981, *FASTA* (Pearson y Lipman en 1988, *BLAST* (Altschual et al.) en 1990, *WU-BLAST* (Gish) en 1995, *BLASTX* (Gish y Lipman) y *Gapped BLAST* (Gish) en 1996, *NCBI BLAST 2.0* y *PSI-BLAST* (Altschual et al.) en 1997, *FASTA 3* (Pearson), *sim4* (Florea et al.) y *PHI-BLAST* (Zhang et al.) en 1998, *MegaBLAST* (Zhang et al.) en 2000, *SSAHA* (Ning et al.) en 2001 y *BLAT* (Kent) en 2002, *ARB* (Ludwing et al.) en 2004, *ProbeCheck* (Loy et al.) en 2008 y *SILVA* (Quast et al.) 2013. Otras herramientas bioinformáticas disponibles son: *T-Coffee*, *Clustal Omega*, *PRALNE*, *MAPGAPS*, *Oligo Calc*, *Clustal W2*, *Repeat Masker*, *Align*, *AligMe*, *PRALINE*, *TM-Coffee*, *M-Coffee* (Acland et al., 2014; Npguera, Wright, Camejo, Yilmaz, 2014; A Portal to Free Molecular Biology and Bioinformatics Tools, consultado en 2017; Online analysis tolos, consultado en 2017; Omic Tools 2015).

Con estas herramientas bioinformáticas y bases de datos podemos analizar secuencias de iniciadores, sin embargo, *Primer-BLAST* y *BLAST* son herramientas bioinformáticas amigables, rápidas, simples de usar e interactivas. El desarrollo y optimización de las herramientas bioinformáticas para el análisis de iniciadores, así como la ampliación de las bases de datos, conducen a análisis de iniciadores altamente

específicos, que conducen finalmente a un análisis de expresión génica exitoso.

8. Bibliografía

- A Portal to Free Molecular Biology and Bioinformatics Tools http://simgene.com/hosted_tools. [En línea] Fecha de consulta 2017.
- Acland. A., Agarwala. R., Barrett. T., Beck. J., Benson. D.A., Bollin. C., Bolton. E., Bryant. S.H., Canese. K., Church. D.M., Clark. K., DiCuccio. M., Dondoshansky. I., Federhen. S., Feolo. M., Geer. L.Y., Gorenkov. V., et al. Collaborator (61). NCBI Resource Coordinators. (2014) Database Resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research* Vol. 42. D7–D17.
- ADNlc. <https://www.ADNlc.org/resources/spotlight/index.html>. [En línea] Fecha de consulta 2017.
- Altschul, F.S., Gish, W., Miller, W., Myers. E.W., Lipman. D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* Vol. 215 (3). 403-410.
- Birmingham. N., Luettich. K. (2003) Polymerase chain reaction and its applications. *Current Diagnostic Pathology* Vol. 9 (3). 159-164.
- Department of Biochemistry and Structural Biology. (2014) http://biochem.uthscsa.edu/~hs_lab/frames/molgen/tutor/blast_databases.html. [En línea] Fecha de consulta 2017.
- Dieffenbach. C.W., Lowe. T.M., Dveksler. G.S. (1993) General concepts for PCR primer design. *Genome Res* Vol. 3 (3). S30-S37.
- Evans M.F. (2009) The polymerase chain reaction and pathology practice. *Diagn. Histopathol* Vol. 15(7). 344-356.
- Johnson. M., Zaretskaya. I., Raytselis. Y., Merezhuk. Y., McGinnis. S., Madden. T.L. (2008) NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Research* Vol. 36. W5–W9.
- Li-Yeh. Chu., Yu-Huei. Cheng., Cheng-Hong. Yang. (2013) Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnol Lett* Vol. 35(10). 1541-1549.
- Mullis. K. www.karynullis.com. [En línea] Fecha de consulta 2017.
- Mullis. K., Faloona. F.A. (1987) Specific synthesis of ADN in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. *Meth. Enzymol* Vol. 155. 335–350.
- NCBI-NHI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. [En línea] Fecha de consulta 2017.
- Npguera. D.R., Wright. E.S., Camejo. P., Yilmaz. L.S. (2014) Mathematical tools optimize the desing of oligonucleotide probes and primers. *Appl Microbiol Biotechnol* Vol. 98(23). 9595-9608.
- Omic Tools.(2015) <https://omictools.com/multiple-alignment2-category>. [En línea] Fecha de consulta 2017.
- Online analysis tools (Internet resources for molecular biologist). <https://molbiol-tools.ca/Alignments.htm>. [En línea] Fecha de consulta 2017.
- Somma. M., Querci. M. (2007) Análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos. Sesión 6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Luxemburgo: Oficina de publicaciones oficiales de las comunidades europeas 2007. ISBN-978-92-79-04831-9. Número de catálogo: LB-X1-07-033-ES-C. World health organization. Regional office for europe. En línea: <http://mbg.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/documentation.htm>.
- Ye. J., Coulouris. G., Zaretskaya. I., Cutcutache. I., Rozen. S., Madden. T.L. (2012) Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* Vol. 13. 134-144. <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/13/134>.

Tabla 1. Diferencias y semejanzas entre BLAST y Primer-BLAST para el análisis de iniciadores.

| | BLAST | Primer-BLAST |
|---|---|---|
| Acceso | Libre en línea | Libre en línea |
| Análisis de iniciadores reportados por la literatura | Sí | Sí |
| Análisis de iniciadores diseñados por herramientas bioinformáticas | Sí | Sí |
| Número de secuencias de iniciadores analizadas por análisis | Una secuencia de iniciador | Dos secuencias de iniciadores |
| Es necesario procesar la secuencia del iniciador antes del análisis | Si. La secuencia del iniciador reversa se procesa para analizarla | No. Se analizan ambos iniciadores al mismo tiempo |
| Tiempo promedio de análisis | Puede tardar entre 2 a 30 minutos por secuencia de iniciador | Puede tardar 1 a 3 minutos por secuencia de iniciador y por base de datos |
| Se especifica la especie a analizar | Para Humanos, ratón y otras | Se puede especificar la especie |
| Modos de búsqueda | No | Sí Automático Guiado por el usuario No guiado por el usuario |
| Puede diseñar iniciadores | No | Sí |
| Bases de datos | 16 bases de datos Para ARN, nucleótidos, genoma, cromosomas, arqueas y bacterias | 7 bases de datos Para ARN, genoma y nucleótidos |
| | | |

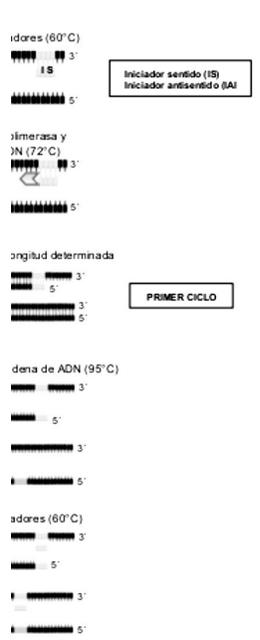
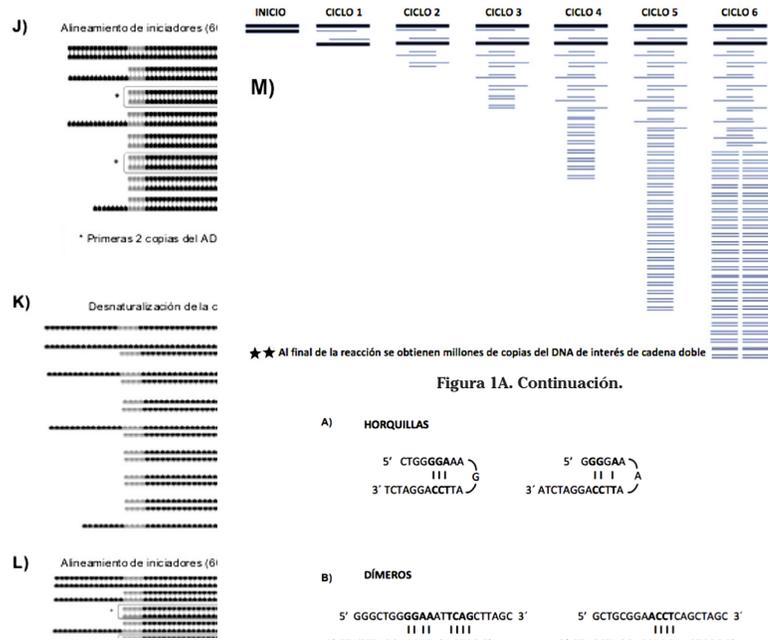


Figura 1. Secuencia de pasos de la reacción de PCR en donde se obtienen finalmente millones de copias de una sola cadena de ADN



★★ Al final de la reacción se obtienen millones de copias del DNA de interés de cadena doble

Figura 1A. Continuación.

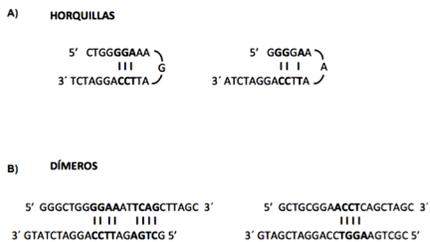


Figura 2. Homología de iniciadores. A) Ejemplos de formación de horquillas de iniciador, B) Ejemplos de formación de dímeros entre iniciadores.

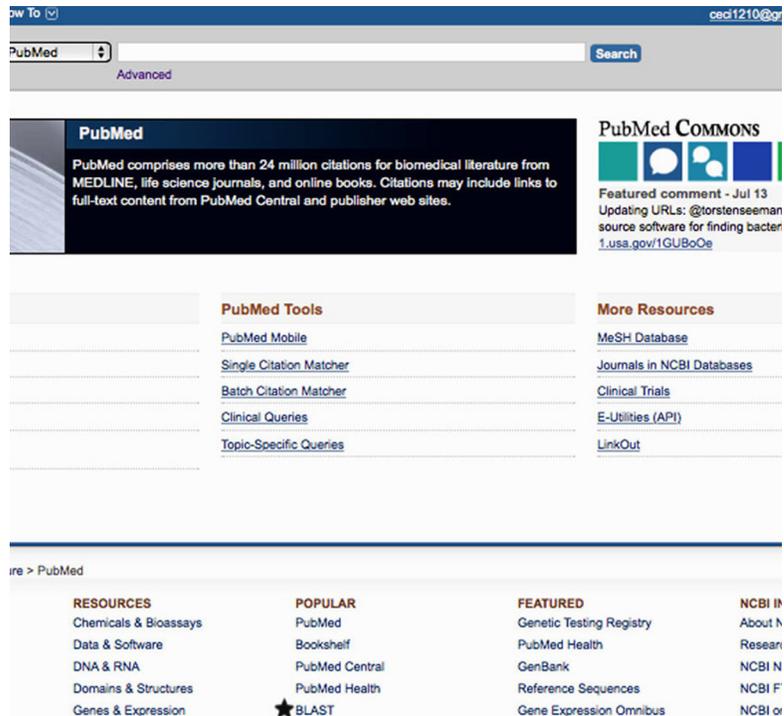


Figura 3. Página de NCBI-PubMed. Se muestra la página de PubMed en donde se señala con un asterisco el vínculo hacia la página de BLAST.

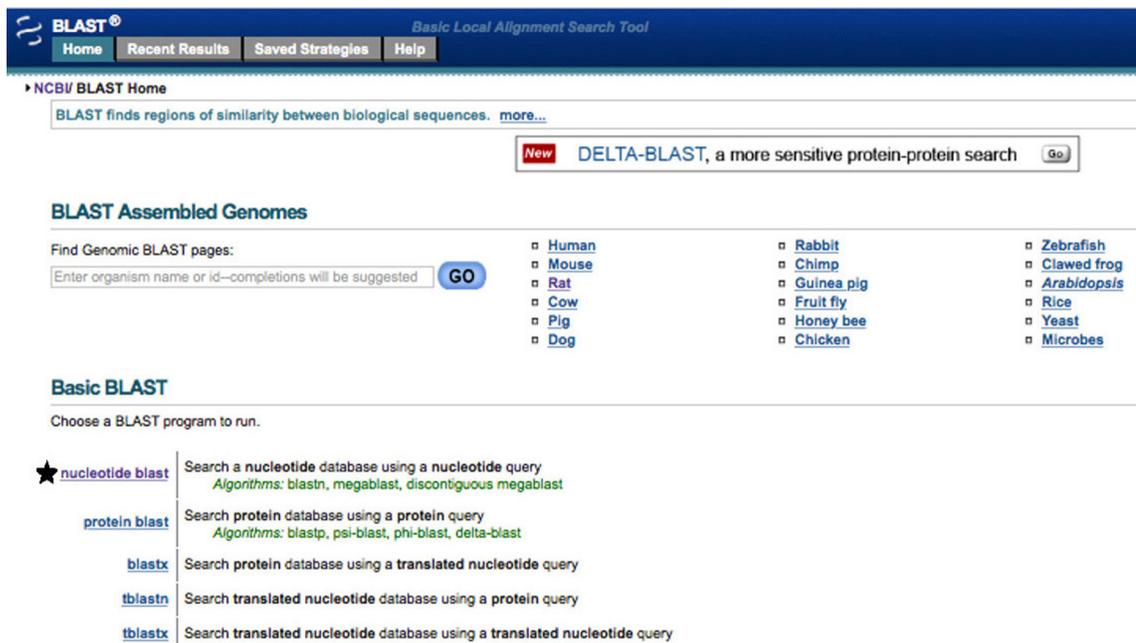


Figura 4. Página de BLAST. En la página se señala con un asterisco la opción de nucleotide blast en donde se realiza el análisis de iniciadores

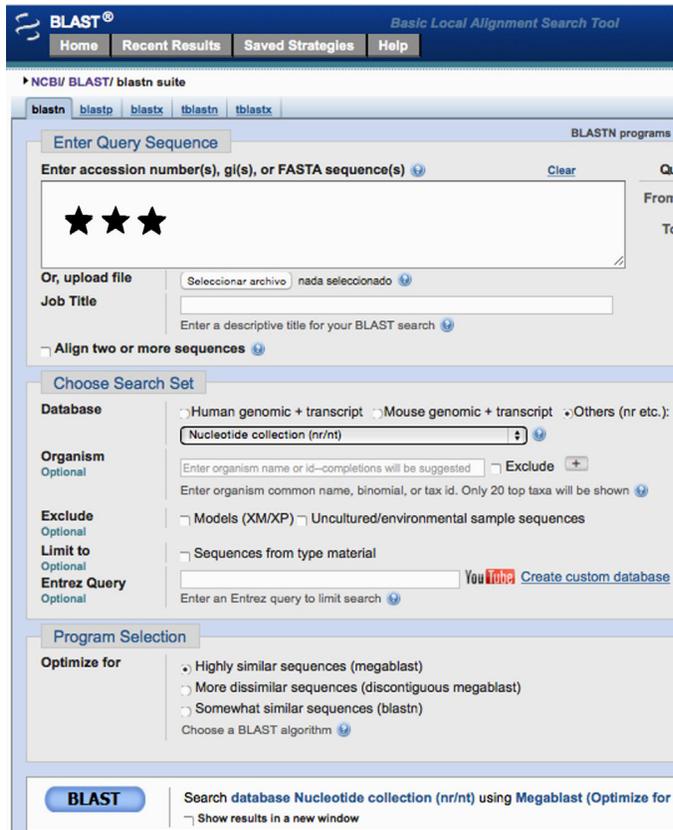


Figura 5. Página de nucleotide blast. Se señala el recuadro con tres asteriscos, en donde se escribe la secuencia de iniciadores a analizar

Ejemplo: Secuencias de iniciadores para el gen *gadph* de *Ovis aries musimon*

- A)** Iniciador sentido 5'-CCAATGGGGTCTTCACTACC-3'
 Iniciador antisentido 5'-AAGCAGGGATGATGTTCTGG-3'
- B)** Iniciador antisentido 5'- AAGCAGGGATGATGTTCTGG - 3'
 Iniciador antisentido complementario 5' - TTCGTCCCTACTACAAGACC -3'
 Iniciador antisentido complementario 3' - CCAGAACATCATCCCTGCTT - 5'
 y de izquierda a derecha

Figura 6. Secuencia de iniciadores. A) Ejemplo de secuencia de iniciador sentido e iniciador antisentido para el gen de *gadph* de *Ovis aries*, B) Proceso en que se obtiene la secuencia del iniciador antisentido para realizar el análisis con la herramienta BLAST y con el formato FASTA.

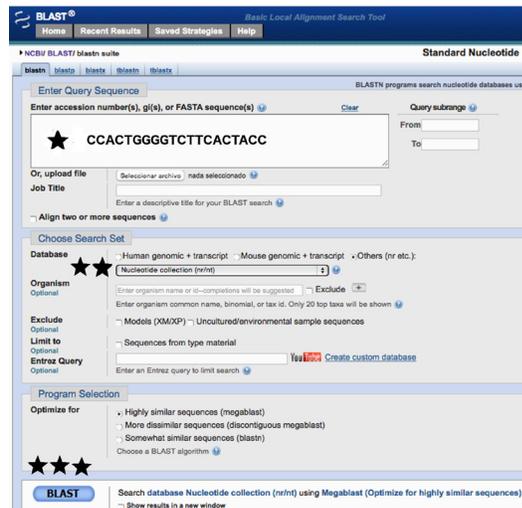


Figura 7. Análisis de iniciadores con BLAST. Se señala con un asterisco el recuadro en donde se escribe la secuencia del iniciador sentido o del iniciador antisentido a analizar, para el iniciador sentido *gadph* de *Ovis aries musimon*. Las demás opciones no se varían, finalmente se da clic en el botón BLAST al final de la página señalado con tres asteriscos.

BLAST® Basic Local Alignment Search Tool

Home Recent Results Saved Strategies Help

NCBI/BLAST/blastn suite/ Formatting Results - V4VD5P8P01R [Formatting options]

Job Title: Nucleotide Sequence (20 letters)

Your search parameters were adjusted to search for a short input sequence.

| | |
|-----------------------|------------------------|
| Request ID | V4VD5P8P01R |
| Status | Searching |
| Submitted at | Fri Jul 24 12:53:57 20 |
| Current time | Fri Jul 24 12:54:06 20 |
| Time since submission | 00:00:08 |

This page will be automatically updated in 2 seconds

BLAST® Basic Local Alignment Search Tool

Home Recent Results Saved Strategies Help

NCBI/BLAST/blastn suite/ Formatting Results - V4VVK0PX01R

Your search parameters were adjusted to search for a short input sequence.

Edit and Resubmit Save Search Strategies Formatting options Download

Nucleotide Sequence (20 letters)

| | | | |
|---------------|---|---------------|----------------------------|
| RID | V4VVK0PX01R (Expires on 07-26 01:01 am) | Database Name | nr |
| Query ID | Id Query_191645 | Description | Nucleotide collection (nt) |
| Description | None | Program | BLASTN 2.2.32+ > Citation |
| Molecule type | nucleic acid | | |
| Query Length | 20 | | |

Other reports: Search Summary [Taxonomy reports] [Distance tree of results]

Graphic Summary

Distribution of 162 Blast Hits on the Query Sequence

Color key for alignment scores

| | | | | |
|-----|-------|-------|--------|-------|
| <40 | 40-50 | 50-60 | 60-100 | >=200 |
|-----|-------|-------|--------|-------|

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

| Accession | Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
|--|-------------|-----------|-------------|-------------|---------|-------|----------------|
| Ovis satanensis canadensis isolate 431 chromosome 3 sequence | | 40.1 | 318 | 100% | 0.17 | 100% | CP011888.1 |
| PREDICTED: Condurux orizata glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), partial mRNA | | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.17 | 100% | XM_012732326.1 |
| PREDICTED: Ovis aries musimon glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like (LOC105613052), mRNA | | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.17 | 100% | XM_012166462.1 |
| PREDICTED: Bison bison bison glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase pseudogene (LOC105601133), misc. RNA | | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.17 | 100% | XR_627286.1 |
| PREDICTED: Bison bison bison glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like (LOC106032971), mRNA | | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.17 | 100% | XM_010891247.1 |

Figura 8. Resultado del análisis con BLAST del iniciador sentido. En la figura superior se muestra el proceso de análisis, en la figura intermedia se muestra la página de BLAST nos arroja el análisis de la secuencia y en la figura inferior, se señala con el recuadro el gen de interés en la lista de los que encuentra complementarios al iniciador sentido, en la misma línea observamos el valor de E y la clave de la secuencia de interés, se señala con asteriscos. De igual manera se despliega para el iniciador antisentido

NCBI Resources How To

Nucleotide Nucleotide Advanced

Display Settings: GenBank

PREDICTED: Ovis aries musimon glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like (LOC105613052), mRNA

NCBI Reference Sequence: XM_012166462.1

FASTA Graphics

Go to:

LOCUS XM_012166462 1290 bp mRNA linear MAM 03-APR-2015

DEFINITION PREDICTED: Ovis aries musimon glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like (LOC105613052), mRNA.

ACCESSION XM_012166462

VERSION XM_012166462.1 GI:803327381

DBLINK BioProject: PRJNA276576

KEYWORDS RefSeq.

SOURCE Ovis aries musimon (Ovis orientalis musimon)

ORGANISM Ovis aries musimon

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Ruminantia; Pecora; Bovidae; Caprinae; Ovis.

COMMENT MODEL REFSEQ: This record is predicted by automated computational analysis. This record is derived from a genomic sequence (NW_011943225.1) annotated using gene prediction method: Gnomon, supported by EST evidence.

Also see: Documentation of NCBI's Annotation Process

##Genome-Annotation-Data-START##

Annotation Provider : NCBI

Annotation Status : Full annotation

Annotation Version : Ovis aries Annotation Release 101

Annotation Pipeline : NCBI eukaryotic genome annotation pipeline

Annotation Software Version : 6.2

Annotation Method : Best-placed RefSeq; Gnomon

Features Annotated : Gene; mRNA; CDS; ncRNA

##Genome-Annotation-Data-END##

CDS /1..1072

/gene="LOC105613052"

/codon_start=1

/product="glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like"

/protein_id="XP_012021852.1"

/db_xref="GI:803327382"

/db_xref="GeneID:105613052"

/translation="MVKVGVNGFGRIGRLVTRAAFNTGKVDIVAINDFIDLHYMVYM FQYDSTHGKPHGTVKAENGLVINGKAITIPEQRDPANIKWGDAGAYVVESTGVTTF MERKAGHLKGGAKRVIISAPADAMPVGMVGNHKEYNTLKI VSNASCTNCLAPLAK VIHDFGIVLEGLMTTVHAIATQTKVDSGKLRWRDRAAQNI IPASTGAARAVKVIPELNGKLTGMAFRVPTFNVSVVDLTCRLKPAKYDEIKKVVQASGPKLGLGYTE DOVVSCDFNSDTHSSTFNAGAGIALNDHFVKLISWDFNEFGYSNRVVDLVMHMASKE"

ORIGIN

```

1 ctctctgctc ctgcccgttc gacagatagc cgttaactct gtgctgtgcc agcccgaatc
61 ctgagacaag atggtgaang teggagttaa cggatttggc cgcategggc cgcctgtcac
121 cagggtgctc ttaatactgt gcaaaagtga catctgtccc atcaatgacc cctctatgta
181 ccttcaactc atggtctaca tgttccagta tgatccacc catgcaagt tccacggcac
241 agtcaaggca gagaaggcca agctcgtcat caatggaag gccatcacca tcttccagga
301 cggagatcct gccaacatca agtgggtgta tgtgggtgct gactgactgt tggagtccac
361 tgggtgtctc actaacatgt agaaggtggt agtcaactgt aagggtggcg ccaagaggtt
421 caatcatctc gaacctctgt ctgagctccc catgtttgtg atgggctgtg accaagagaa
481 gtataacaat accctcaaga ttgtcaagaa tgcctctctg accacaactat gcttgcgccc
541 cctggcccag gtaactcatg accactttgg catcgtggag ggaactatga ccaactgtca
601 cgcataactc gccaacccga agactgtgga tgcctctccc ggaagctgtg ggcgtgatgg
661 cccaaggcct gccacaagca tcaactctgc tctacttggc gctgccaagg ccgtgggcaa
721 ggtcaatcct gagtcaacg ggaagctaac tggcattggc tcccgctcc ccaccccaca
781 cgtgtccgtt gtgatttga cctgcgctct ggagaacctc gccaatgatg atgagatcaa
841 gaaggtgtgt aagcaggcgt cagaggccct tctcaaggcc atctaggctc acactyagga
901 ccaggtgtct tcttgagact tcaacagaga caactcaact tcaactctca atgtggggc
961 ttgcatctgc ctaaacgacc acctttgtaa gctatttcc tggatgaca atgaattgg
1021 ctacagcaac aggtgtgtgt acctctatgt ccacatggcc tcaagagagt aaggttccctg
1081 gacccccagc ctaacagaga gcaagagaga aagagagagt tctcagctgt ctgggagtc
1141 ctgcccacc ccaacacacc tgaagaatcc caaacctcca cacatttcca tcccacaagg
1201 cctgagaaaa ggaagggtct tagggagccc tgccttgtca cgtaccatca ataaaagta
1261 cctataccca gaaaaaaaaa aaaaaagaaa

```

Figura 9. Datos del gen de interés. Se muestran secciones de los datos que han sido reportados del gen de interés, así como la secuencia de nucleótidos en formato FASTA. Se señala con los asteriscos la opción de FASTA para ver solo la secuencia de nucleótidos.

NCBI Resources How To

Nucleotide

Display Settings: FASTA

★ **PREDICTED: Ovis aries musimon glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like(LOC105613052), mRNA**

NCBI Reference Sequence: XM_012166462.1 ★★

GenBank Graphics

>gi|803327381|ref|XM_012166462.1| PREDICTED: Ovis aries musimon glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like (LOC105613052), mRNA
 CTCCTGCTCCTGCCCGTTCGACAGATAGCCGTAACCTTCTGTGCTGCCAGCCGATCCCTGAGACAAG
 ATGGTGAAGGTCGGAGTGAACGGATTTGGCCGATCGGGCCCTGGTACCAGGGCTGCTTTAATACTG
 GCAAAATGGACATCGTGCATCAATGACCCCTTCACTGACCTTACATACATGGTCTACATGTTCCAGTA
 TGCATCCACCATGGCAAGTCCAGGCCAGCTCAAGGCAGAGAACGGAGCTGCTCATCAATGAAAG
 GCCATCACCATCTCCAGGAGCGAGATCTGCAACATCAAGTGGGTGATGCTGGTGGTCAAGTACGTTG
 TGGAGTCACTGGGTCTTCACTACCATGGAGAAGGCTGGAGTCACTGAAAGGTGGCCAAAGAGGTT
 CATCATCTGCACTTCTGAGCTCACTGACCTCCATGTTGTGATGGGCTGAACCAAGAGATAACAAT
 ACCCTCAAGATGTCAGCAATGCTCCTGACCAACCACTGCTGGCCCTTGGCCAAAGTCACTCAAG
 ACCACTTTGGCATCTGGAGGACTATGACCACTGCTCAGCCATCACTGCCACCAAGAGCTGGGA
 TGGCTCTCCGGAACTCTGGGCTATGGCCGAAGGCTGCCAAGACATCACTCCCTGCTTCTACTGGC
 GTGCCAAGCCCTGGGCAAGTCACTCCCTGAGCTCAACGGGAAGCTCACTGGCATGGCTTCCGCGTCC
 CCAACCCCAACGCTGCTCCCTGGGATCTGACCTGCCGCTGGAGAACTGCCAAGTATGATGAGATCAA
 GAAAGTGGTGAAGCAGGCTCAGAGGGCCCTCAGGGCACTTAGGGTACACTGAGGACAGGTTGCT
 TCCTGGGACTTCAACAGGACACTCACTCTTCTACCTCAATGCTGGGCTGGCATTGGCTCAACGACC
 ACTTTGCAAGCTCATTCTCGGTATGACAAATGAAATCGGCTACAGCAACAGGGTGGTGGACCTCATGG
 CCACATGGCTCCAAAGGATGAGTCCCTGGACCCCAAGCTCAGCAGGAGCACGAGAGGAAGAGAGAT
 TCCTCAGCTCTGGGAGTCTGCTCCCACTCCACACACTGAGAATCTCCCAACTCCACACATTTCCA
 TCCCAAGGCCCTGAGAAAGGAGGGGCTTAGGGAGCCCTGCTTGTCACTACCATCAATAAAGATAC
 CCTATACCCAGAAAAAATAAATAAATAA

B

Tablas Gráficos SmartArt Revisar

Párrafo

Estilos

AaBbCcDdEe AaBbCcDdEe AaBbCcDdEe AaBbCcDdEe

Normal Sin espaciado Título 1 Título 2

CTCTCTGCTCCTGCCCGTTCGACAGATAGCCGTAACCTTCTGTGCTGCCAGCCG
 ATCCCTGAGACAAGATGGTGAAGTGGAGTGAACGGATTTGGCCGATCGGGCCG
 CTGTTCCACAGGGCTGCTTTAATACTGGCAAAGTGGACATCGTTCACATCAATGA
 CCCCTTCAATGACCTTCACTACATGGTCTACATGTTCCAGTATGATTCCACCCATG
 GCAAGTTCACGGCACAGTCAAGGCAGAGAACGGGAAGCTCGTCAATGAAAG
 GCCATCACCATCTCCAGGAGCGAGATCTGCCAACATCAAGTGGGTGATGCTGT
 GCTGAGTACGTTGGAGTCCACTGGGGTCTTCACTACCAATGGAGAAGGCTGGAGG
 TCACCTGAAGGGTGGCCAAAGGGTGCATCTCTGCACTTCTGCTGACGCTC
 CCATGTTTGTGATGGGCTGAACCCAGGAGATATAACAATACCCCTCAAGATTGTC
 AGCAATGCCCTCTGCACCACTGCTTGGCCCCCTGGCCAAAGTCACTCCATGA
 CCATTTGGCATCTGGAGGACTTATGACCACTGCTCCACCCATCACTGCCACCC
 AGAAGACTGTGGATGGCTTCTCCGGAAAGCTGGGCTGATGGCCAAAGGGTGGC
 CAGAACATCATCCCTGCTTCACTGGCGTGCACAGCCCTGGGCAAGGCTCATCCC
 TGAGCTCAACGGGAAGCTCACTGGCATGGCTTCCGCGTCCCAACCCCAACGCTGT
 CCGTTGTGATCTGACCTGCCGCTGGAGAACTGCCAAGTATGATGAGATCAAG
 AAGTGGTGAAGCAGGCTCAGAGGGCCCTCAGGGCACTTCTAGGCTACACTGA
 GAGCCAGGTTGCTCTGGGACTTCAACAGCGACATCACTCTTCTACTTCAATG
 CTGGGCTGGCATTCGCCCTCAACAGCACCTTTGTAAGCTCATTCTCTGGTATGAC
 AATGAATTCGGCTACAGCAACAGGGTGGTGGACCTATGGTCCACATGGCTCCAA
 GGATGAAGTCCCTGGACCCCAAGCTCAGCAGGACACGAGAGGAAGAGAGAT
 CCTCAGTCTGGGAGTCTGCCCCACCTCACCACACTGAGAATCTCCCAACTCC
 CCACACATTTCCATCCCAAGCCCTGAGGAAAGGAGGGCTTAGGGAGCCCTGCT
 CTTGTCACTACCATCAATAAAGTACCTATACCCAGAAAAAATAAATAAATAA

Figura 10. Secuencia de nucleótidos del gen de interés en formato FASTA. La figura superior muestra la secuencia del gen gadph de Ovis aries musimon en formato FASTA y la figura inferior muestra la secuencia de FASTA en el procesador de texto, el número de bases debe coincidir con el número de bases reportado en la literatura que son 336 pb, que coinciden.

NCBI Resources How To

PubMed

US National Library of Medicine National Institutes of Health

Advanced

You are here: NCBI > Literature > PubMed

| | | | |
|------------------------|-----------------------|----------------|--------------------------|
| GETTING STARTED | RESOURCES | POPULAR | FEATURED |
| NCBI Education | Chemicals & Bioassays | PubMed | Genetic Testing Registry |
| NCBI Help Manual | Data & Software | Bookshelf | PubMed Health |
| NCBI Handbook | DNA & RNA | PubMed Central | GenBank |
| Training & Tutorials | Domains & Structures | PubMed Health | Reference Sequences |
| | Genes & Expression | BLAST | Gene Expression Omnibus |
| | Genetics & Medicine | Nucleotide | Map Viewer |
| | Genomes & Maps | Genome | Human Genome |
| | Homology | SNP | Mouse Genome |
| | Literature | Gene | Influenza Virus |
| | Proteins | Protein | ★ Primer-BLAST |
| | Sequence Analysis | PubChem | Sequence Read Archive |

Figura 11. Página de NCBI-PubMed. Se señala con el asterisco la opción para Primer-BLAST.

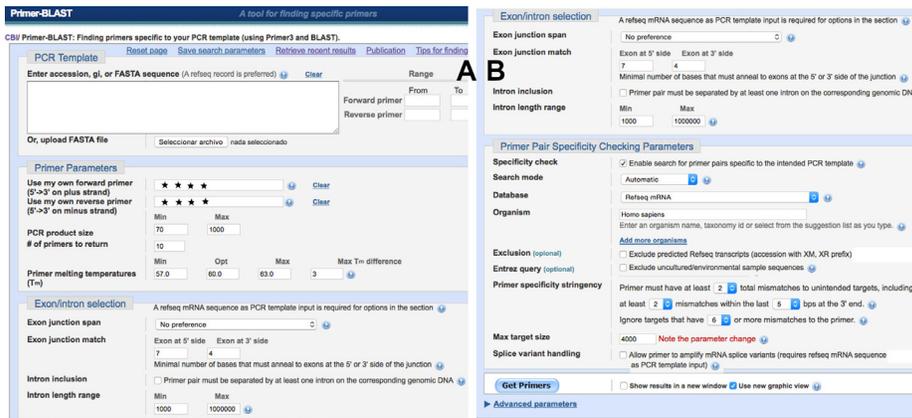


Figura 12. Página para el análisis de Primer-BLAST. Se señalan los recuadros en donde se escriben las secuencias de los iniciadores para su análisis con asteriscos

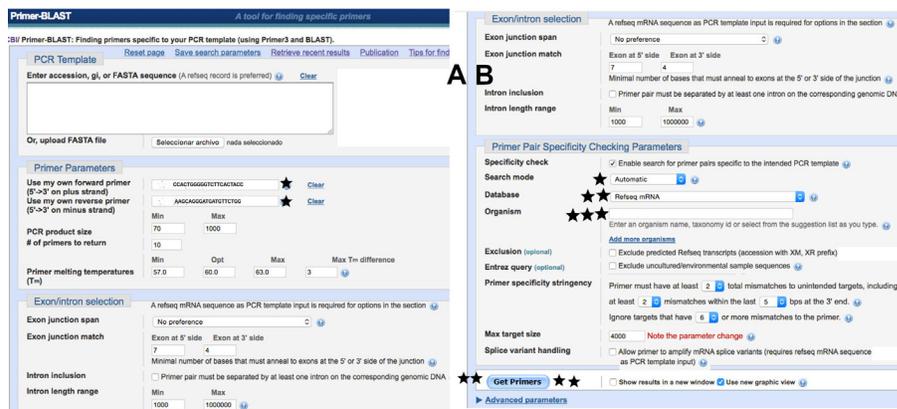


Figura 13. Ejemplo de análisis con Primer-BLAST. Se señalan las ventanas en donde se escriben las secuencias de los iniciadores se señala con un asterisco del lado derecho. Se señalan con uno y dos asteriscos las opciones que no se cambian y con tres asteriscos la opción que debe quedar vacía y el botón Get Primer para realizar el análisis y se da un clic en el botón Get Primer.

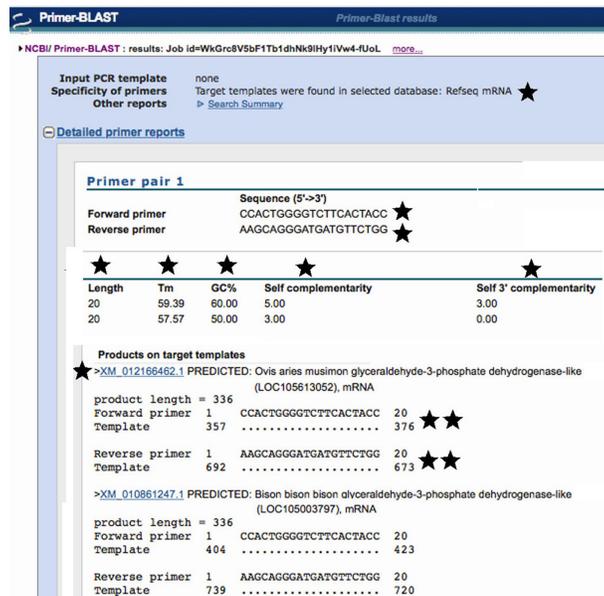


Figura 14. Resultado del análisis de Primer-BLAST. El resultado del análisis de Primer-BLAST utilizando la base de datos Refseq mRNA.

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
of primers to return

Min 70 Max 1000

10

Primer melting temperatures (Tm)

Min 57.0 Opt 60.0 Max 63.0 Max Tm difference 3

Exon/intron selection

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

Exon junction span

Exon junction match

Exon at 5' side Exon at 3' side

7 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

Database ★

Organism

Enter an organism name, taxonomy id or select from the suggestion list as you type.

[Add more organisms](#)

Exclusion (optional)

Exclude predicted Refseq transcripts (accession with XM, XR prefix)

Entrez query (optional)

Exclude uncultured/environmental sample sequences

Primer specificity stringency

Primer must have at least total mismatches to unintended targets, including at least mismatches within the last bps at the 3' end.

Ignore targets that have or more mismatches to the primer.

Max target size 4000 Note the parameter change

Splice variant handling

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

★ Show results in a new window Use new graphic view

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

Primer-BLAST Primer-Blast results

NCBI/ Primer-BLAST : results: Job_id=9hvgqWabiRTIe4NoZixi27Y9c-eErS... 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')

Forward primer CCACTGGGGTCTTCACTACC ★

Reverse primer AAGCAGGGATGATGTTCTGG ★

| Length | Tm | GC% | Self complementarity | Self 3' complementarity |
|--------|-------|-------|----------------------|-------------------------|
| 20 | 59.39 | 60.00 | 5.00 | 3.00 |
| 20 | 57.57 | 50.00 | 3.00 | 0.00 |

Products on target templates

>CPD11888.1 Ovis canadensis canadensis isolate 43U chromosome 3 sequence

product length = 720

Forward primer 1 CCACTGGGGTCTTCACTACC 20

Template 208053933 208053914

Reverse primer 1 AAGCAGGGATGATGTTCTGG 20

Template 208053214 208053233

★>XM_012166462.1 PREDICTED: Ovis aries musimon glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like (LOC105613052), mRNA

product length = 336

Forward primer 1 CCACTGGGGTCTTCACTACC 20 ★★

Template 357 376 ★★

Reverse primer 1 AAGCAGGGATGATGTTCTGG 20 ★★

Template 692 673 ★★

>XR_827286.1 PREDICTED: Bison bison bison glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase pseudogene (LOC105005113), misc_RNA

product length = 336

Forward primer 1 CCACTGGGGTCTTCACTACC 20

Template 338 357

Reverse primer 1 AAGCAGGGATGATGTTCTGG 20

Figura 15. Resultado del análisis de Primer-BLAST. El resultado del análisis de Primer-BLAST utilizando la base de datos nt

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
of primers to return

Min 70 Max 1000

10

Primer melting temperatures (Tm)

Min 57.0 Opt 60.0 Max 63.0 Max Tm difference 3

Exon/intron selection

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

Exon junction span

Exon junction match

Exon at 5' side Exon at 3' side

7 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

Database ★

Enter accession number, gi, or FASTA sequence Clear

Or, upload file:

Organism

Enter an organism name, taxonomy id or select from the suggestion list as you type.

[Add more organisms](#)

Exclusion (optional)

Exclude predicted Refseq transcripts (accession with XM, XR prefix)

Entrez query (optional)

Exclude uncultured/environmental sample sequences

Primer specificity stringency

Primer must have at least total mismatches to unintended targets, including at least mismatches within the last bps at the 3' end.

Ignore targets that have or more mismatches to the primer.

Max target size 4000 Note the parameter change

Splice variant handling

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

★ Show results in a new window Use new graphic view

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

Primer-BLAST Primer-Blast results

NCBI/ Primer-BLAST : results: Job Id=Ahnwbq5kp0Cc-JJ2-diqOL1mJnx6oWc... more...

Input PCR template none

Specificity of primers Target templates were found in selected database: Custom ★

Other reports Search Summary

Detailed primer reports

Primer pair 1

Sequence (5'→3')

Forward primer CCACTGGGGTCTTCACTACC ★

Reverse primer AAGCAGGGATGATGTTCTGG ★

| Length | Tm | GC% | Self complementarity | Self 3' complementarity |
|--------|-------|-------|----------------------|-------------------------|
| 20 | 59.39 | 60.00 | 5.00 | 3.00 |
| 20 | 57.57 | 50.00 | 3.00 | 0.00 |

Products on target templates

★>XM_012166462.1 PREDICTED: Ovis aries musimon glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like (LOC105613052), mRNA

product length = 336

Forward primer 1 CCACTGGGGTCTTCACTACC 20 ★

Template 357 376 ★

Reverse primer 1 AAGCAGGGATGATGTTCTGG 20 ★

Template 692 673 ★

Figura 16. Resultado del análisis de Primer-BLAST. El resultado del análisis de Primer-BLAST utilizando la base de datos personalizada (custom).