



A Importância do Desenho de *Primers*

Luis Felipe Girardon¹; Fabiana F. dos Santos²; Ana Lucia Chaves³; Antonio Costa Oliveira⁴

^{1,4}Dept^o de Fitotecnia - Centro de Genômica e Fitomelhoramento – FAEM/UFPel, ²Instituto de Biologia – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, ³Instituto de Química e Geociências.

Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900. filhoinhu@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

Uma das principais técnicas utilizadas em biologia molecular é a reação em cadeia da polimerase (PCR). Através desse método é possível amplificar milhares de vezes um fragmento de DNA (GARCÊS, LIMA, 2004). O processo de desenho dos primers é uma etapa chave para um PCR bem sucedido, necessitando do conhecimento prévio da seqüência de DNA alvo, onde se deseja que esses iniciadores sejam ligados.

Faz-se necessário o uso de *primers* com parâmetros específicos, como: temperatura, tamanho, composição e conteúdo GC; esses parâmetros são calculados utilizando-se softwares específicos a fim de que os *primers* se unam à seqüência de DNA de interesse.

Este trabalho descreve a viabilidade da construção de *primers* através da utilização de um programa de bioinformática, mostrando a necessidade do crescente uso de métodos computacionais para contextualizar dados biológicos (RHEE, S. Y; DICKERSON, J; XU Dong, 2006).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O desenho dos *primers* é dividido em várias fases: busca e escolha das seqüências de interesse; alinhamento das seqüências e determinação do consenso; seleção da região consenso mais conservada, além da escolha e teste dos *primers* (GARCÊS, LIMA, 2004). Para o desenho de *primers in silico* foram obtidas ESTs (*Expressed Sequence Tags*) a partir de 7632 seqüências de aveia contidas no banco de dados do NCBI (The National Center for Biotechnology Information). As seqüências de ESTs dos resultados obtidos foram salvas no formato FASTA e armazenadas em arquivo de texto. O programa CAP 3 foi necessário a fim de eliminar repetições, fragmentos que apresentavam um número de bases muito diferente da média e outras seqüências fora do grupo de interesse, restando 4586 seqüências incluídas no

estudo. Para a localização, caracterização e desenho dos primers de regiões microssatélites (*Simple Sequence Repeat*) foi utilizado o programa SSRLocator, o qual foi desenvolvido no Centro de Genômica e Fitomelhoramento da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel.

Os parâmetros físicos devem ser semelhantes com a finalidade de assegurar o desempenho coerente entre os pares de *primers*. A T_m (*Temperature melting*) foi de no mínimo 57⁰C, máximo 63⁰C e ótima de 60⁰C durante o desenho dos *primers*. O percentual de GC contido na seqüência alvo de DNA usualmente é de 40% a 60% (BURPO J. F, 2001); essa contribuição majoritária do GC na constituição da fita justifica-se pelo fato de haver uma ligação mais forte entre esses nucleotídeos (através de três pontes de hidrogênio) comparada às duas pontes em AT. Sendo assim, torna-se mais difícil de separar as fitas nas ligações GC que em AT. Neste trabalho o conteúdo de GC foi no mínimo de 40% e no máximo de 50% da seqüência. O tamanho dos fragmentos amplificados (*amplicon*) varia de 100 a 300 nucleotídeos. O comprimento estipulado para os primers foi no mínimo de 19, máximo de 22 e ideal de 20 pares de bases.

3. RESULTADOS

Ao final do processo de desenho dos iniciadores, como etapa do PCR, foram delineados 58 grupos, conforme explicitado na tabela 1.

Tabela 1. Lista de iniciadores derivados de regiões SSR de seqüências ESTs de aveia. CGF/FAEM/UFPel, 2009.

Sequence Contig	Type	LowESSR Forward	TM Forward	Reverse	TM Reverse	Practical Size	
1	sequence	1	GGGAGGAGGATCGG TGTTCG	62,637	G AGG CCGCTTGAGG TGTGTC	62,777	170
2	sequence	_10	GGAGCGG TAG TAGATAGCG CG	59,889	ACG ATAAAACCG ACAGG GAG	60	284
3	sequence	39	AAAGTGGATCGG TGTAGCG G	60,111	G CG ATTCG ATTAACGAG AGG	59,889	271
4	sequence	_99	GG AG TC ATCGATCGCAATG	60,135	TGTGCA TCTCG TTCTG GATC	59,95	290
5	sequence	99	GG AG TC ATCGATCGCAATG	60,135	TGTGCA TCTCG TTCTG GATC	59,95	290
6	sequence	_65	GG GAGG TCG AGAG TAGAT	59,185	G AGAG GAG ATCGATG CTCG	59,91	112
8	sequence	_97	AGAGCTGT TCG TCGTCTCG	60,285	AAAGCGCGG AACAGCTG TAC	59,980	285
10	sequence	377	GG AGAGGAGG G TAGAGTGA	60,261	TGG TGTATT TGA TCG TGTG A	59,924	246
11	sequence	_397	TTTTCG TTGCGTGAAG AGCG AG	59,913	G AG CAGCAAG AACCG ACAG	59,909	299
12	sequence	455	TGCTG CTCGAG GATG TG ACT	59,638	TTCATG TGAAGCG CG GCAC	60,074	263
13	sequence	_496	CG GAGGAG CGAGAG AG AGA	60,619	TTC TTG TG CAGCG ATG TA	59,964	111
14	sequence	1009	ATCG ATTAGTCTCTCG TCGCT	59,886	G AG AGCG ACAG AACCTCG	59,814	296
17	sequence	_1019	GG TAAAGAGAG ATCGAGCGA	60,931	G CGAGG CTG AAG ATAGGAG	59,936	225
18	sequence	1139	CGTCCATG ATCGG TGAAGT	60,073	AGCG ATTCGAGCA TTAGACA	59,993	181
21	sequence	_1304	GCTTCTG TGAATG TGTCTCG	59,759	G CTCG TGA TGTCCG TGTATG	59,992	287
22	sequence	_1436	ATCGATCATG GAG AGATCG	59,985	TCC ATCTT AC AAAGC CAGCA	60,257	287
23	sequence	1516	TTTCTTCTCGG TCG GTCTG	59,259	AGATG CAAT TCGT CAGCCTA	59,995	191
24	sequence	_1628	GGAGCGAGAG ATCGATTTT	59,933	TGCA TCGAT TCGT TTTCCG	60,995	213
25	sequence	1616	CG GTTAGG GAGCG AG AGA	60,11	G AGC TG CGAG AG AG ATCG	59,997	290
26	sequence	_1616	GATTGCTATG GAGCGAGCG	60,261	AGCTTATG CTT TCGG GAGT	60,229	291
27	sequence	1704	GAGGAA TG GTTG GGAAG G	60,051	G TG AGCTCGAGCGCTTCTG	60,009	142
28	sequence	_1971	TGACTCGATCTTTTG GAGCTT	60,11	ACAGAGAG CGAATAGAGCGG	59,993	291
30	sequence	2229	GAGG TCGATCGG TTG TTG T	60,119	ATATCG GATAGG AGCGCGG	60,081	119
31	sequence	_2243	AGG GAG AG GACTG GCGATTT	60,074	G TACCG GAG AGCT AGCCTCG	60,096	289
32	sequence	_2258	CTCATG TCGATCGATTTTTCG	60,08	TTCATTTGCTTTTTCGTTTTCG	59,916	211
34	sequence	2315	GCTTCGG TCGAGACTGAGG	59,814	G ATCGAT TCGATCGCTCAAT	59,715	271
35	sequence	_2429	AGAG GAGAGATCGG TGAGG	59,986	G AAAGCTCGG TG TTG TCGCA	60,027	185
36	sequence	2573	CTCTG TTG CGAG GAGG TCTG	59,986	G GATTTTACATCGATCGCTG	60,731	285
37	sequence	_2573	GGAGAG TCGCTTTTTCG GTT	60,61	AAATAGCGAGAAAGCGCGCG	59,442	185
38	sequence	2558	GG GCTAGCTCGGAG ATAAA	60,096	G GTTG CAGG TACAGCTAGCA	59,908	116
39	sequence	_2571	CGCATG TG GCTGAGAGG TA	60,011	AAATAGCG A TCGCTTTG TTAG	59,982	256
41	sequence	2569	CTG CG CGAG CG AGAATAGTA	59,146	G CTCGAGACTG AAAGAGCA	60,027	279
42	sequence	_2654	TTTTCG TGTGAGG AGTCTG	59,873	TGG GATTAATGAGAGCTCG	59,889	297
43	sequence	_2641	AG GAGAAAGATCG CGAATC	59,939	G ATCGT CAGCA TG AGCGAA	59,962	139
44	sequence	_2652	CTCATTTCCGG GTTG TACCA	59,826	ATGAG GAG GAGCG AGAGAT	59,981	217
45	sequence	_2149	ATGAG GAGAGCG GATAGAGG	59,985	AG TAAAGAG GTCTCG AGG	59,92	245
46	sequence	2610	GG AGAGCG GTTAGAGCTA	59,986	G GGTCCG G TCG TCTTCTAT	60,309	292
47	sequence	_2625	AAAGATCG GATAGAGATCG	59,923	TGT TACG TAGATCGG GCAAA	59,982	196
48	sequence	2631	GAGG TG CG AG AG AG ATCG	59,997	G CTCGCG ATAAATCTG TCGA	59,994	292
49	sequence	_2717	GATCGAGG AGG AGAAAGGG G	60,117	TTC AGCTGTCTCG GTTAGAA	59,971	239
50	sequence	2628	CGGACTG ATCG TAAAGCAA	59,984	T TAGAGAGAG AAAGCGCGG	60,11	271
51	sequence	_2941	AG GAGG GATAGAGCTCTCG	60,118	G ACTAGCTCGAGCTCAGCT	59,48	180
52	sequence	_2914	GAGG TG CG AG AG ATCG	59,997	G GGTTAGG GAGCG AG AGAA	60,11	296
53	sequence	_2928	GCTTTTCTCG TCGTATG	59,985	G AAAGC AG CGAGAAAGCT	60,116	199
54	sequence	_428	GAG GAGAGAGAGAGAGAGG	60,293	G AGG AAAGG GATCGAGAGG	59,993	186
55	sequence	4131	GAAAGCTG GAGAGAGG GAT	59,151	TCCAGT T TCGTACAGAGTG	59,831	299
56	sequence	_4139	GATTTG TTGAAAGATG TG G	59,979	TCTG ACAGAAAGCAGAG CAA	59,175	189
57	sequence	4210	CTG CTGAG TCG ATCGCTG TA	60,089	AGAGAG ATG CGAGAG TCG	60,12	291
58	sequence	_4421	GAGG GAGATG GATATCTTT	59,903	G TG CTCG AGCA TACAGACT	60,277	270

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A obtenção de *primers* mostra-se de fundamental importância para as pesquisas moleculares. Por meio de procedimentos simples, utilizando-se de programas de bioinformática, torna-se possível obter bons resultados no que tange à amplificação das seqüências de DNA desejadas. Seu uso representa uma economia de tempo e de recursos em testes laboratoriais. Esses resultados podem orientar o pesquisador na seleção dos desenhos de *primers* de regiões microssatélites maximizando a eficácia da técnica de PCR. Atualmente, alguns dos *primers* apresentados neste trabalho estão sendo testados *in vitro*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BURPO, J. F. A critical review of PCR primer design algorithms and cross-hybridization case study. **Biochemistry** , 2001,218.

GARCÊS, S. P. S. and LIMA, A.O. S. Desenho e Validação *in silico* de Primers Intragenéricos. II Workshop de Tecn. da Inf. Aplicada ao Meio Ambiente – **CBComp**, 2004

RHEE, S. Y ; DICKERSON, J; XU Dong. Bioinformatics and Its Applications in Plant Biology. **The Annual Review of Plant Biology**, 2006, 57, p. 335-60