

Diseño de primers

Dra Adriana Woods

adrianawoods@gmail.com

Para un buen diseño de primers debemos tener en cuenta lo siguiente:

- Los primers deben tener una longitud de 17-24 pb.
- Los dos primers del par deben de tener temperatura de fusión "Tm" (temperatura a la que la mitad de los primers se han hibridado con el ADN molde), cercanos para maximizar el rendimiento, dentro de los 5 °C. Lo ideal es que la diferencia entre los primers sea igual o menor a 2°C. Esto suele traducirse en un contenido en GC similar.
- El contenido de GC se aconseja entre 50% y 60%.
- Los primers no deben formar horquillas (*hairpins*) ni ser complementarios; conviene evitar secuencias que terminen en GGG, CCC, GGT, ATT, CGA, TAA o TTA.

Para calcular la Tm:

Una aproximación burda la cálculo, es la llamada regla de Wallace, que se basa solamente en la secuencia, donde GC y AT son el número de nucleótidos G/C y A/T en la secuencia del primer, respectivamente ([SantaLucia, 2007](#)):

$$TM: 4GC + 2AT$$

Hay muchos programas que pueden ayudar en el diseño de primers en la web, consultar Herramientas Informáticas.

Cuando queremos diseñar primers, debemos buscar la secuencia el exón (o fragmento) que deseamos estudiar, incluyendo parte del intrón anterior al extremo 5' y del intrón posterior al extremo 3'. Esto tiene 2 objetivos: 1) estudiar los sitios de "*splicing*" y 2) tener en cuenta que los primeros 50-100 nucleótidos no suelen ser bien analizados por los secuenciadores, por lo que en los electroferogramas será difícil leer. De este modo, podremos leer bien el comienzo de la secuencia del primer con parte del intrón y sitio de *splicing*.

Así tendremos el par de primers *forward* (Fw) y *reverse* (Rev) ubicados localizados en los primers, por fuera del exón en estudio.

Recordemos que el primer Fw es la secuencia 5'-3' en el extremo 5' del exón, mientras que el primer Rev es la complementaria a la 5'-3' en el extremo 3' del exón.

Ejemplo: exón 31 del VWF:

gtgacttaaggatccaccgtaaagacaggggtgcagccgcagtcagactgacttggcgtgatctgttccatcctcagGGGATGCCT
TGGGCTTTGCTGTGCGATACTTGACTTCAGAAATOCATGGTGGTGCCAGGCCGGGAGC
CTCAAAGGCGGTGGTCATCCTGGTCACGGACGTCTCTGTGGATTGAGTGGATGCAGCA
GCTGATGCCGCCAGGTCCAACAgaagaagaatctggtgtacagtcctcaattcaggagagcgagagacttcagaaatgat
agaggataaaagtggcctggggttacttt tggatgttggtgatataaa

En verde: cambio con el seudogen;

En minúscula: intrones; antes del comienzo de exón (extremo 5'), intrón 30; después del extremo 3' del exón: intrón 31.

En mayúscula: exón;

Subrayado: primers;

- Forward: 5' TAA GGA TCC ACC GTT AAG ACA 3'
- Reverse: 5' AAA GTA ACC CCA GCC CAC 3' obsérvese que es complementario a la secuencia subrayada en el intrón 31 y en sentido inverso.