

## Software-Tools zum Primerdesign

### Primer3

Bei diesem online Tool handelt es sich um ein Programm, das automatisch Primer zu einer entsprechenden Sequenz findet.

#### Aufgabe

Machen Sie sich mit dem Programm vertraut, so dass Sie die Tabelle auf der nächsten Seite ausfüllen können.

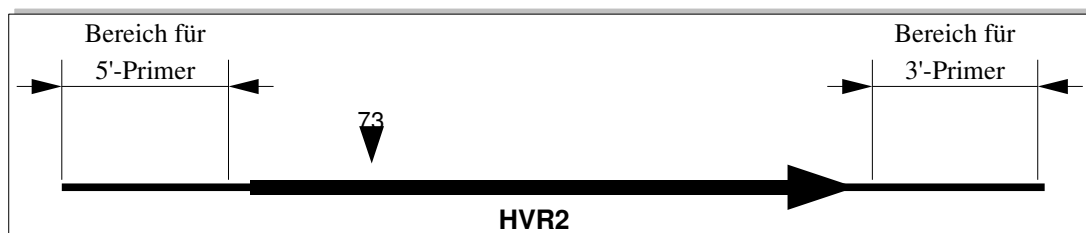
#### Übung 01:

In Sequenzdatenbanken ist für Nukleinsäuren in der Regel immer nur der Sinnstrang in 5' → 3' Richtung angegeben. Hier sollen die Primer bestimmt werden, die zur Amplifizierung der HVR2-Region des D-Loop in der mitochondrialen DNA nötig sind. (Achtung! mtDNA ist zirkulär)

Suchen Sie nun die entsprechenden Primer in unten stehendem Sequenzausschnitt der mtDNA manuell.

#### Anmerkung:

- Die Primer müssen so gewählt werden, dass sie außerhalb der HVR2 liegen (s. Abbildung unten).
- Beide Primer müssen ähnliche Schmelztemperaturen besitzen (max. 2°C Unterschied), damit eine Annealingtemperatur für die PCR bestimmt werden kann.
- Die Primerlänge soll zwischen 18 und 25 bp liegen.
- Die Bindepositionen der Primer soll so gewählt werden, dass
  - der rev-Primer im Bereich von ca. 100 bis 150 Basen vor der Position 73 bindet und
  - der for-Primer im Sequenzbereich von 450 bis 550 der mtDNA lokalisiert ist.



**Info:** Position 1 der mtDNA ist unterstrichen (Gesamtlänge der zirkulären mtDNA 16569 bp)

Erkennungssequenz für Restriktionsenzym kursiv unterstrichen und **Position 73 fett**.

```
ACTTCAGGGT CATAAAGCCT AAATAGCCCA CACGTTCCCC TTAAATAAGA CATCACGATG GATCACAGGT
CTATCACCCCT ATTAACCACT CACGGGAGCT CTCATGCAT TTGGTATTTT CGTCTGGGGG GTAATGCACGC
GATAGCATTG CGAGACGCTG GAGCCGGAGC ACCCTATGTC GCAGTATCTG TCTTTGATTC CTGCCTCATC
CTATTATTTA TCGCACCTAC GTTCAATATT ACAGGCGAAC ATACTTACTA AAGTGTGTTA ATTAATTAAT
GCTTGTAGGA CATAATAATA ACAATTGAAT GTCTGCACAG CCACTTTCCA CACAGACATC ATAACAAAAA
ATTTCCACCA AACCCCCCT CCCCCTTTC TGGCCACAGC ACTTAAACAC ATCTCTGCCA AACCCCAAAA
ACAAAGAACC CTAACACCAG CTAACCCAGA TTTCAAATTT TATCTTTTGG CGGTATGCAC TTTTAACAGT
CACCCCCCAA CTAACACATT ATTTTCCCCT CCCACTCCA TACTACTAAT CTCATCAATA CAACCCCGC
```



## Funktion wichtiger Parameter in PRIMER3

<b>Parameter</b>	<b>Funktion, Anwendung</b>
Source Sequence	Ursprungssequenz
Sequence Id	Die gefundenen Primer besitzen eine Identifikationsnummer.
Targets	Bestimmte Zielsequenz die der Primer eingrenzt
Number To Return	Maximale Anzahl der Primer, die man am Ende zurückführen kann
Excluded Regions	Region an denen der Primer nicht binden kann/ darf
Product Size Range	Produktgrößenbereich = der Abstand zwischen den beiden Primern  Primer3 first tries to pick primers in the first range. If that is not possible, it goes to the next range and tries again
Product Size	Länge des PCR-Produktes, minimal, ideal oder maximal
Primer Size	bestimmt einen Primer mit der angegebenen Länge  minimal, optimal, maximal
Primer Tm	bestimmt die optimale Schmelztemperatur der zu suchenden Primer  minimal, optimal, maximal
Maximum Tm Difference	höchste erlaubte Differenz zwischen den Schmelztemperaturen der Primer
Max 3' Complementary	gibt an wie komplementär die Primer zueinander sein dürfen, sodass sie noch akzeptiert werden können
Included Region	die Region, der gegebenen Sequenz, in welcher der/die Primer gesucht werden sollen
CG Clamp	Gibt die spezifische Anzahl der G's oder C's an den 3'-Enden der left- und right-Primer an



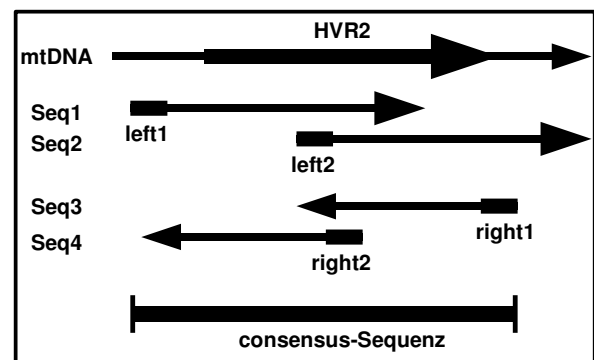
## Übung 02:

- Öffnen Sie PRIMER3
- Fügen Sie die FASTA-Sequenz der mtDNA (AC\_000021) ein.
- Stellen Sie die Parameter ein (Angaben siehe oben, wie bei der Suche von Hand) und suchen Sie die entsprechenden Primer.
- Notieren Sie sich die von Primer 3 vorgeschlagenen Primer und vergleichen Sie diese mit den von Ihnen von Hand bestimmten.

## Übung 03:

### Primer bei der SANGER-Sequenzierung

Bei einem Sequenzansatz können ca. 350 Basen (nach dem Primer) sicher bestimmt werden. Um Sequenzierfehler ausschließen zu können, muss in beide Richtungen sequenziert werden. Das heißt, es werden der Sinnstrang und der Matrizenstrang sequenziert. Pro Strang sind zwei Sequenzansätze mit unterschiedlichen Primern nötig, weil der zu sequenzierende DNA-Abschnitt länger als 350 Basenpaare lang ist.



Für jeden Sequenzansatz wird nur ein Primer verwendet ( $T_m \approx 60^\circ\text{C}$ ). Es ist wichtig, dass sich die sequenzierten Bereiche um ca. 50 Basen überlappen, damit die Sequenzfragmente anschließend zusammengesetzt und eine Consensus-Sequenz bestimmt werden kann (s. Abb.).

### Aufgaben

- Verwenden Sie das Programm PRIMER3
- Suchen Sie die vier entsprechenden Sequenzprimer heraus.
- Gehen Sie von der mtDNA-Sequenz (AC\_000021) aus.

