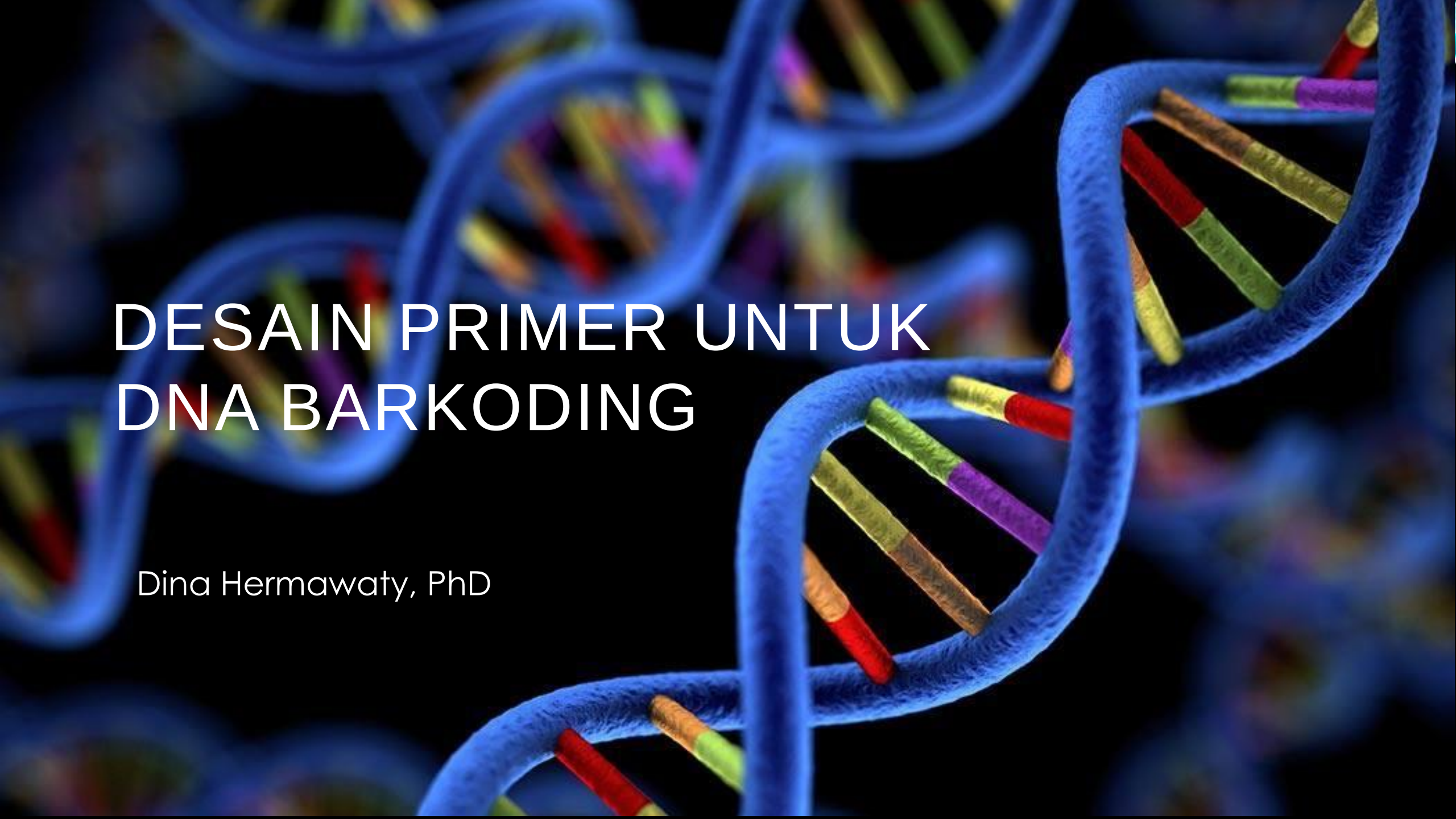


DESAIN PRIMER UNTUK DNA BARKODING

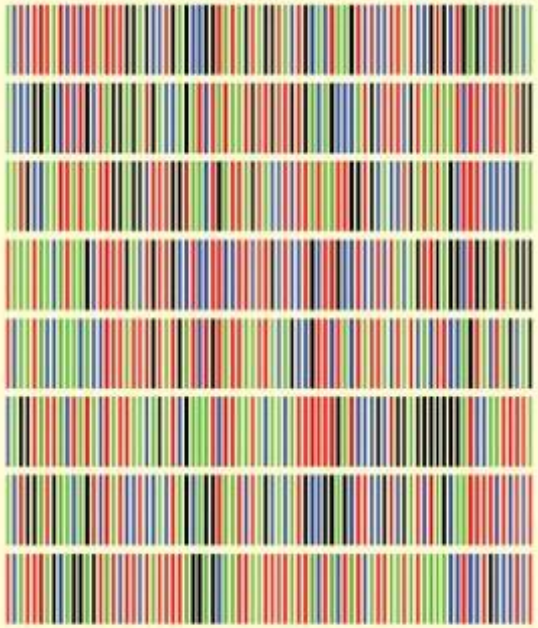
Dina Hermawaty, PhD

DNA BARKODING

Universal Product Code

- Ten unique states
- Twelve distinct positions

DNA Barcode



- Four unique states
- Over 600 positions

DNA-based identification system

DNA BARKODING

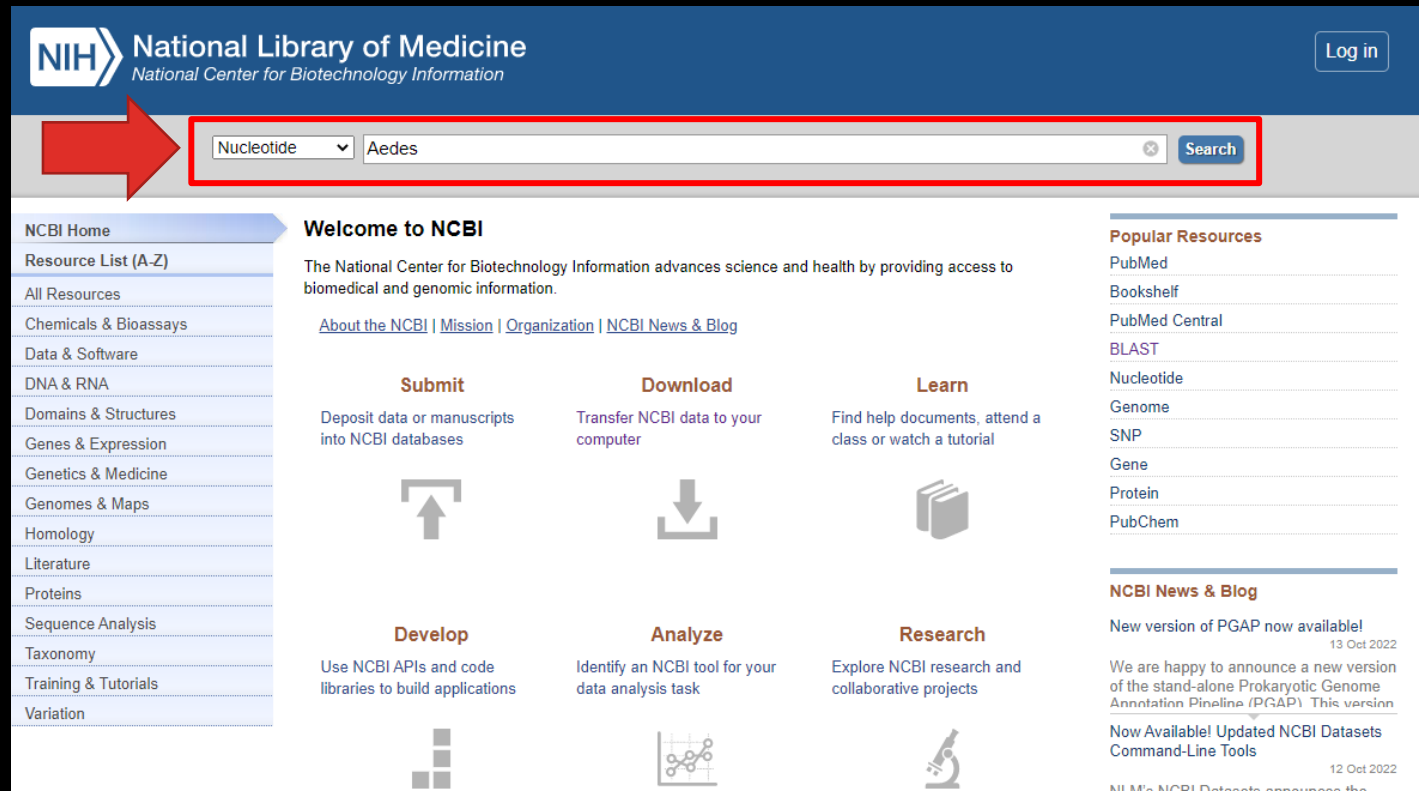
- Sample yang digunakan adalah DNA
  - Metode ekstraksi DNA.
- Gold standard locus:
  - COX1 (hewan),
  - rbcL dan matK (tumbuhan),
  - ITS (jamur),
  - 16s RNA (bakteri)
- Design primer
  - Tidak seluruh sekuen digunakan hanya sekuen “representatif”.
  - Disesuaikan dengan kebutuhan analisis/ identifikasi: level spesies, genus, famili, dst.

1. GEN TARGET

PENGUMPULAN SEKUEN GEN TARGET

- Data sekuen gen target dapat dicari dan diunduh dari website NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/).
  - Misal, anda diminta merancang primer gen cytochrome c oxidase 1 (COX1) dari beberapa spesies nyamuk, yaitu: *Aedes*, *Culex*, dan Anopheles.

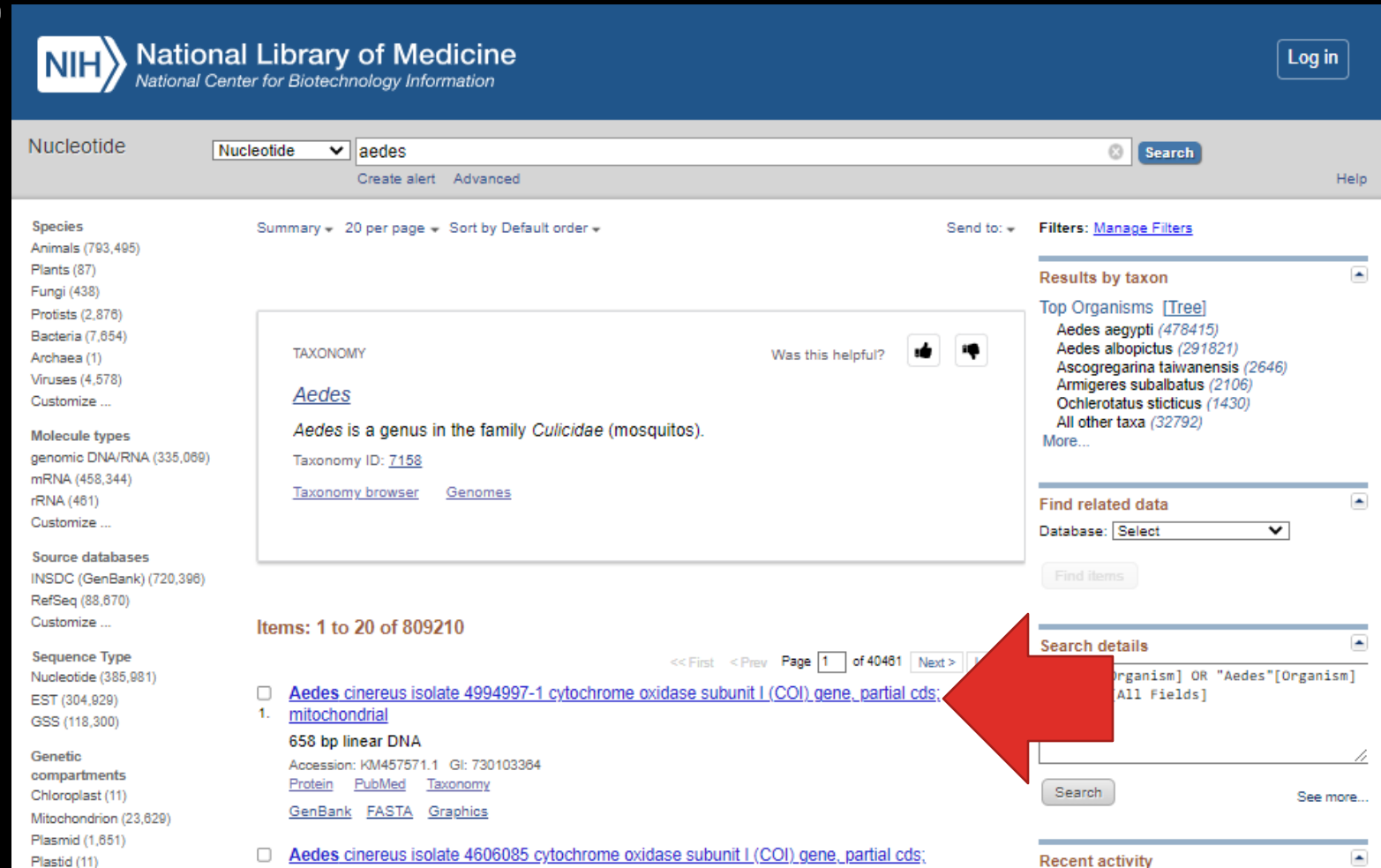
- Lakukan pencarian *complete genome* pada NCBI
- Pilih "**nucleotide**" dari menu drop down
- Ketik **genus organisme** target anda.
- Lalu lakukan pencarian dengan klik "**search**".



PENGUMPULAN SEKUEN GEN TARGET

Untuk merancang primer barkoding, gunakan *complete sequence* dari gen target.

Hindari *partial sequence* (panah)



PENGUMPULAN SEKUEN GEN TARGET

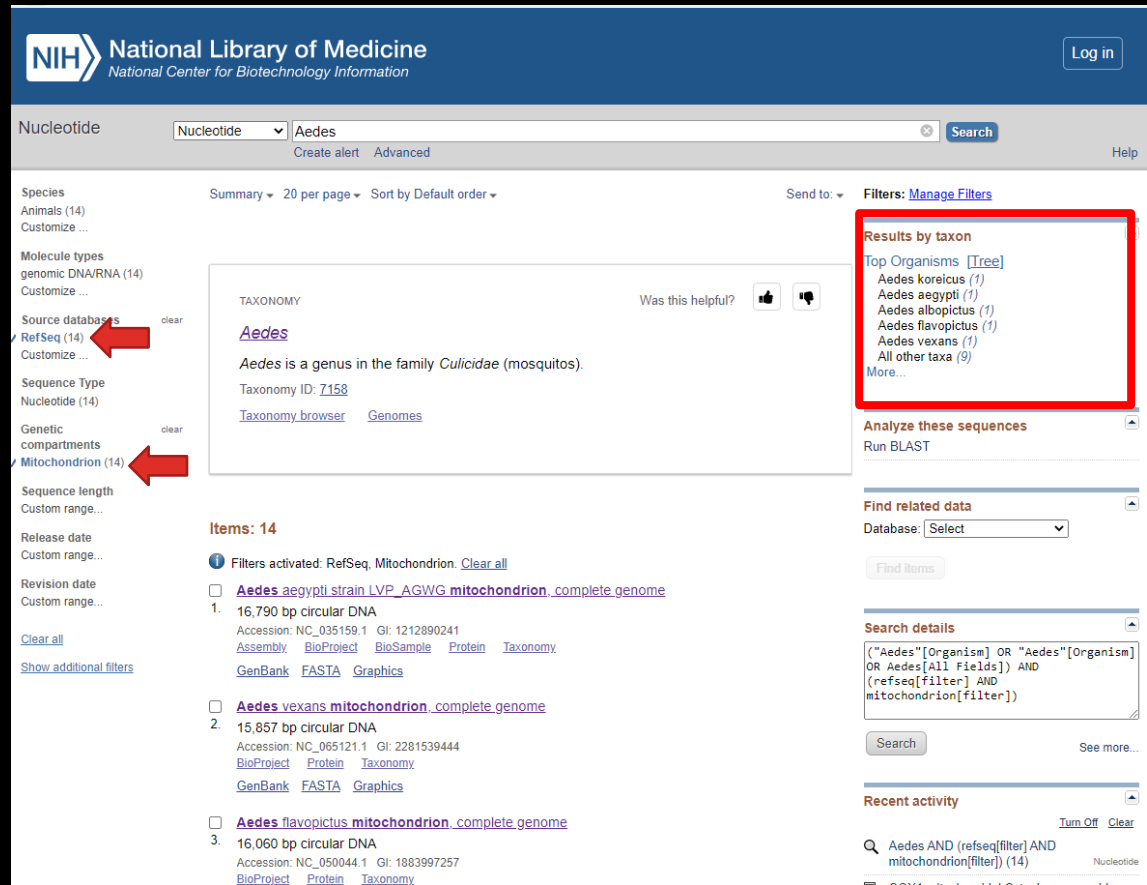
Lakukan penyaringan data dengan memilih menu yang ditunjuk oleh panah.

- **RefSeq** (dari menu source databases) dan
- **Mitochondrion** (dari menu genetic compartments)

Pada bagian kanan halaman hasil (kotak merah),

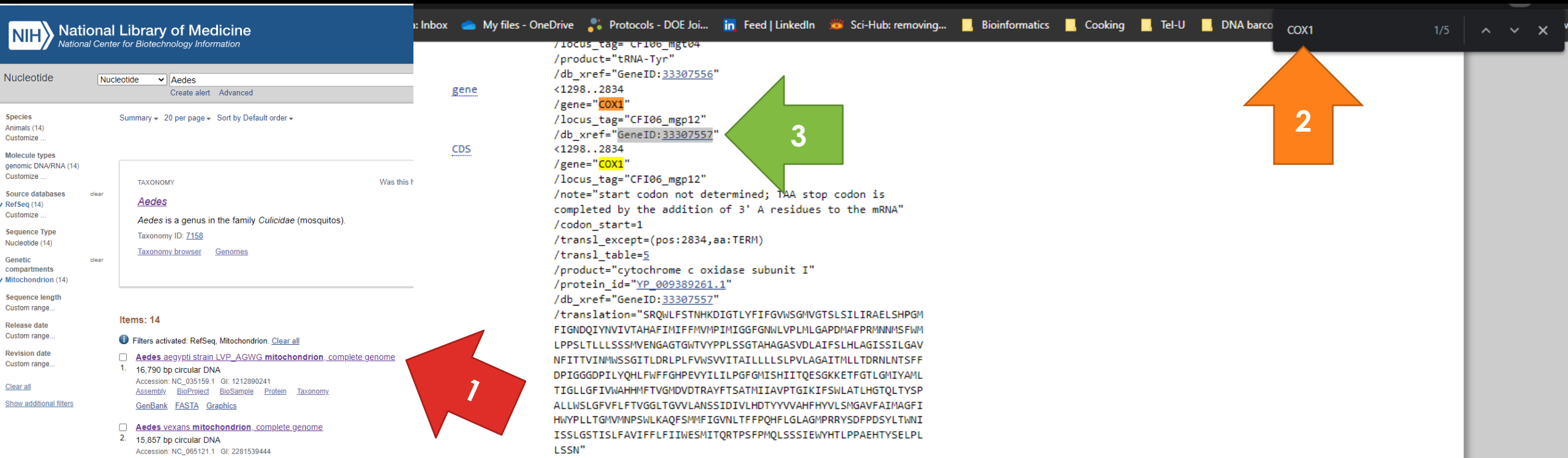
- Terdapat informasi mengenai spesies Aedes yang data *complete genome* dari gen COX1 sudah tersedia di NCBI.

- Unduh data complete sequence gen *COX1* dari beberapa spesies *Aedes*, misal: *A. aegypti* dan *A. albopictus*



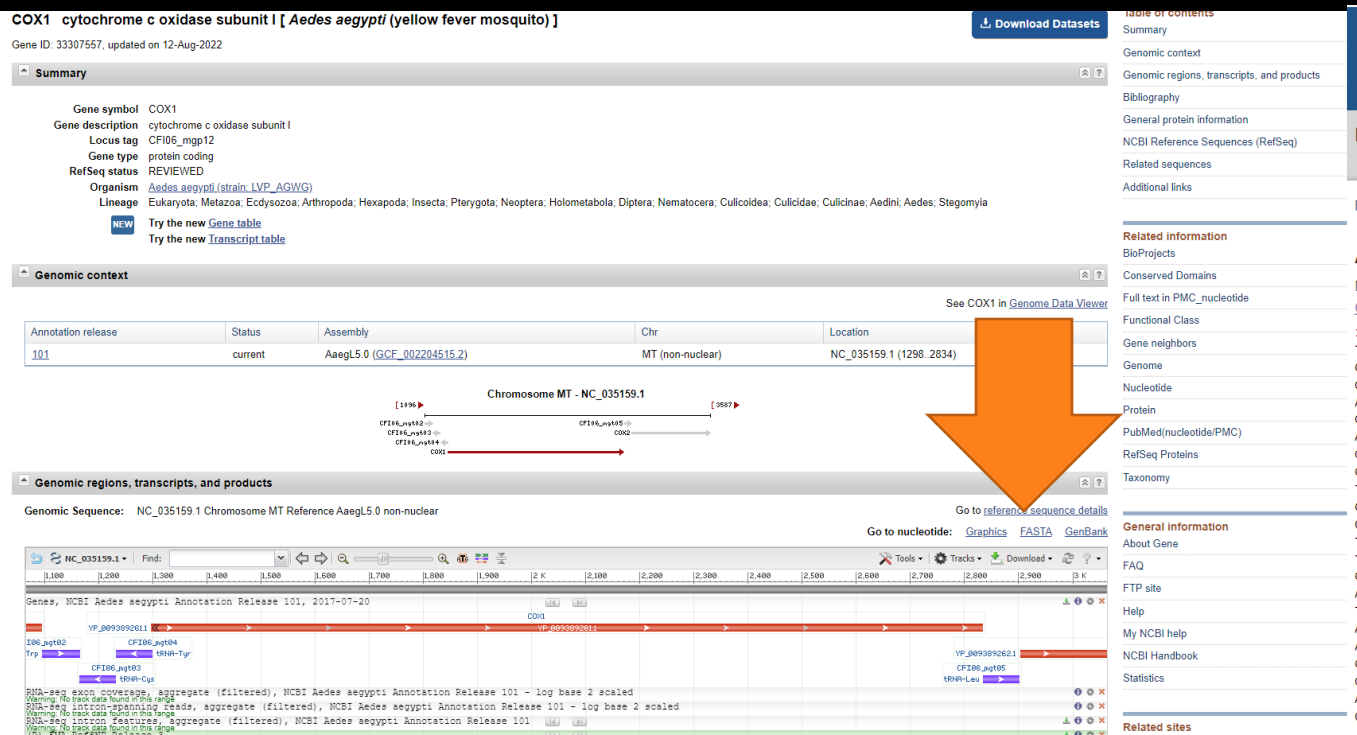
PENGUMPULAN SEKUEN GEN TARGET

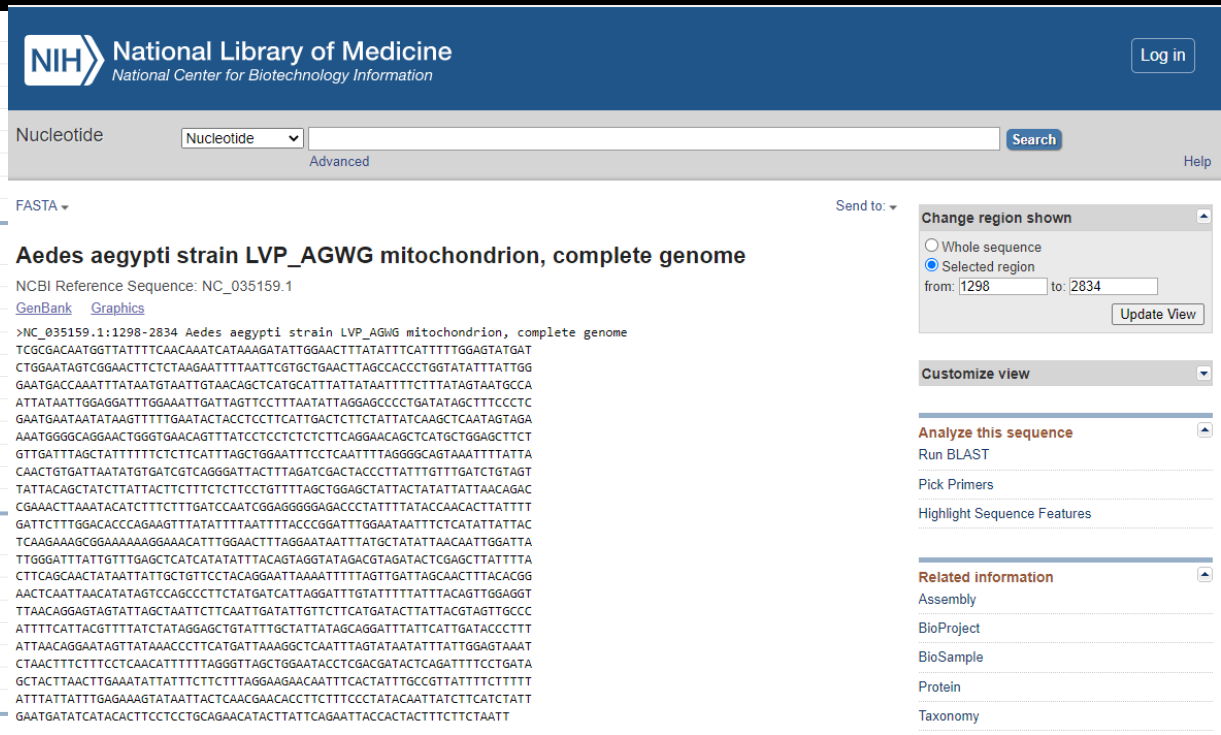
- Pilih salah satu hasil pencarian setelah disaring, misal “Aedes aegypti” (panah merah)
- Kemudian gunakan shortcut find (**Ctrl+F**) untuk mencari “COX1” (panah kuning),
- kemudian klik tautan **geneID** untuk gen COX1 (panah hijau).



PENGUMPULAN SEKUEN GEN TARGET

- Anda akan diarahkan ke halaman genome viewer yang menunjukkan lokasi COX1 pada genome nyamuk Aedes aegypti.
- Buka tautan FASTA pada tab baru (panah),
- Gambar kanan menunjukkan halaman FASTA seq COX1 organisme *Aeded aegypti*





PENGUMPULAN SEKUEN GEN TARGET

- Lakukan langkah yang sama untuk spesies nyamuk lainnya dan simpan sekuen fasta gen COX1 pada “notepad”.

Berikut beberapa complete sequences COX1 gene:

- Aedes aegypti: NC_035159 (location: 1298-2834)
- Aedes albopictus: NC_006817 (location: 1436-2972)

- Culex pipiens pallens: NC_015079 (location: 1446-2982)
- Culex quinquefasciatus: NC_014574 (location: 1446-2982)

- Anopheles cruzii: NC_04464 (location: 1445-2983)
- Anopheles gambiae: NC_002084 (location: 1424-2960)

PENGUMPULAN SEKUEN GEN TARGET

Tugas UAS (bagian 1):

- Cari dan tentukan kelompok organisme yang akan anda identifikasi menggunakan Teknik DNA Barkoding.
- Cari dan tentukan gen target yang sesuai untuk mengindentifikasi kelompok organisme tersebut.
- Kumpulkan sekuen gen target minimal dari 10 organisme yang ingin anda identifikasi.
- Simpan file dalam notepad.

PENGUMPULAN SEKUEN GEN TARGET

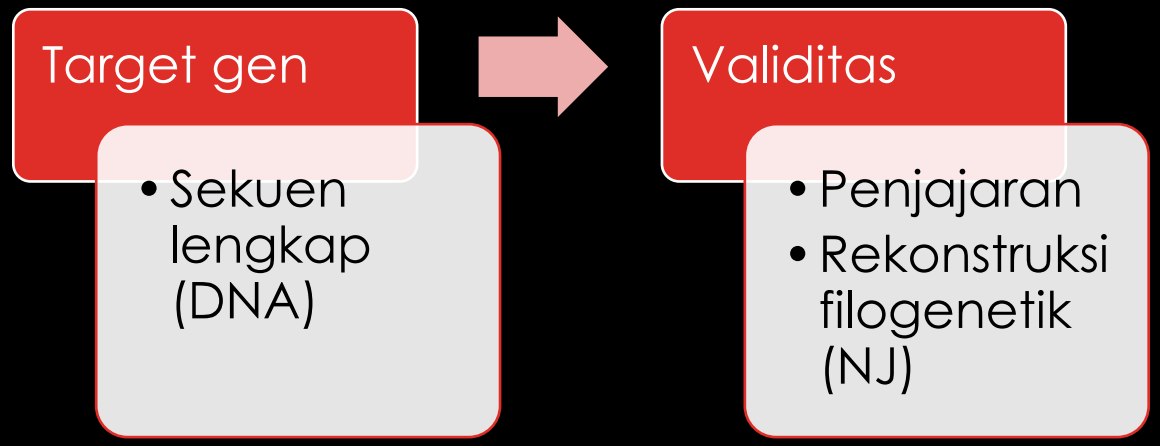
***Gold standard* daerah target** untuk barcoding diantaranya:

1. Hewan: *COX1* (cytochrome c oxidase 1)
2. Tumbuhan: *rbcL* (large subunit RuBisCo), *matK* (maturase K)

Slow evolving region: useful for distantly related taxa (genus, family, ordo)

Fast evolving region: needed when identifying more closely related species such as cryptic/sibling species groups.

VALIDASI TARGET GEN



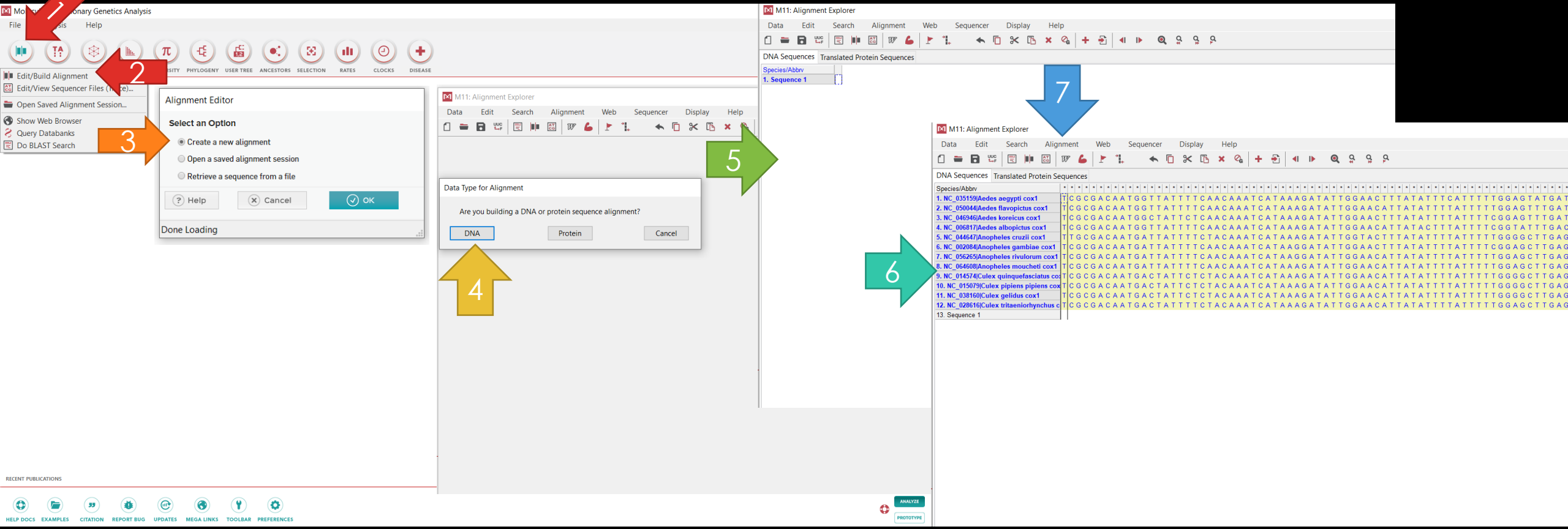
☐ Target gen

Periksa terlebih dahulu apakah gen terpilih dapat dipergunakan sebagai DNA barkode.

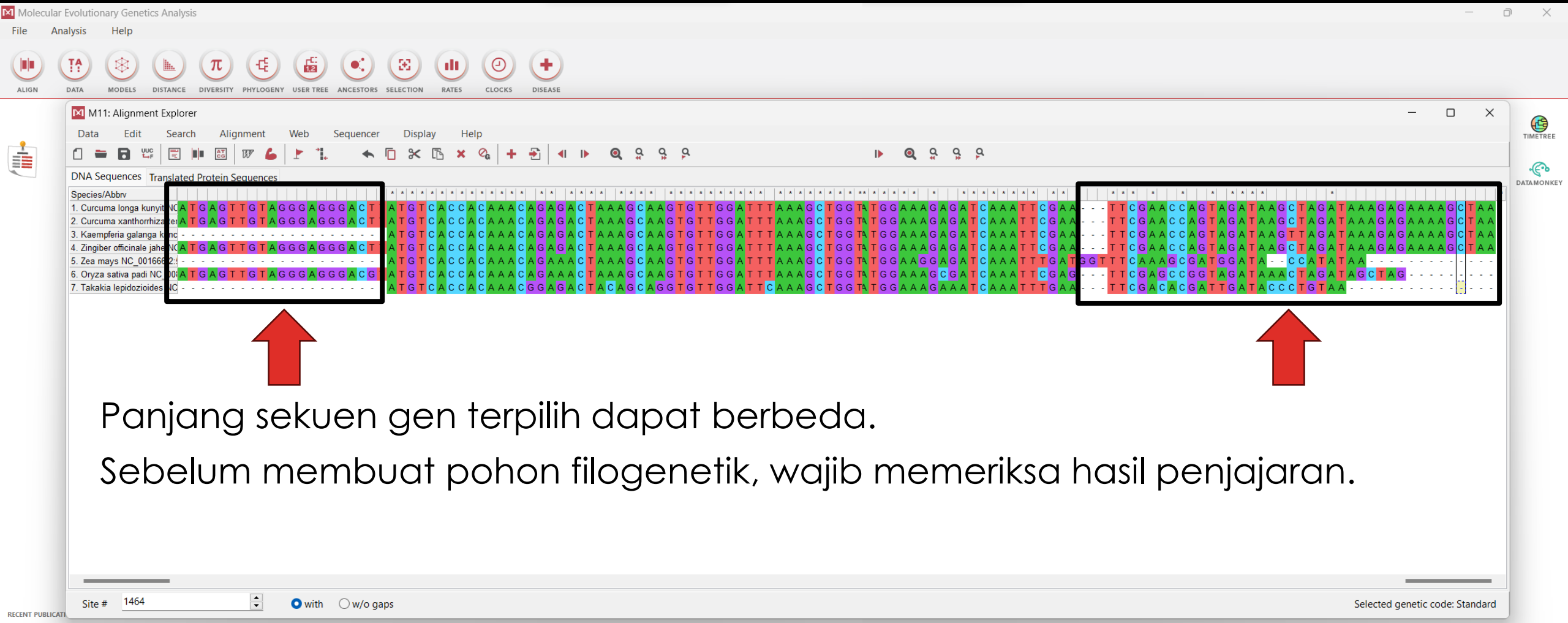
Lakukan **penjajaran** dan rekonstruksi **pohon filogenetik**.

2. PENJAJARAN SEKUENS DAN REKONSTRUKSI POHON FILOGENETIK

LANGKAH MELAKUKAN PENJAJARAN MENGGUNAKAN SOFTWARE MEGA



HASIL PENJAJARAN

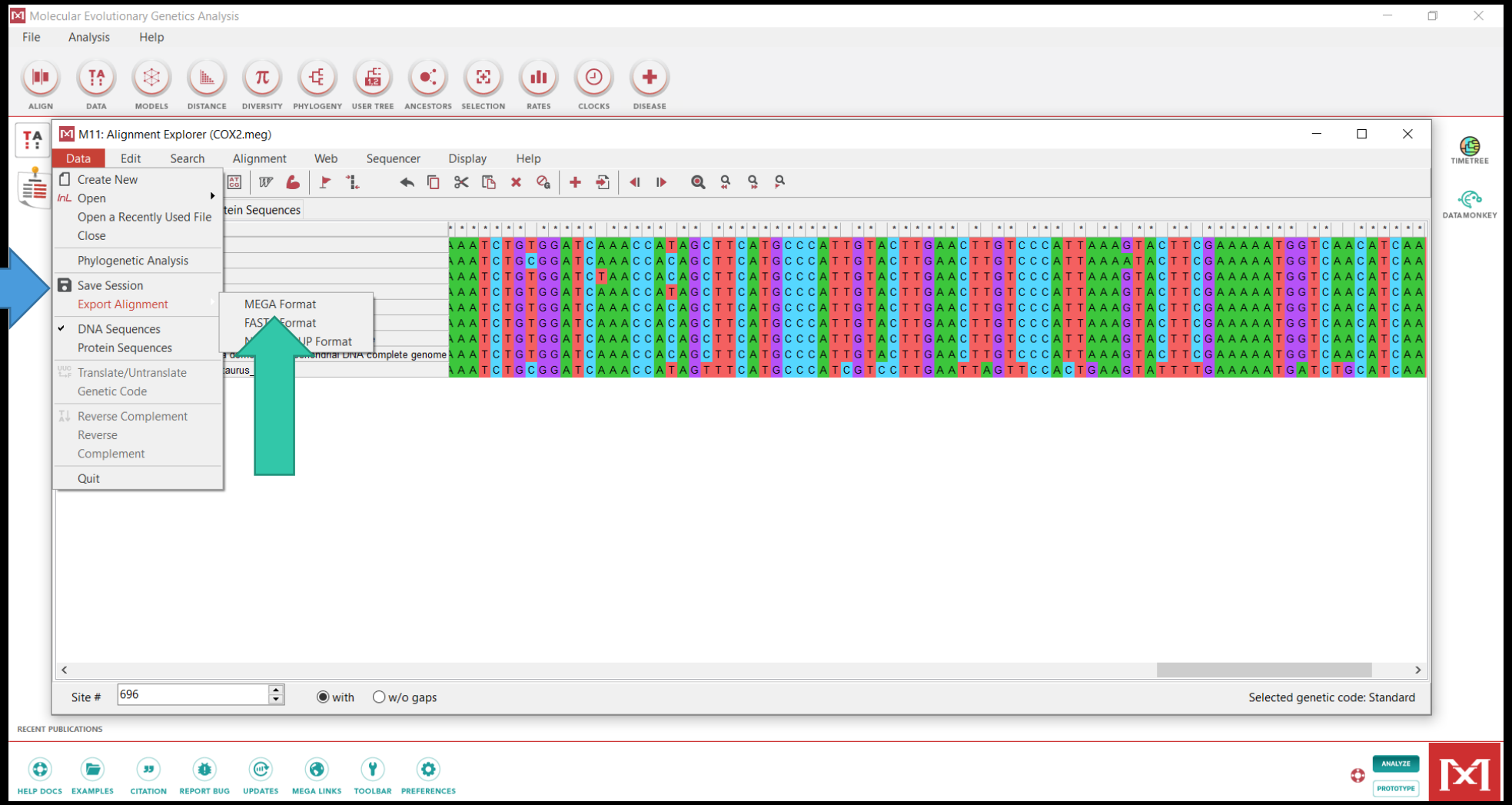


Panjang sekuen gen terpilih dapat berbeda.

Sebelum membuat pohon filogenetik, wajib memeriksa hasil penjajaran.

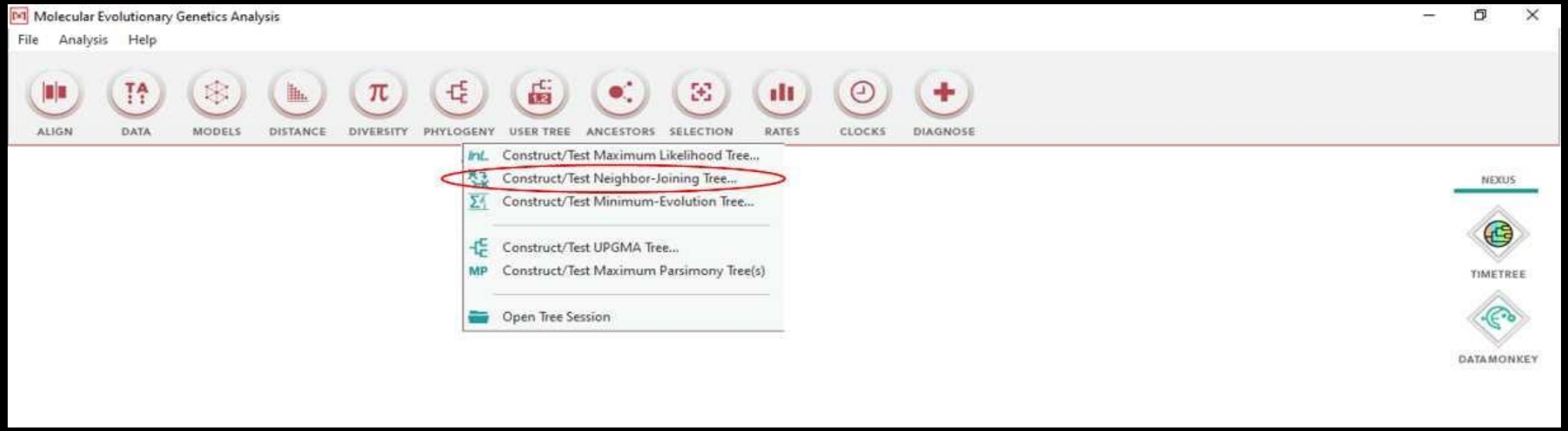
REKONSTRUKSI POHON FILOGENETIKA DENGAN MEGA SOFTWARE

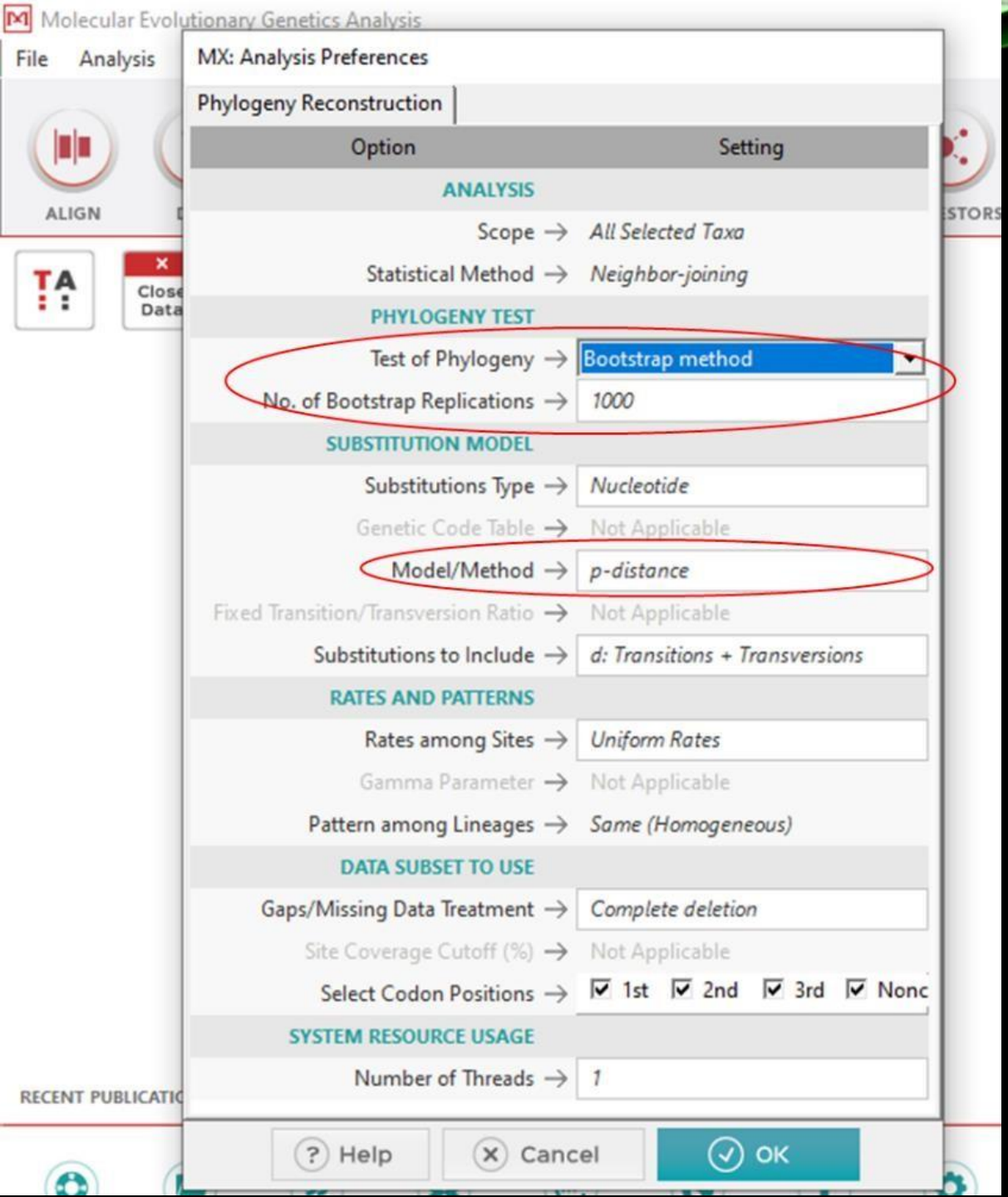
- Save/ export ke MEGA FORMAT



REKONSTRUKSI POHON FILOGENETIKA DENGAN MEGA SOFTWARE

Buka aplikasi MEGA X, Lalu pilih, menu **phylogeny**, kemudian pilih **construct/test Neighbor-Joining Tree**

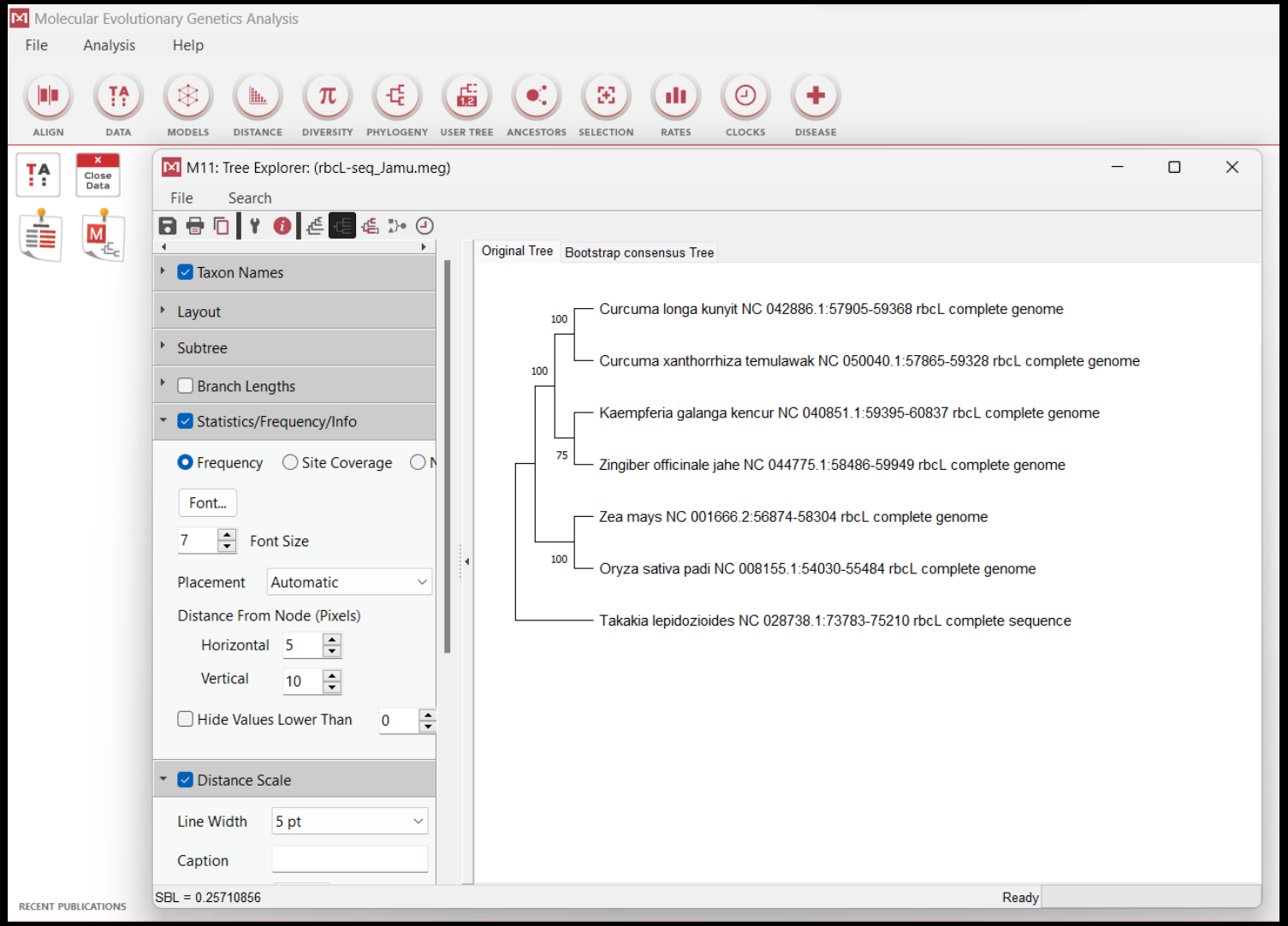




REKONSTRUKSI POHON FILOGENETIKA

- Pilih sekuen yang telah di jajarkan dalam bentuk format data MEGA.
- Kemudian pada menu **PHYLOGENY TEST** pilih **bootstrap method** dan **No. of bootstrap replications diisi 1000**.
- Pada menu **SUBSTITUTION MODEL** pilih model/method dengan **p-distance.** Biarkan parameter lain sesuai **default setting**.
- Pilih **OK**

HASIL REKONSTRUKSI POHON FILOGENETIK



- Spesies yang merupakan bahan baku jamu, terpisah dengan spesies “kontaminan”
- rbcL dapat digunakan untuk melakukan pengujian kontaminasi tepung beras/ tepung jagung dalam sediaan jamu.

SUMMARY

✓ Target gen

☐ Target region

Analisis hasil **penjajaran** untuk menemukan daerah **polimorfik**.

3. IDENTIFIKASI DAERAH POLIMORFIK

PENJAJARAN (*ALIGNMENT*)

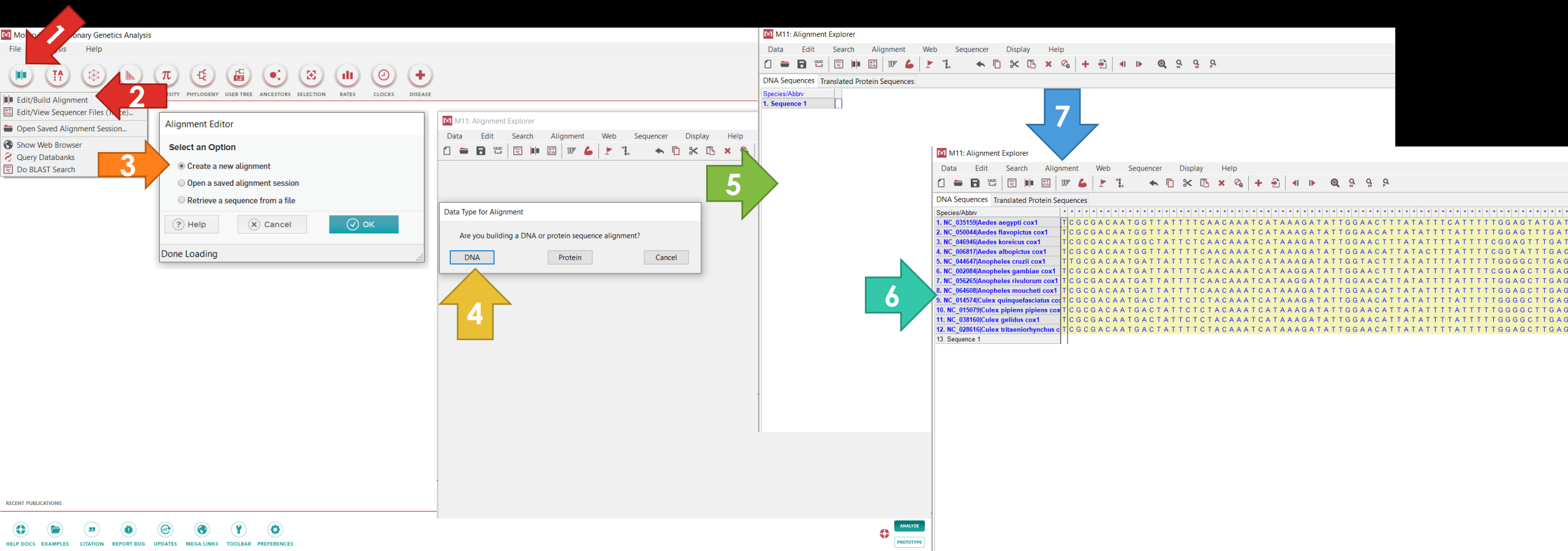
- Penjajaran sekuen (*alignment*) dilakukan untuk mengidentifikasi daerah lestari (*conserved region*) dan daerah polimorfik (*polymorphic region*).

  - Daerah lestari gen: memiliki sekuen DNA yang sama pada tingkatan taksonomi yang berbeda
  - Daerah polimorfik gen: daerah yang memiliki variasi sekuen DNA pada tingkatan taksonomi yang berbeda.

  - Primer di desain pada daerah yang lestari sehingga sepasang primer dapat dipergunakan untuk **mengamplifikasi DNA** dari beberapa organisme.
  - Urutan daerah polimorfik digunakan untuk **mengidentifikasi organisme**.

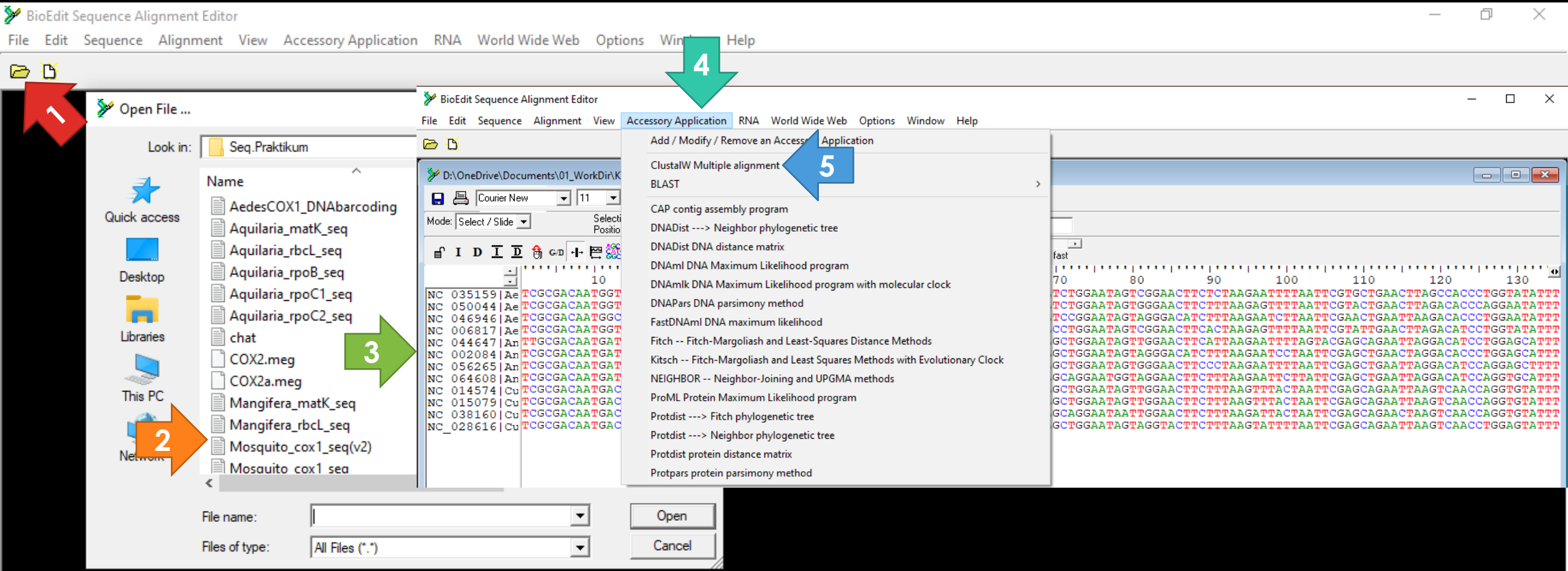
PENJAJARAN (*ALIGNMENT*)

Lakukan alignment/penjajaran pada sekuen gen COX1 yang sudah dikumpulkan, menggunakan tools **clustalW** pada software **MEGA**, BioEdit, atau **MUSCLE** (web-based tools).



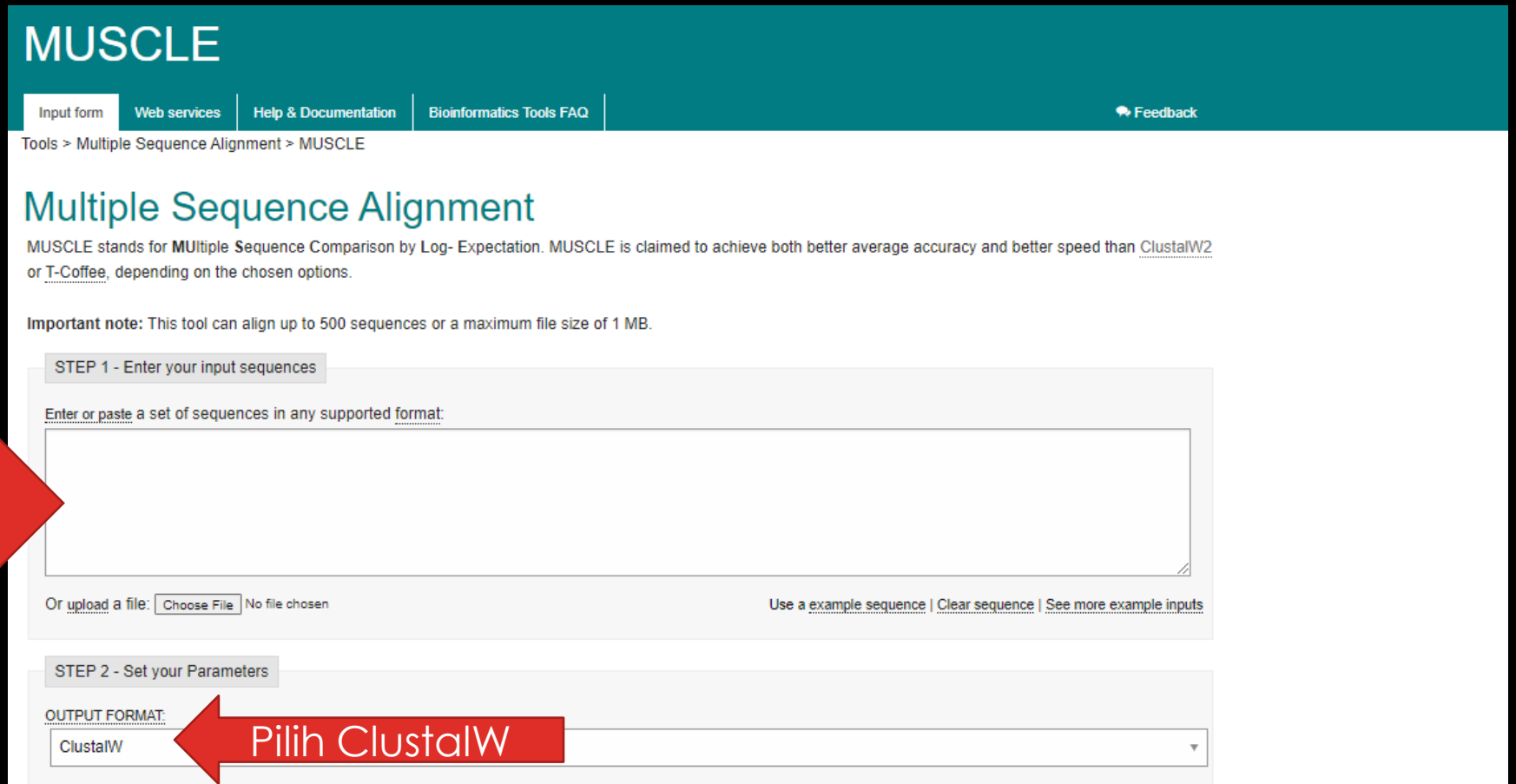
PENJAJARAN (*ALIGNMENT*)

Lakukan alignment/penjajaran pada sekuen gen COX1 yang sudah dikumpulkan, menggunakan tools **clustalW** pada software MEGA, **BioEdit**, atau **MUSCLE** (web-based tools).



PENJAJARAN (*ALIGNMENT*)

Lakukan alignment/penjajaran pada sekuen gen COX1 yang sudah dikumpulkan, menggunakan tools **clustalW** pada software MEGA, BioEdit, atau **MUSCLE** (web-based tools).



PENJAJARAN (*ALIGNMENT*)

Identifikasi daerah lestari (*conserved*) yang mengapit daerah polimorfisme.

PENJAJARAN SEKUEN

Tugas UAS (bagian 2):

Lakukan penjajaran sekuen gen target pilihan anda menggunakan:

1. Offline tools (installation needed): Mega, BioEdit
2. Web based tools provided by ebi.ac uk
   - MUSCLE: https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/
   - Clustal omega: https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/

SUMMARY

Target gen
- Sekuen lengkap (DNA)

Validitas
- Penjajaran
- Rekonstruksi filogenetik (NJ)

Target region
- Daerah polimorfik vs. Lestari

Desain primer
- Pasangan primer mengapit target region

✓ Target gen

✓ Target region

☐ Desain primer untuk amplifikasi target region

DESAIN PRIMER

Primer adalah urutan sekuen nukleotida pendek (18-30 basa) yang biasanya Digunakan untuk amplifikasi sekuen DNA spesifik secara *in vitro* pada proses *polymerase chain reaction* (PCR)

Desain Primer dapat dilakukan dengan menggunakan software bioinformatik. Bisa menggunakan software berbasis web atau pun perangkat lunak yang di install pada komputer

TAHAP DESAIN PRIMER

1. Menentukan dan mencari sekuen DNA target: gen, intergenic, ekson, intron, UTR
2. Penjajaran (*alignment*) sekuen DNA
3. Menentukan daerah DNA yang akan diamplikasi: *polymorphic region*
4. Uji kualitas primer yang telah didesain
5. Uji spesifisitas primer yang telah di desain (*in silico* PCR)

What makes a good primer?

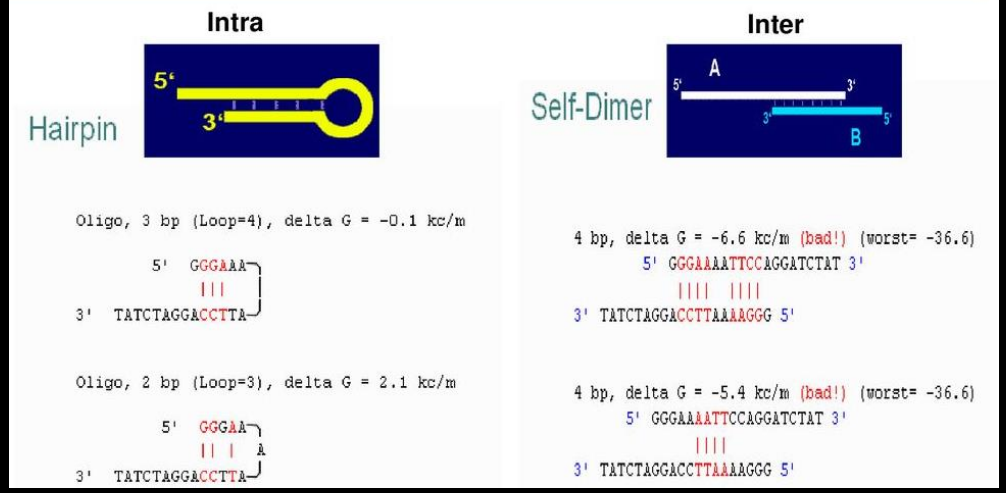
Primer length: 18–22bp

Too small a qPCR primer (<18bp) can increase the likelihood that it will bind to elsewhere in the genome, ie it is not specific enough to the target of interest. Otherwise, too large a qPCR primer (>22bp) can raise the primer melting temperature (Tm) which will impact on the annealing temperature and primer binding properties of the reaction.

Tm: 59–65°C

GC content: 50–60%

Examples of Primer-Dimer Formation



The primer pair is specific to the target of interest

Primers contain a GC clamp

Another feature which I like to include in both my primers is a GC clamp. Simply, a GC clamp is the presence of either a guanine (G) or cytosine (C) base in the last 5 bases of the primer.

The reasoning behind using a GC clamp in primers is the fact that G and C bases contain stronger hydrogen bonds, compare with adenine (A) and thymine (T) bases. Therefore, by including at least one G or C base towards the end of the primer will ensure it binds completely to the template sequence.

Other examples of a GC clamp (in red) in PCR primers include are listed below.

- 5′-CTCTGTAGGGTCGCGA**C**TA**C**-3′
- 5′-CGCTACCACCATCGATT**G**AT-3′
- 5′-GGATCTGGCTGCATG**C**TAT**G**-3′

Notice that it does not matter where in the last 5 bases the G or C base is in order for them to be referred to as a GC clamp.

Avoid nucleotide repeats

SOFTWARE DESAIN PRIMER

Software **berbasis web** yang dapat digunakan untuk desain primer

- **Primer-Blast (NCBI)**
- **Primer3**
- GenScript
- PerlPrimer
- RExPrimer

Software pada **personal komputer** yang digunakan untuk desain primer

- PrimerSelect
- PrimerPremier6
- Fast PCR
- PrimerDesign
- Oligo 6
- Geneious

WEBPAGE DESAIN PRIMER

- Pencarian data sekuen gen target:
  - NCBI: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
- Desain primer:
  - NCBI primer BLAST: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome
  - Primer3 Plus: https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi
- Quality check kandidat primer:
  - OligoAnalyzer: https://sg.idtdna.com/
  - Beacon designer: http://www.premierbiosoft.com/qOligo/Oligo.jsp?PID=1
  - NCBI primer BLAST

WHAT DO YOU NEED HELP WITH?

Techniques

Helpful advice on lab techniques

VIEW

Lab Recipes

Learn how to create solutions

VIEW

Stats & Maths

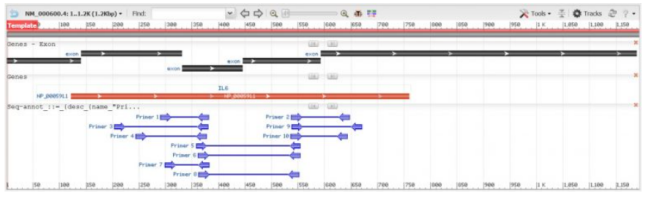
Guides on all things maths

VIEW

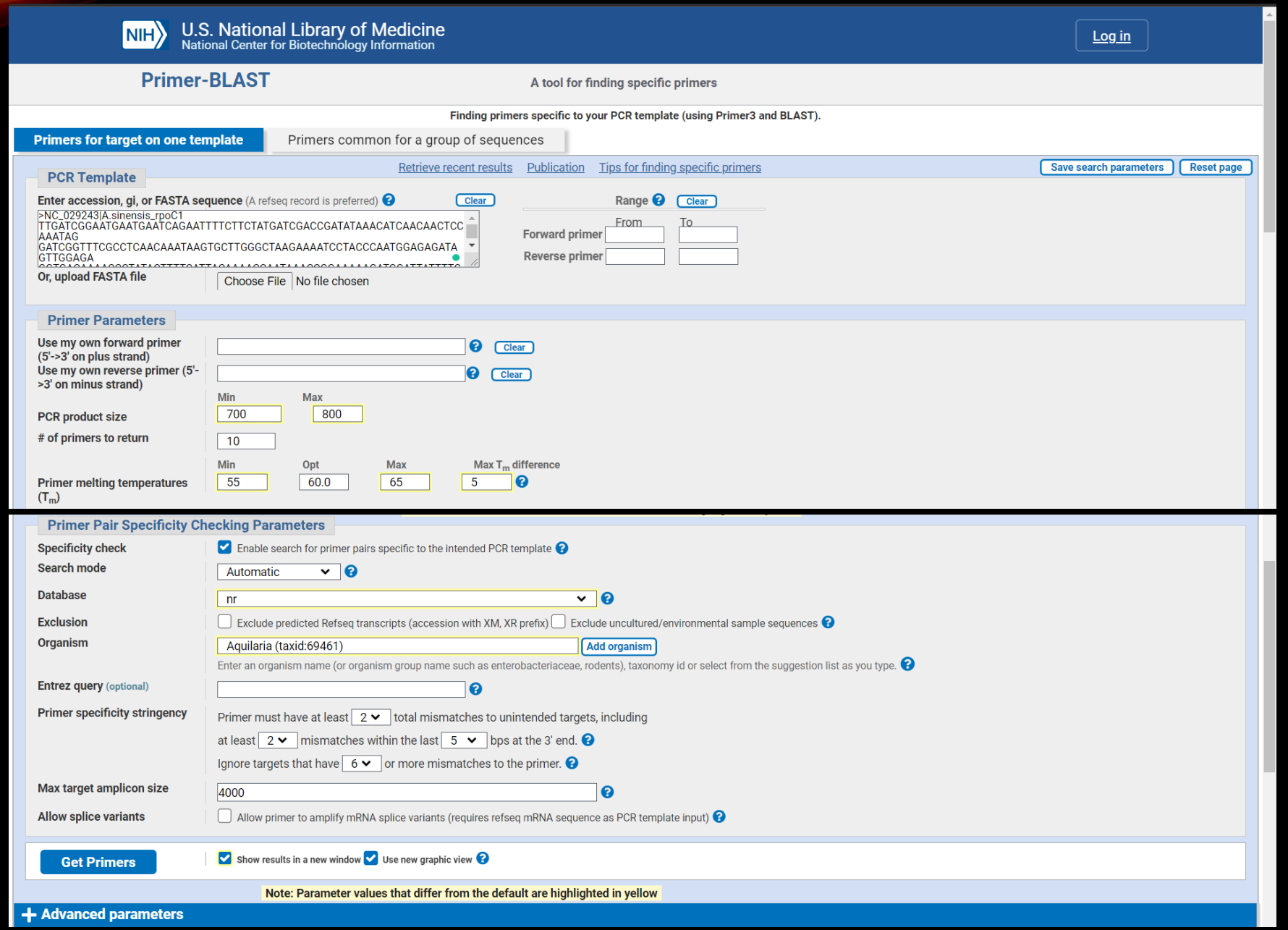
13 Free PCR Primer Design Programs

Gone are the days where you have to design primers by hand. Instead, we have a plethora of excellent resources available that utilises complex algorithms to determine the optimal primers for your PCR reaction. These give the best theoretical chance of your PCR reaction working, thus saving time and money. Best of all, the majority of them are free to use or download. Here is a list of 13 free primer design programs to use when designing primers:

1 Primer-BLAST



Desain primer dengan primer-BLAST



Desain primer dengan primer-BLAST

U.S. National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

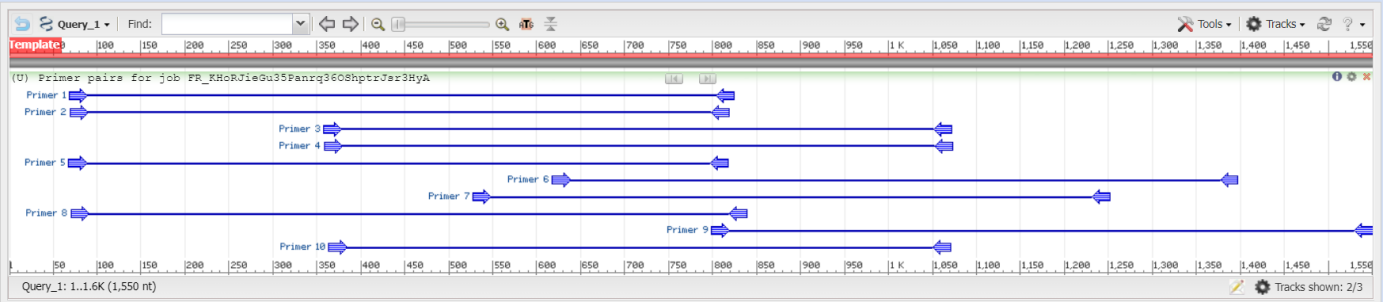
Log in

Primer-BLAST » JOB ID:FR_KHoRJieGu35Panrq36OShptrJsr3HyA

Primer-BLAST Results

Input PCR template	NC_029243|A.sinensis_rpoC1
Range	1 - 1550
Specificity of primers	Primers may **not** be specific to the input PCR template as targets were found in selected database:Nucleotide collection (nt) (Organism limited to Aquilaria)...help on specific primers
Other reports	▹Search Summary

— Graphical view of primer pairs



— Detailed primer reports

You can re-search for specific primers by accepting some of the unintended targets, check the box(es) next to the ones you accept and try again to re-search for specific primers Submit

Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AGGATCGGTTTCGCCTCAAC	Plus	20	69	88	60.39	55.00	4.00	3.00
Reverse primer	ACCTCGACGGTTATACCCCA	Minus	20	824	805	60.03	55.00	6.00	2.00
Product length	756								

Products on intended targets

>MN720647.1 Aquilaria sinensis chloroplast, complete genome

```
product length = 756
Forward primer  1      AGGATCGGTTTCGCCTCAAC  20
Template        25085  ....................  25066

Reverse primer  1      ACCTCGACGGTTATACCCCA  20
Template        24330  ....................  24349
```

Products on potentially unintended templates

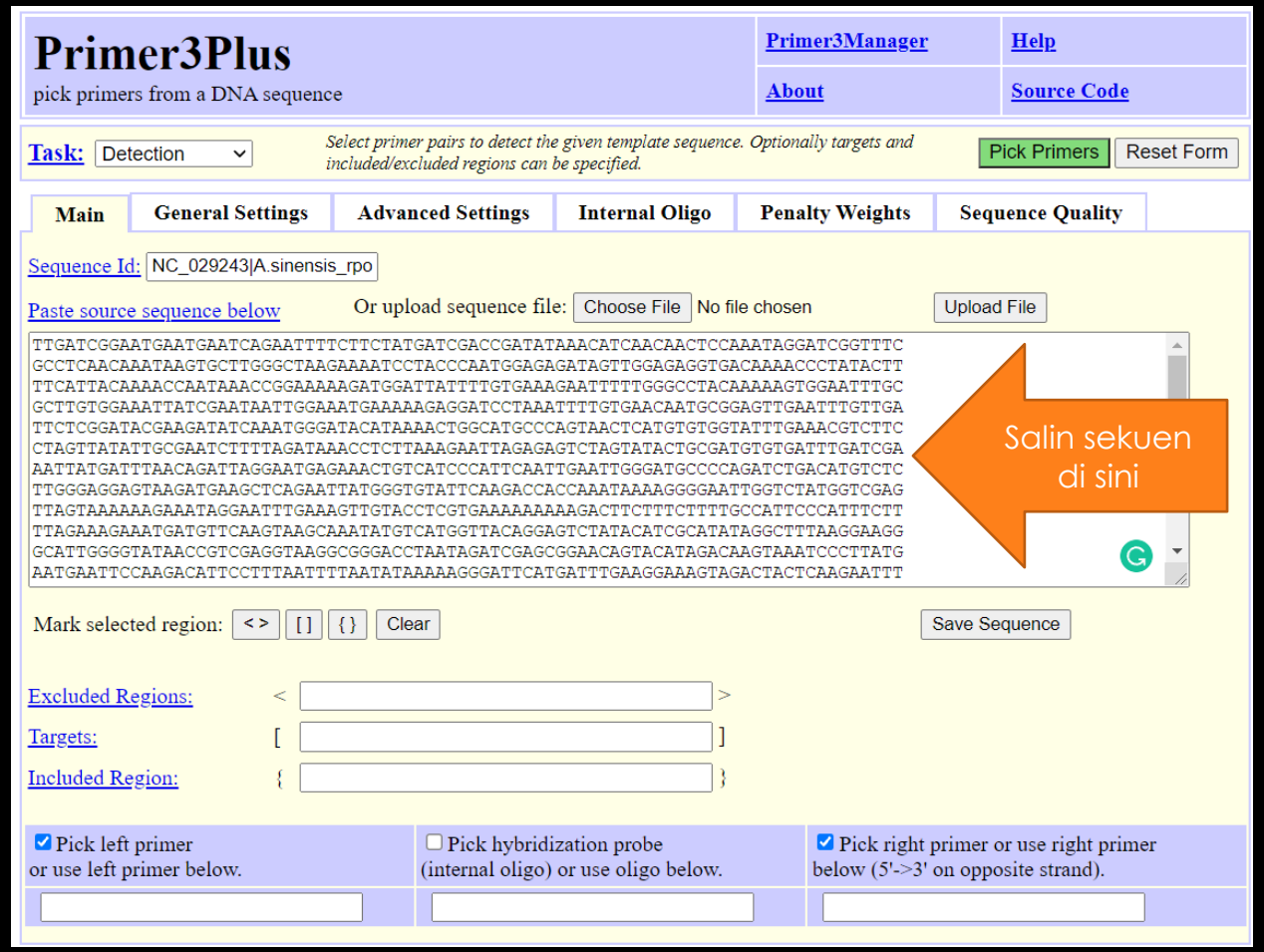
☐ > NC_052859.1 Aquilaria subintegra chloroplast, complete genome

```
product length = 761
Forward primer  1      AGGATCGGTTTCGCCTCAAC  20
Template        25070  ....................  25051

Reverse primer  1      ACCTCGACGGTTATACCCCA  20
Template        24310  ....................  24329
```

TAHAP DESAIN PRIMER: PRIMER3PLUS

- Buka website Primer3Plus
- Copy-paste salah satu sekuen gen COX1 ke kotak sekuen yang disediakan.

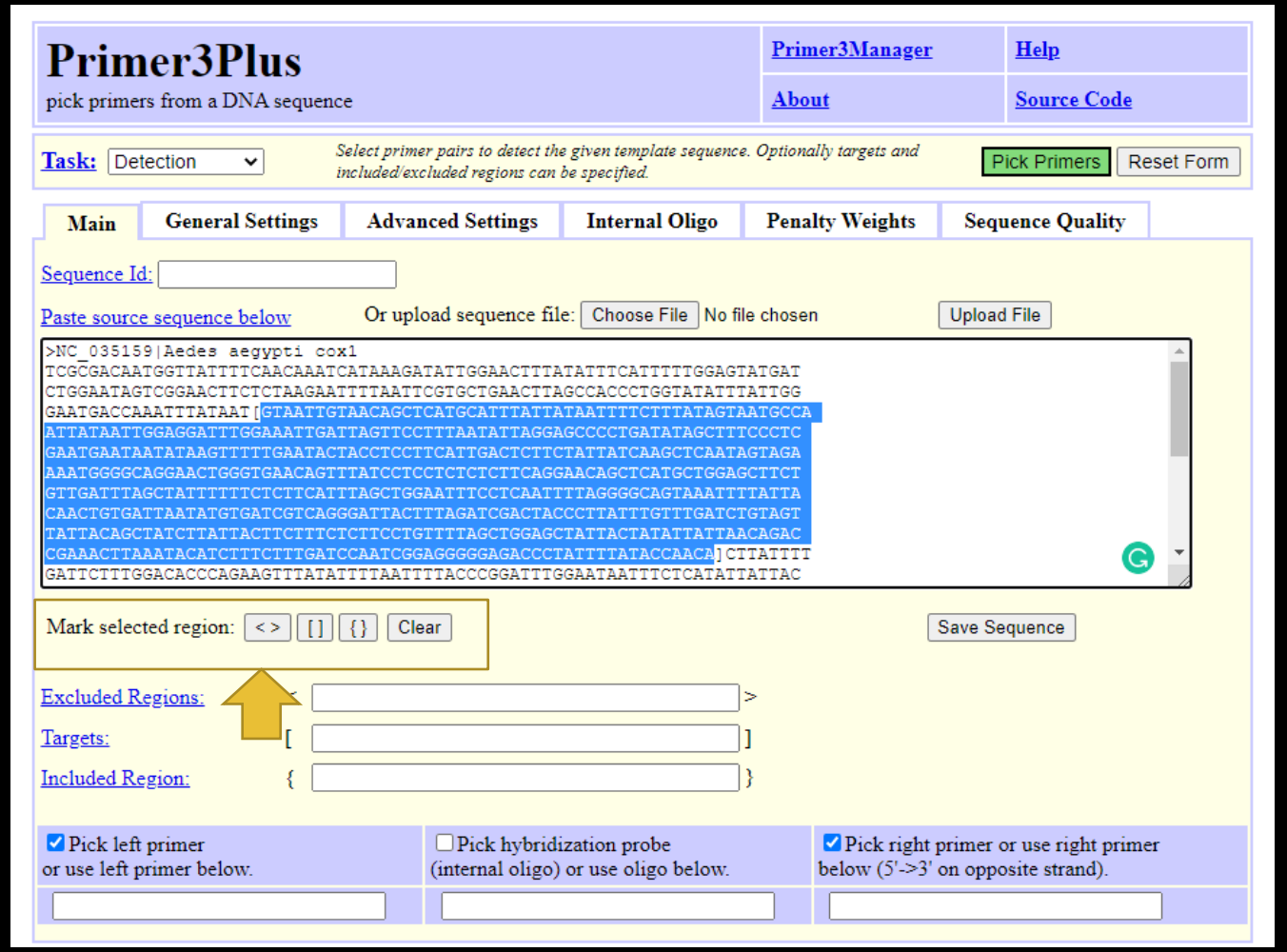


TAHAP DESAIN PRIMER: PRIMER3PLUS

- Pada primer3plus, daerah target dapat ditandai dengan mengapit sekuen dengan tanda “[ ]”

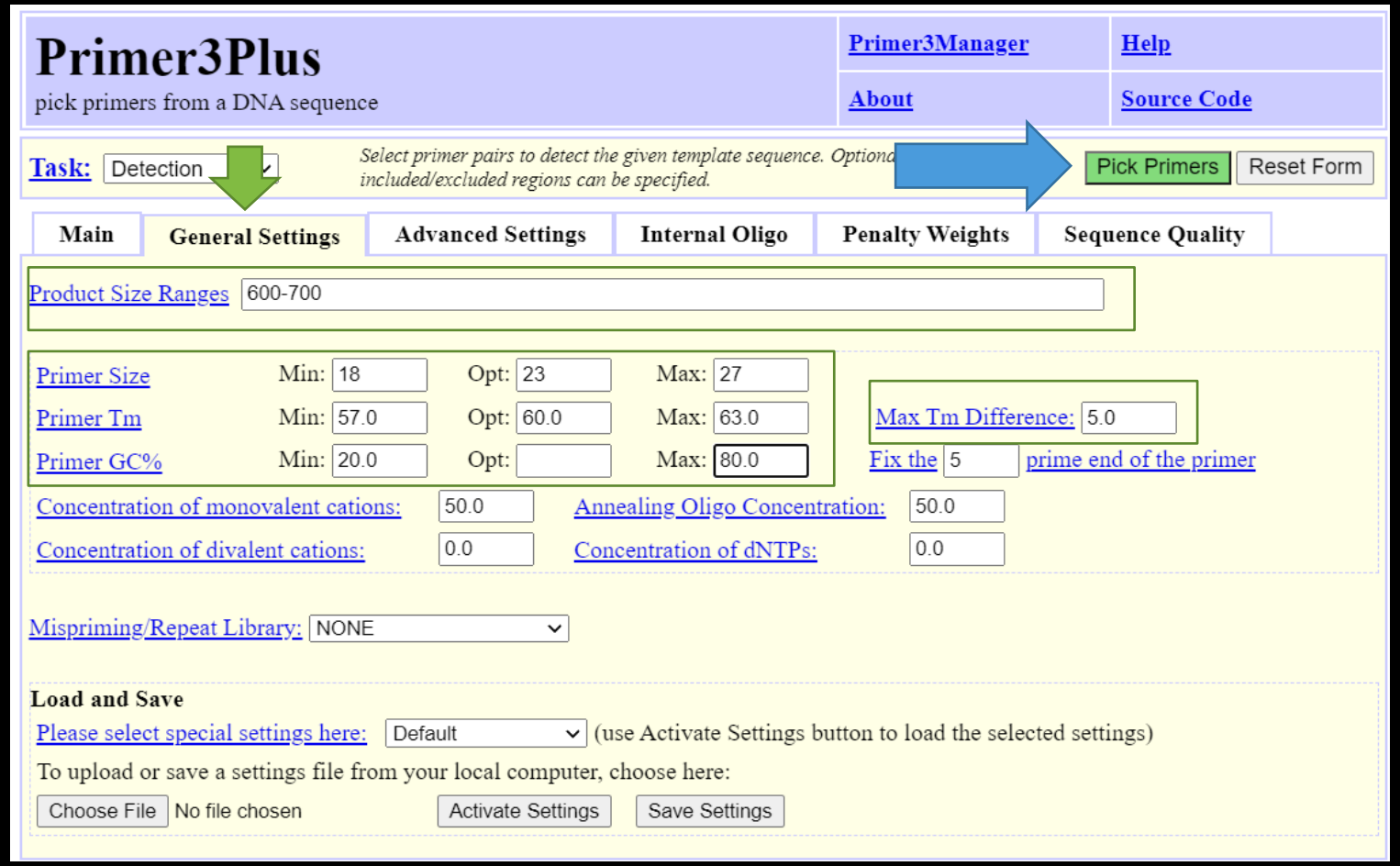
- < > : excluded region
- [ ] : target region
- { } : included region

- *Note: gunakan shortcut Ctrl+F untuk mencari sekuen target anda*



TAHAP DESAIN PRIMER: PRIMER3PLUS

- Pilih general, tentukan:
  - ✓ Ukuran produk PCR
  - ✓ Panjang primer,
  - ✓ Tm,
  - ✓ GC% dan max. Tm Difference
- Klik [*pick primers*]



TAHAP DESAIN PRIMER: PRIMER3PLUS

Primer3 akan memberikan beberapa kandidat primer (biasanya 5 pasang primer). Seleksi lebih lanjut dilakukan dengan mencari primer yang memenuhi kriteria dan *target-specific*

Primer3Plus
pick primers from a DNA sequence

Primer3Manager | Help | About | Source Code

< Back

Pair 1:

Left Primer 1: NC_035159|Aedes aegypti cox1_F
Sequence: TTTAATTCGTGCTGAACTTAGCC
Start: 99 Length: 23 bp Tm: 59.8 °C GC: 39.1 % ANY: 5.0 SELF: 3.0

Right Primer 1: NC_035159|Aedes aegypti cox1_R
Sequence: AGAAATTATTCCAAATCCGGGTA
Start: 759 Length: 23 bp Tm: 59.9 °C GC: 34.8 % ANY: 5.0 SELF: 2.0

Product Size: 661 bp Pair Any: 5.0 Pair End: 3.0

Send to Primer3Manager | Reset Form

```
1     TCGCGACAAT  GGTTATTTTC  AACAAATCAT  AAAGATATTG  GAACTTTATA
51    TTTCATTTTT  GGAGTATGAT  CTGGAATAGT  CGGAACTTCT  CTAAGAATTT
101   TAATTCGTGC  TGAACTTAGC  CACCCTGGTA  TATTTATTGG  GAATGACCAA
151   ATTTATAATG  TAATTGTAAC  AGCTCATGCA  TTTATTATAA  TTTTCTTTAT
201   AGTAATGCCA  ATTATAATTG  GAGGATTTGG  AAATTGATTA  GTTCCTTTAA
251   TATTAGGAGC  CCCTGATATA  GCTTTCCCTC  GAATGAATAA  TATAAGTTTT
301   TGAATACTAC  CTCCTTCATT  GACTCTTCTA  TTATCAAGCT  CAATAGTAGA
351   AAATGGGGCA  GGAACTGGGT  GAACAGTTTA  TCCTCCTCTC  TCTTCAGGAA
401   CAGCTCATGC  TGGAGCTTCT  GTTGATTTAG  CTATTTTTTC  TCTTCATTTA
451   GCTGGAATTT  CCTCAATTTT  AGGGGCAGTA  AATTTTATTA  CAACTGTGAT
501   TAATATGTGA  TCGTCAGGGA  TTACTTTAGA  TCGACTACCC  TTATTTGTTT
551   GATCTGTAGT  TATTACAGCT  ATCTTATTAC  TTCTTTCTCT  TCCTGTTTTA
601   GCTGGAGCTA  TTACTATATT  ATTAACAGAC  CGAAACTTAA  ATACATCTTT
651   CTTTGATCCA  ATCGGAGGGG  GAGACCCTAT  TTTATACCAA  CACTTATTTT
701   GATTCTTTGG  ACACCCAGAA  GTTTATATTT  TAATTTTACC  CGGATTTGGA
751   ATAATTTCTC  ATATTATTAC  TCAAGAAAGC  GGAAAAAAGG  AAACATTTGG
801   AACTTTAGGA  ATAATTTATG  CTATATTAAC  AATTGGATTA  TTGGGATTTA
851   TTGTTTGAGC  TCATCATATA  TTTACAGTAG  GTATAGACGT  AGATACTCGA
901   GCTTATTTTA  CTTCAGCAAC  TATAATTATT  GCTGTTCCTA  CAGGAATTAA
951   AATTTTTAGT  TGATTAGCAA  CTTTACACGG  AACTCAATTA  ACATATAGTC
1001  CAGCCCTTCT  ATGATCATTA  GGATTTGTAT  TTTTATTTAC  AGTTGGAGGT
1051  TTAACAGGAG  TAGTATTAGC  TAATTCTTCA  ATTGATATTG  TTCTTCATGA
1101  TACTTATTAC  GTAGTTGCCC  ATTTTCATTA  CGTTTTATCT  ATAGGAGCTG
1151  TATTTGCTAT  TATAGCAGGA  TTTATTCATT  GATACCCTTT  ATTAACAGGA
1201  ATAGTTATAA  ACCCTTCATG  ATTAAAGGCT  CAATTTAGTA  TAATATTTAT
```

Pair 2:
Left Primer 2: NC_035159|Aedes aegypti cox1_1_F
Sequence: TTTAATTCGTGCTGAACTTAGCC
Start: 99 Length: 23 bp Tm: 59.8 °C GC: 39.1 % ANY: 5.0 SELF: 3.0
Right Primer 2: NC_035159|Aedes aegypti cox1_1_R
Sequence: AATTATTCCAAATCCGGGTAAAA
Start: 756 Length: 23 bp Tm: 59.8 °C GC: 30.4 % ANY: 5.0 SELF: 0.0
Product Size: 658 bp Pair Any: 5.0 Pair End: 2.0
Send to Primer3Manager | Reset Form

Pair 3:
Left Primer 3: NC_035159|Aedes aegypti cox1_2_F
Sequence: TTTAATTCGTGCTGAACTTAGCC
Start: 99 Length: 23 bp Tm: 59.8 °C GC: 39.1 % ANY: 5.0 SELF: 3.0
Right Primer 3: NC_035159|Aedes aegypti cox1_2_R
Sequence: AAATTATTCCAAATCCGGGTAAA
Start: 757 Length: 23 bp Tm: 59.8 °C GC: 30.4 % ANY: 5.0 SELF: 0.0
Product Size: 659 bp Pair Any: 5.0 Pair End: 3.0
Send to Primer3Manager | Reset Form

Pair 4:
Left Primer 4: NC_035159|Aedes aegypti cox1_3_F
Sequence: AGCCACCCTGGTATATTTATTGG
Start: 118 Length: 23 bp Tm: 60.3 °C GC: 43.5 % ANY: 4.0 SELF: 0.0
Right Primer 4: NC_035159|Aedes aegypti cox1_3_R
Sequence: AGAAATTATTCCAAATCCGGGTA
Start: 759 Length: 23 bp Tm: 59.9 °C GC: 34.8 % ANY: 5.0 SELF: 2.0
Product Size: 642 bp Pair Any: 6.0 Pair End: 0.0
Send to Primer3Manager | Reset Form

SESUAIKAN PRIMER SETTINGS HINGGA DIPEROLEH PASANGAN PRIMER YANG MEMENUHI KRITERIA

Primer3Plus
pick primers from a DNA sequence

Primer3Manager | Help | About | Source Code

Task: Detection

Select primer pairs to detect the given template sequence. Optionally targets and included/excluded regions can be specified.

Pick Primers | Reset Fo

Main | **General Settings** | **Advanced Settings** | **Internal Oligo** | **Penalty Weights** | **Sequence Quality**

Product Size Ranges: 700-800

	Min:	Opt:	Max:	
Primer Size	18	23	27	
Primer Tm	55	60.0	65	Max Tm Difference: 5.0
Primer GC%	40		70	Fix the 5 prime end of the primer

Concentration of monovalent cations: 50.0 — Annealing Oligo Concentration: 50.0

Concentration of divalent cations: 0.0 — Concentration of dNTPs: 0.0

Mispriming/Repeat Library: NONE

Load and Save

Please select special settings here: Default (use Activate Settings button to load the selected settings)

To upload or save a settings file from your local computer, choose here:

Choose File | No file chosen | Activate Settings | Save Settings

Primer3Plus
pick primers from a DNA sequence

Primer3Manager | Help | About | Source Code

< Back

Pair 1:

Left Primer 1: NC_035159|Aedes aegypti cox1_F
Sequence: AGCCACCCTGGTATATTTATTGG
Start: 118 Length: 23 bp Tm: 60.3 °C GC: 43.5 % ANY: 4.0 SELF: 0.0

Right Primer 1: NC_035159|Aedes aegypti cox1_R
Sequence: GCTCGAGTATCTACGTCTATACCTACT
Start: 902 Length: 27 bp Tm: 57.2 °C GC: 44.4 % ANY: 8.0 SELF: 3.0

Product Size: 785 bp Pair Any: 6.0 Pair End: 1.0

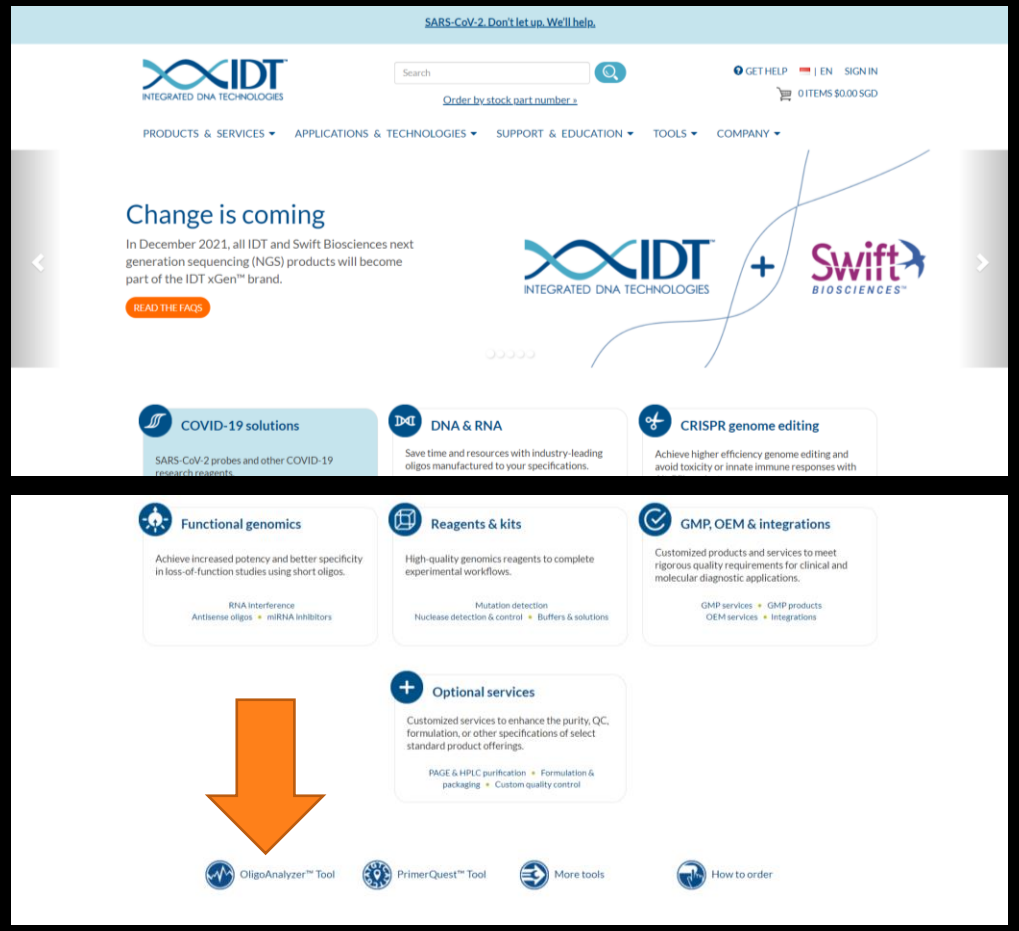
Send to Primer3Manager | Reset Form

```
1     TCGCGACAAT GGTTATTTTC AACAAATCAT AAAGATATTG GAACTTTATA
51    TTTCATTTTT GGAGTATGAT CTGGAATAGT CGGAACTTCT CTAAGAATTT
101   TAATTCGTGC TGAACTTAGC CACCCTGGTA TATTTATTGG GAATGACCAA
151   ATTTATAATG TAATTGTAAC AGCTCATGCA TTTATTATAA TTTTCTTTAT
201   AGTAATGCCA ATTATAATTG GAGGATTTGG AAATTGATTA GTTCCTTTAA
251   TATTAGGAGC CCCTGATATA GCTTTCCCTC GAATGAATAA TATAAGTTTT
301   TGAATACTAC CTCCTTCATT GACTCTTCTA TTATCAAGCT CAATAGTAGA
351   AAATGGGGCA GGAACTGGGT GAACAGTTTA TCCTCCTCTC TCTTCAGGAA
401   CAGCTCATGC TGGAGCTTCT GTTGATTTAG CTATTTTTTC TCTTCATTTA
451   GCTGGAATTT CCTCAATTTT AGGGGCAGTA AATTTTATTA CAACTGTGAT
501   TAATATGTGA TCGTCAGGGA TTACTTTAGA TCGACTACCC TTATTTGTTT
551   GATCTGTAGT TATTACAGCT ATCTTATTAC TTCTTTCTCT TCCTGTTTTA
601   GCTGGAGCTA TTACTATATT ATTAACAGAC CGAAACTTAA ATACATCTTT
651   CTTTGATCCA ATCGGAGGGG GAGACCCTAT TTTATACCAA CACTTATTTT
701   GATTCTTTGG ACACCCAGAA GTTTATATTT TAATTTTACC CGGATTTGGA
751   ATAATTTCTC ATATTATTAC TCAAGAAAGC GGAAAAAAGG AAACATTTGG
801   AACTTTAGGA ATAATTTATG CTATATTAAC AATTGGATTA TTGGGATTTA
851   TTGTTTGAGC TCATCATATA TTTACAGTAG GTATAGACGT AGATACTCGA
901   GCTTATTTTA CTTCAGCAAC TATAATTATT GCTGTTCCTA CAGGAATTAA
951   AATTTTTAGT TGATTAGCAA CTTTACACGG AACTCAATTA ACATATAGTC
1001  CAGCCCTTCT ATGATCATTA GGATTTGTAT TTTTATTTAC AGTTGGAGGT
1051  TTAACAGGAG TAGTATTAGC TAATTCTTCA ATTGATATTG TTCTTCATGA
1101  TACTTATTAC GTAGTTGCCC ATTTTCATTA CGTTTTATCT ATAGGAGCTG
1151  TATTTGCTAT TATAGCAGGA TTTATTCATT GATACCCTTT ATTAACAGGA
```

ANALISIS KUALITAS PRIMER MENGGUNAKAN OLYGOANALYZER

1. Akses website (https://sg.idtdna.com/).

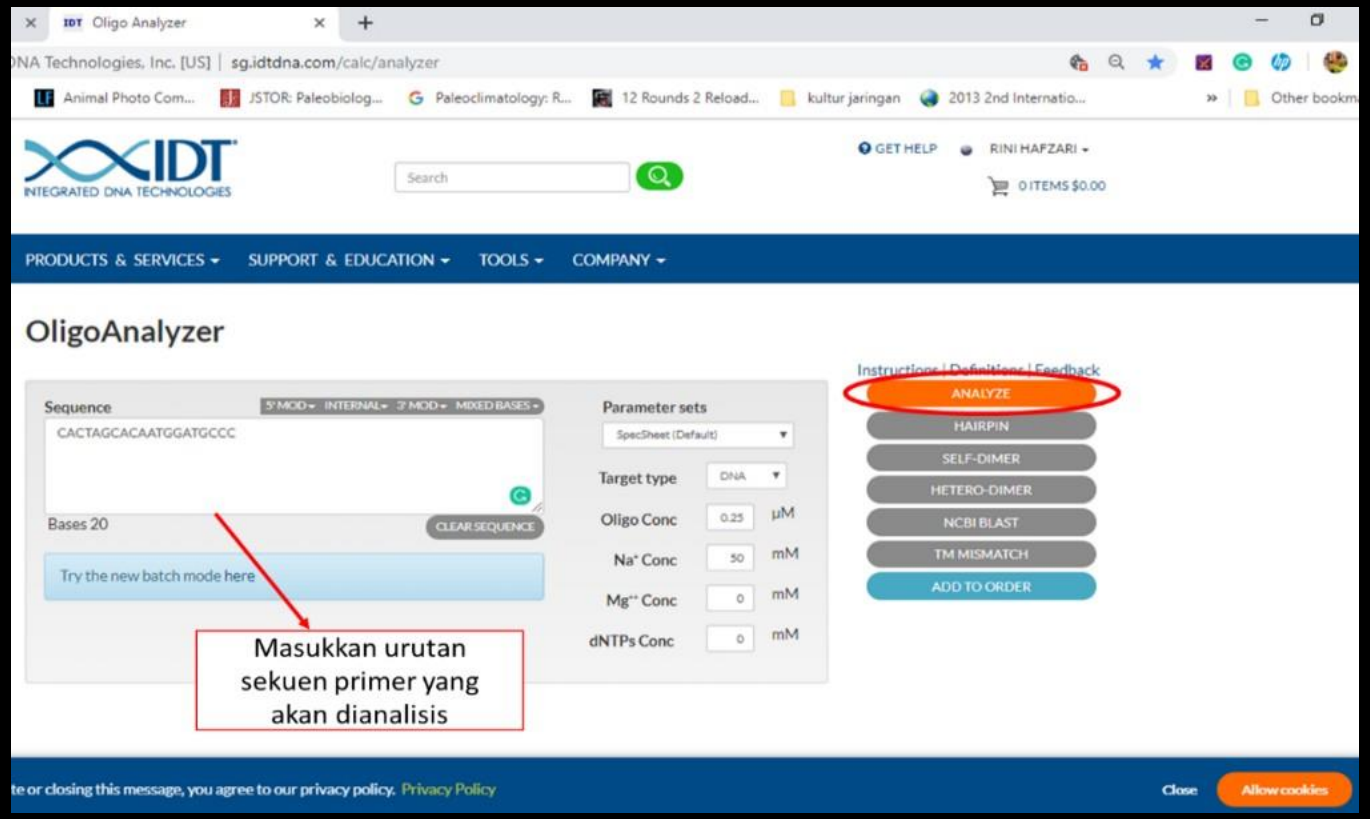
Pada bagian paling bawah website klik OligoAnalyzer Tool



ANALISIS KUALITAS PRIMER MENGGUNAKAN OLYGOANALYZER

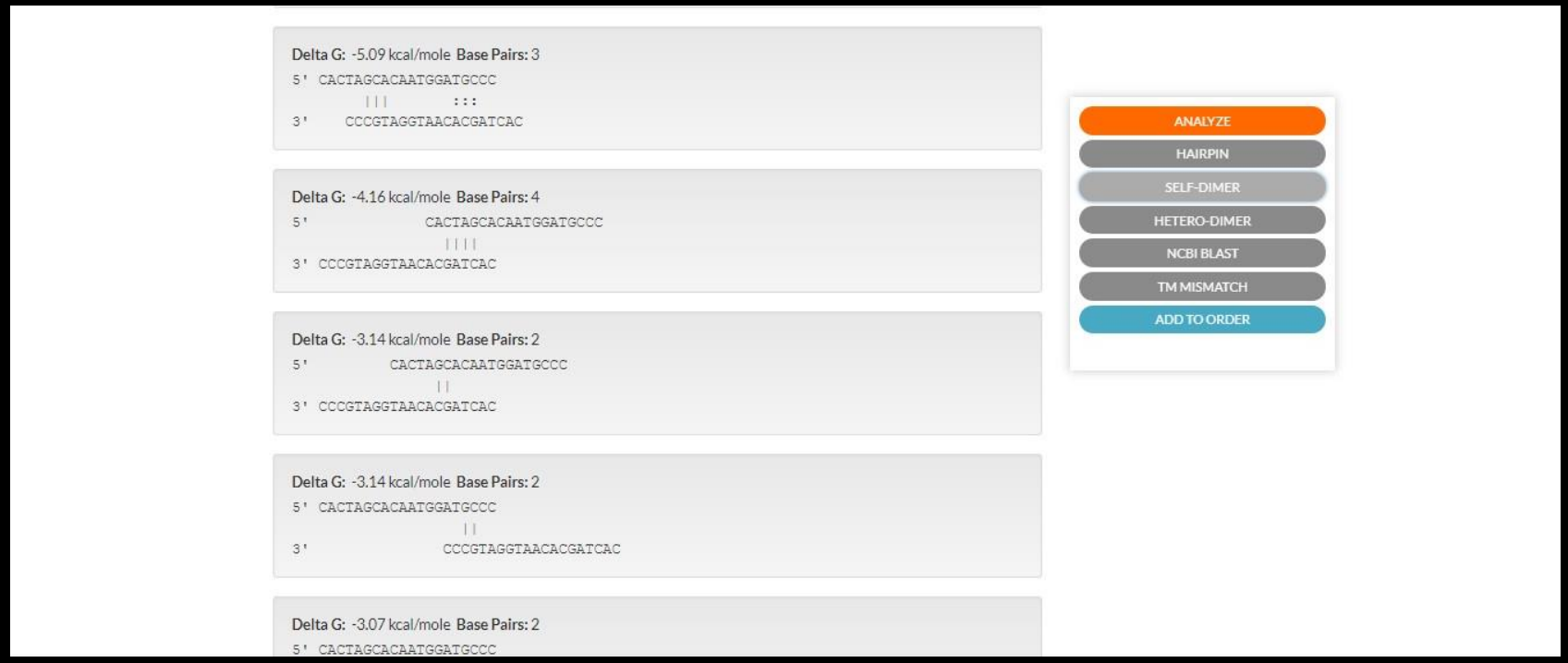
2. Lakukanlah *sign in* jika sudah memiliki akun, namun jika belum lakukan *register* terlebih dahulu kemudian *sign in*

3. Pilihlah salah satu primer forward dari kandidat primer hasil pick primer di Primer3, kemudian *paste* sekuen primer tersebut di OlygoAnalyzer. Lalu pilih *analyze*. Lakukan hal yang sama untuk mengetahui kualitas primer reverse



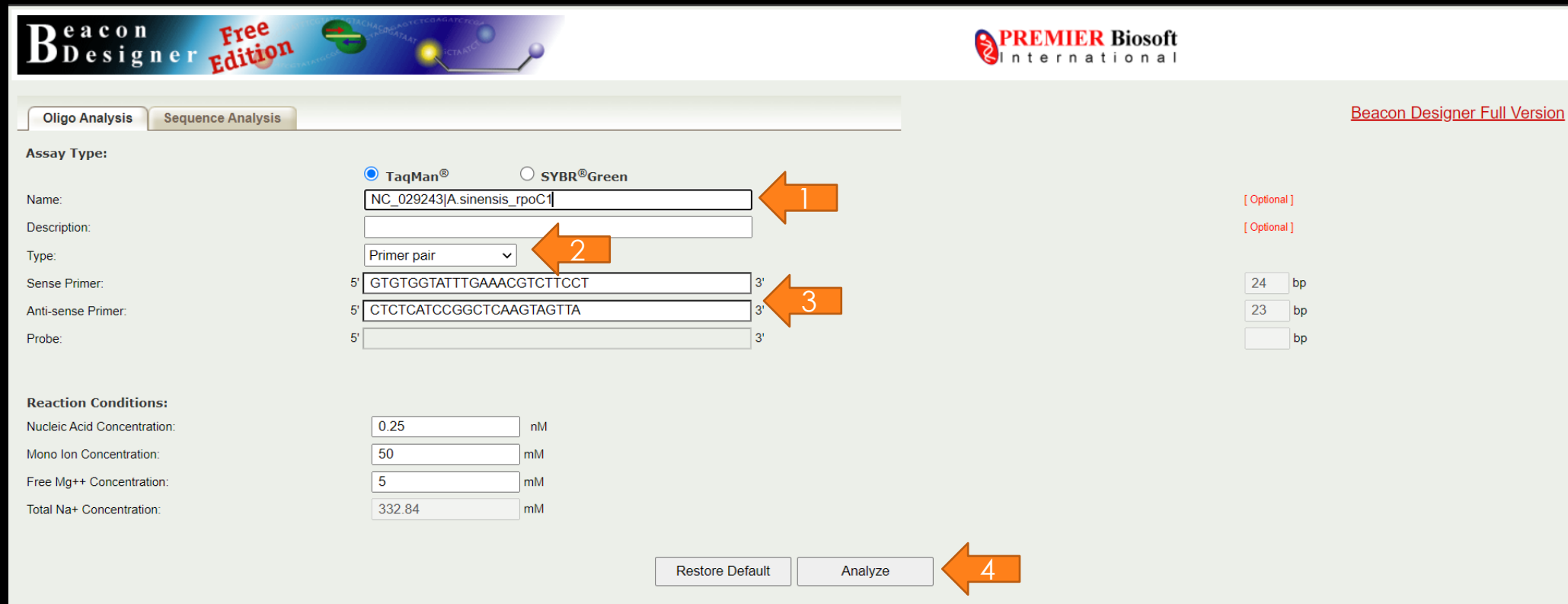
ANALISIS KUALITAS PRIMER MENGGUNAKAN OLYGOANALYZER

4. Setelah pilih *analyze*, OlygoAnalyzer akan menampilkan rincian dari primer yang dianalisis, seperti: panjang sekuen primer, suhu *melting*, suhu *annealing* dan sebagainya. Untuk mengetahui struktur sekunder internal primer, klik bagian self-dimer dan hairpin



ANALISIS KUALITAS PRIMER MENGGUNAKAN BEACON DESIGNER

- Buka website Beacon Designer. Isikan identitas primer.
- Pada drop-down [Type], pilih “Primer pair”. Salin urutan primer forward dan reverse pada kotak tersedia. Klik [Analyze]



ANALISIS KUALITAS PRIMER MENGGUNAKAN BEACON DESIGNER

Name: NC_029243|A.sinensis_rpoC1

November 10, 2021

Description:

Assay Type: TaqMan®

Reaction Conditions:

Nucleic Acid Concentration (nM)	0.25	**Monovalent Concentration (mM)**	50
Free Mg++ Concentration (mM)	5	**Total Na+ Concentration (mM)**	332.84

Sense Primer: GTGTGGTATTTGAAACGTCTTCCT

Length (bp)	Tm (^{0}C)	GC%	GC Clamp	Cross Dimer (ΔG)	Self Dimer (ΔG)	Hairpin (ΔG)
24	58.43	41.67	2	-2.0	-3.3	-0.6

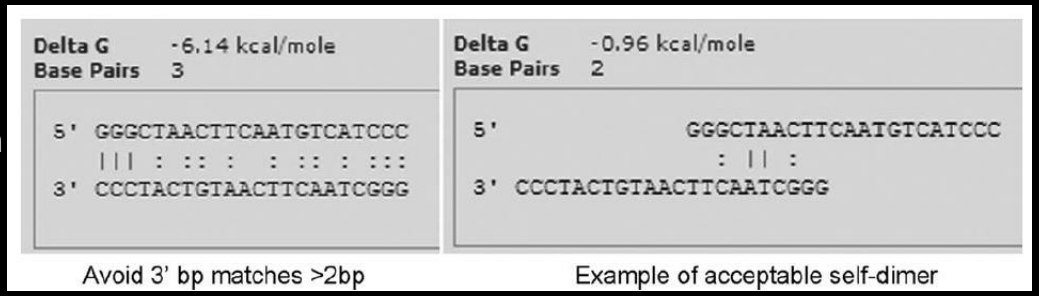
Anti-sense Primer: CTCTCATCCGGCTCAAGTAGTTA

Length (bp)	Tm (^{0}C)	GC%	GC Clamp	Cross Dimer (ΔG)	Self Dimer (ΔG)	Hairpin (ΔG)
23	58.1	47.83	2	-2.0	-4.3	0.0

As a rule of thumb:

- Never accept primers where the 3′ end has 3 bp matches, as these will tend to form primer dimers preferentially over hybridizing with the sequence.
- If self-dimers or cross dimers cannot be avoided, chose primers with the highest −Δ*G* (meaning the least negative number—the one closest to zero). Discard primers with Δ*G*s more negative than −3.5 kcal/mol.

Reference: Thornton and Basu, 2011 (**https://doi.org/10.1002/bmb.20461**)



Avoid 3' bp matches >2bp

Example of acceptable self-dimer

ANALISIS KUALITAS PRIMER MENGGUNAKAN BEACON DESIGNER
SECONDARY STRUCTURE OF PRIMERS

Secondary Structures for Sense Primer

Dimer:-

```
5' GTGTGGTATTTGAAACGTCTTCCT 3'
              ¦ |||| ¦
       3' TCCTTCTGCAAAGTTTATGGTGTG 5'
```
-3.3

```
5' GTGTGGTATTTGAAACGTCTTCCT 3'
             |||     ¦¦¦
        3' TCCTTCTGCAAAGTTTATGGTGTG 5'
```
-0.6

```
 5' GTGTGGTATTTGAAACGTCTTCCT 3'
    ¦   ¦   ||| ¦¦¦   ¦   ¦
3' TCCTTCTGCAAAGTTTATGGTGTG 5'
```
-0.1

Hairpin:-

```
/CAAAGTTTATGGTGTG 5'
G  |||
\TCTTCCT 3'
```
-0.6

Secondary Structures for Anti-sense Primer

Dimer:-

```
     5' CTCTCATCCGGCTCAAGTAGTTA 3'
           ¦ ¦ |||| ¦ ¦
3' ATTGATGAACTCGGCCTACTCTC 5'
```
-4.3

Hairpin:-

Not Found

Cross Dimer

Cross Dimer between Sense Primer and Anti-sense Primer:-

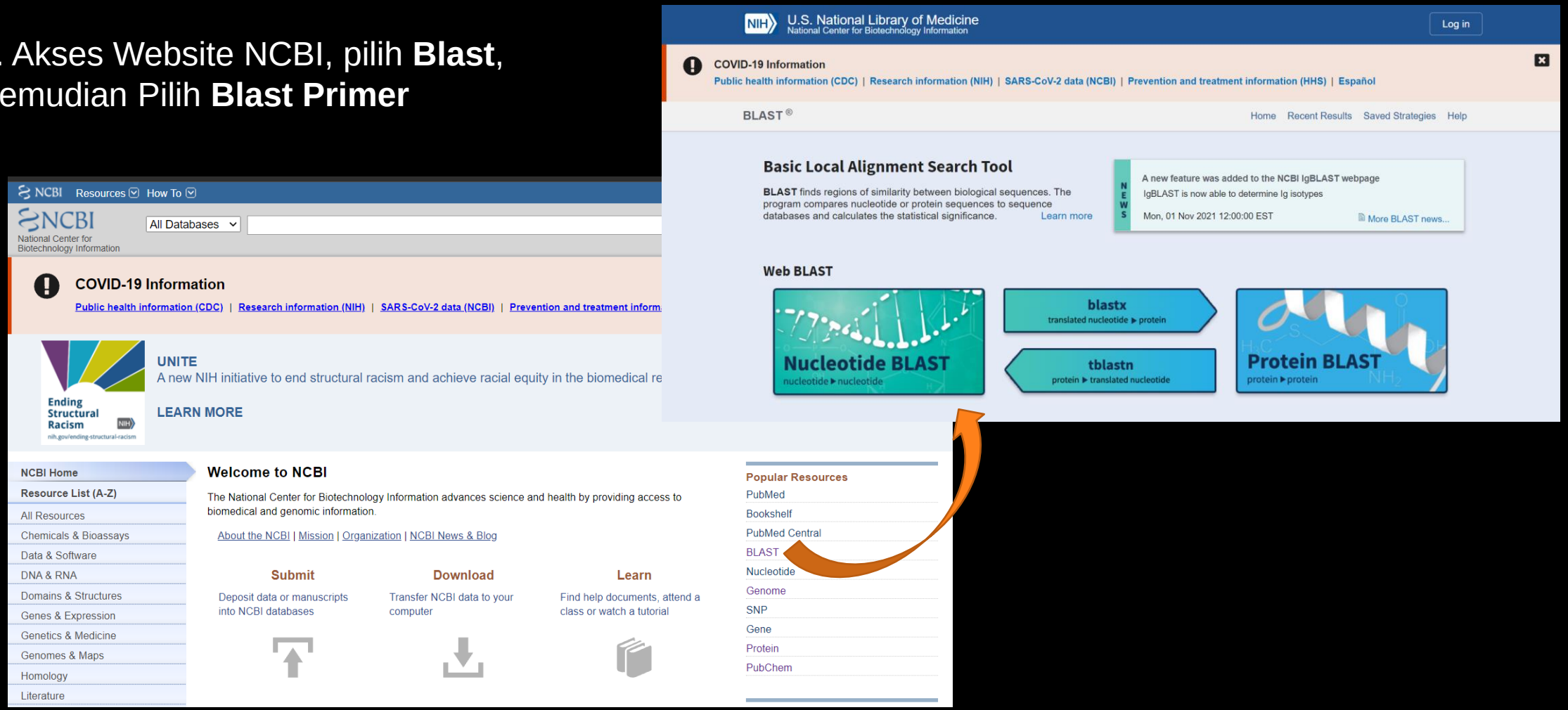
```
5' GTGTGGTATTTGAAACGTCTTCCT 3'
         ¦¦ ||||  ¦¦  ¦
  3' ATTGATGAACTCGGCCTACTCTC 5'
```
-2.0

```
       5' GTGTGGTATTTGAAACGTCTTCCT 3'
            ¦¦ ¦     ||| ¦
3' ATTGATGAACTCGGCCTACTCTC 5'
```
-0.9

```
5' GTGTGGTATTTGAAACGTCTTCCT 3'
               |||  ¦¦¦
           3' ATTGATGAACTCGGCCTACTCTC 5'
```
-0.7

UJI SPESIFISITAS PRIMER (IN SILICO) MENGGUNAKAN BLAST PRIMER NCBI

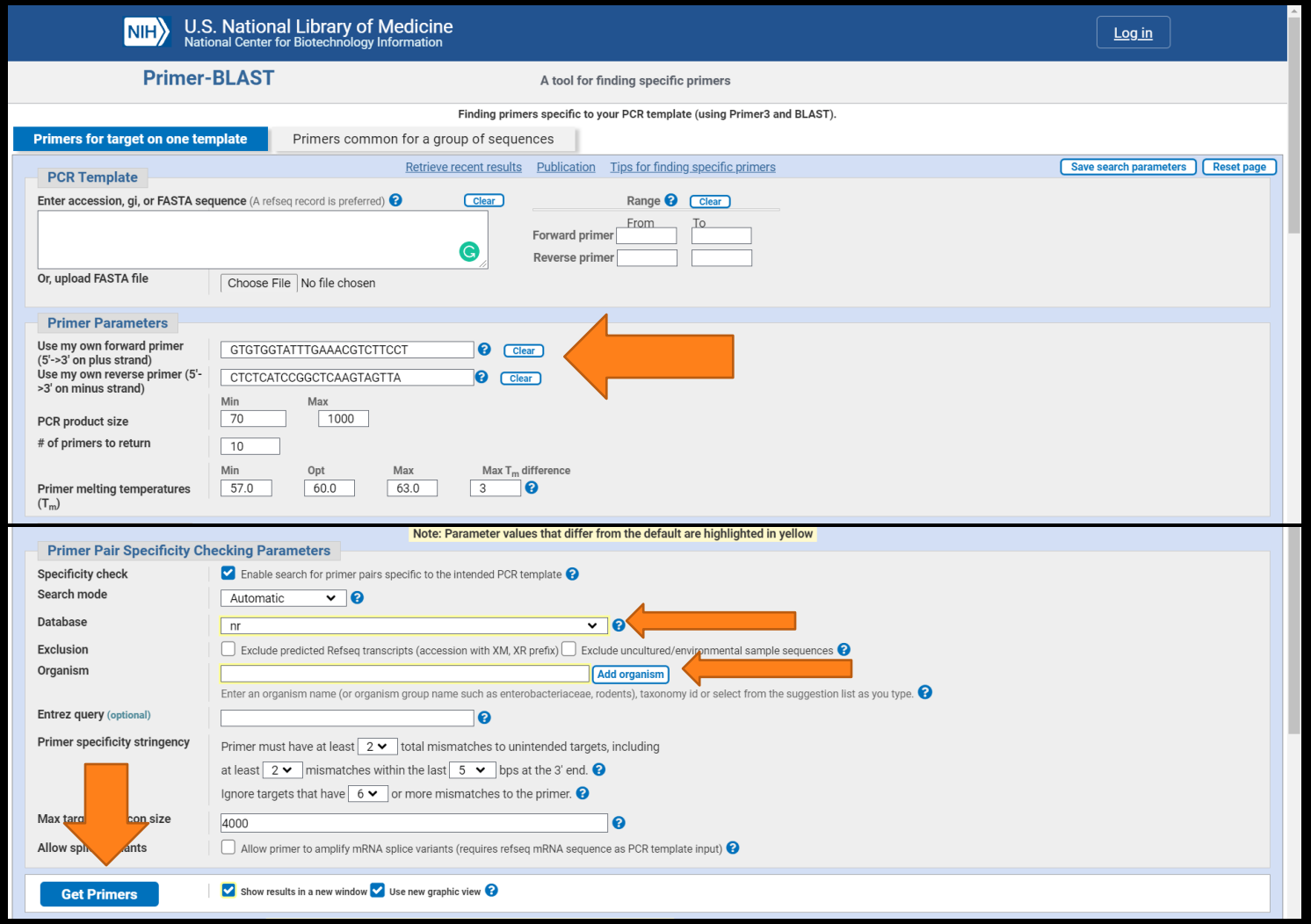
1. Akses Website NCBI, pilih **Blast**, Kemudian Pilih **Blast Primer**



UJI SPESIFISITAS PRIMER (IN SILICO) MENGGUNAKAN BLAST PRIMER NCBI

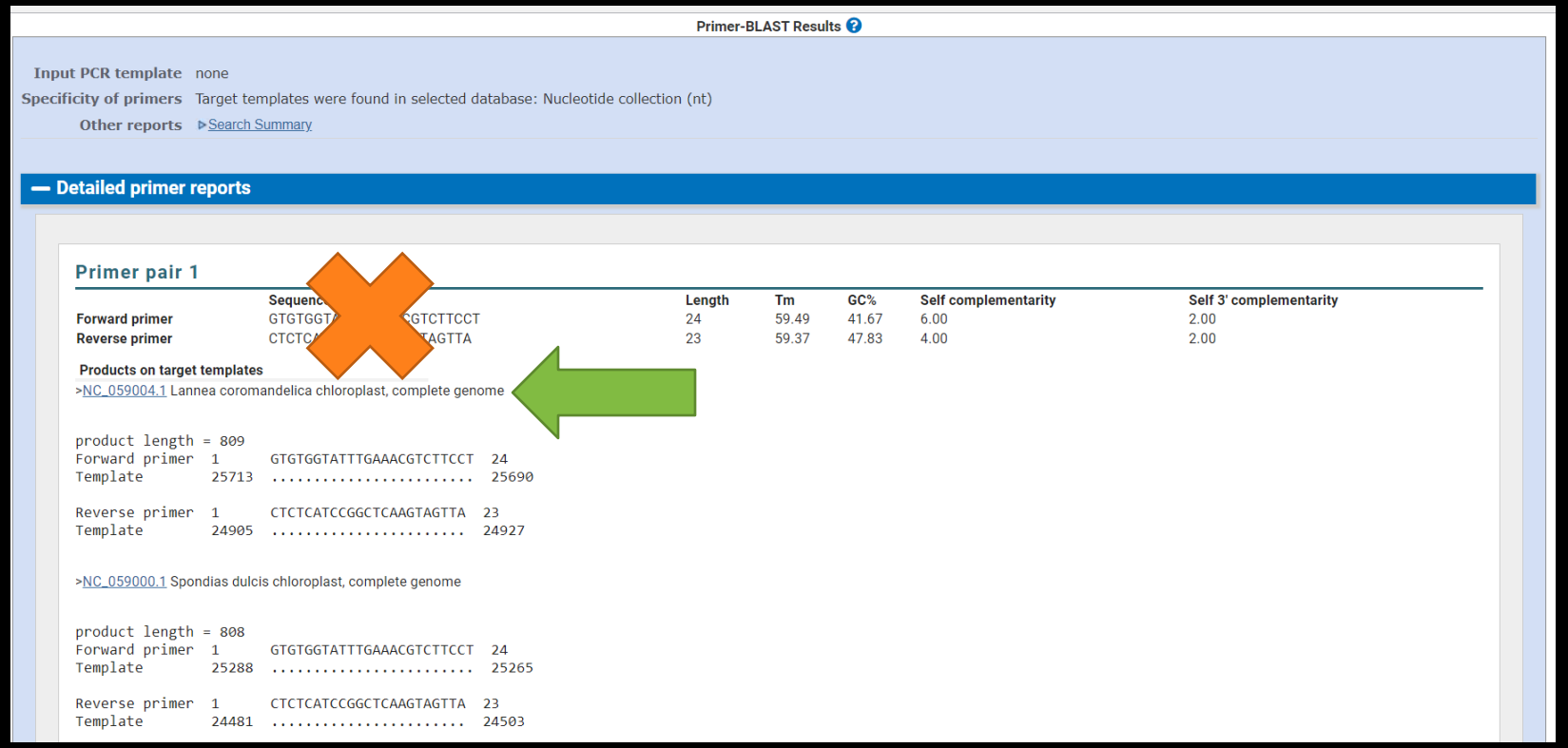
2. Copy dan paste primer forward dan primer reverse yang didapat dari hasil [*pick primer*] pada Primer3 ke Primer-BLAST
3. Gunakan *default* setting pada menu "*Primer parameter*" dan "*Exon/intron selection*".
4. Pada bagian "*Primer pair specificity checking parameters",* pilih 'nr' pada menu 'Database' dan kosongkan menu '*Organism*".

Klik [Get primer]



UJI SPESIFISITAS PRIMER (IN SILICO) MENGGUNAKAN BLAST PRIMER NCBI

4. Perhatikan hasil blast primer, pastikan spesies yang terdapat pada hasil blast merupakan spesies yang sama atau satu genus dengan spesies yang digunakan pada saat desain primer. Apabila sudah sama, maka pasangan primer tersebut dapat digunakan untuk amplifikasi sekuen DNA target dengan metode PCR



Primer-BLAST Results

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	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GTGTGGT…CGTCTTCCT	24	59.49	41.67	6.00	2.00
Reverse primer	CTCTC…TAGTTA	23	59.37	47.83	4.00	2.00

Products on target templates

>NC_059004.1 Lannea coromandelica chloroplast, complete genome

```
product length = 809
Forward primer  1      GTGTGGTATTTGAAACGTCTTCCT  24
Template        25713  ........................  25690

Reverse primer  1      CTCTCATCCGGCTCAAGTAGTTA  23
Template        24905  ........................  24927
```

>NC_059000.1 Spondias dulcis chloroplast, complete genome

```
product length = 808
Forward primer  1      GTGTGGTATTTGAAACGTCTTCCT  24
Template        25288  ........................  25265

Reverse primer  1      CTCTCATCCGGCTCAAGTAGTTA  23
Template        24481  ........................  24503
```

HASIL PRIMER-BLAST APABILA MENU ‘ORGANISM’ DIISI DENGAN SPESIES TARGET

Primer-BLAST Results

Input PCR template none

Specificity of primers Target templates were found in selected database: Nucleotide collection (nt) (Organism limited to Aquilaria)

Other reports ▸Search Summary

— Detailed primer reports

Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GTGTGGTATTTGAAACGTCTTCCT	24	59.49	41.67	6.00	2.00
Reverse primer	CTCTCATCCGGCTCAAGTAGTTA	23	59.37	47.83	4.00	2.00

Products on target templates

>NC_052859.1 Aquilaria subintegra chloroplast, complete genome

```
product length = 803
Forward primer  1      GTGTGGTATTTGAAACGTCTTCCT  24
Template        24760  ........................  24737

Reverse primer  1      CTCTCATCCGGCTCAAGTAGTTA  23
Template        23958  ........................  23980
```

>MN147870.1 Aquilaria sinensis chloroplast, complete genome

```
product length = 798
Forward primer  1      GTGTGGTATTTGAAACGTCTTCCT  24
Template        24774  ........................  24751

Reverse primer  1      CTCTCATCCGGCTCAAGTAGTTA  23
Template        23977  ........................  23999
```

SUMMARY

Target gen
- Complete sequence (DNA)

Cek validitas
- Penjajaran
- Rekonstruksi filogenetik (NJ)

Target region
- Daerah polimorfik vs. Lestari

Desain primer
- Pasangan primer mengapit target region

DNA barkode

< 700 bp sekuen

Rekonstruksi pohon filogenetik

Identifikasi menggunakan sekuen representatif

TERIMA KASIH