



## Diseño y evaluación de primers *in silico* del gen E1 del virus de chikungunya para Real-Time PCR (qPCR)

Design and Evaluation of primers *in silico* of the E1 gene of chikungunya virus for Real -Time PCR (q PCR)

DE LA FUENTE, ARIEL<sup>1</sup>

ROMERO CALLE, DANITZA XIOMARA<sup>1</sup>

CÁRDENAS ALEGRÍA, OSCAR<sup>1</sup>

ÁLVAREZ ALIAGA, MARÍA TERESA<sup>1</sup>

FECHA DE RECEPCIÓN: 13 DE MARZO DE 2018

FECHA DE ACEPTACIÓN: 9 DE MAYO DE 2018

### Resumen

El diseño de primers es una parte sustancial dentro de los ensayos de PCR, el mismo es aplicado en la caracterización de microorganismos, secuenciación, cuantificación, etc. En los últimos años se ha incrementado herramientas para este fin, se realizaron nuevas variantes, crearon nuevos enfoques, muchas de estas herramientas son de licencia comercial y otros de acceso libre y código abierto permiten al usuario mejorar o modificar según requerimiento el diseño de primers. En este trabajo comparamos las características básicas dentro del diseño de primers, empleando 2 tipos de herramientas web de acceso libre y código abierto: Primer-BLAST y Primer3Plus, se realizó el diseño *in silico*, análisis de estructuras secundarias y verificación de la especificidad de los primers obtenidos. Los resultados mostraron que el uso de variables adicionales o uso de penaltis mediante el software Primer3Plus afectan en la especificidad, formación de

### Abstract

Primer design is a substantial part of PCR assays, which is used in characterization of microorganisms, sequencing, quantification, etc. In recent years, new tools have been added for this purpose, new variants and approaches have been created, many of these tools are commercial and others are free including open source, giving the possibility to improve or modify as required. In this work, we compared the basic characteristics of the primers design, using 2 types of free and open source web tools, Primer-BLAST and Primer3Plus, in this sense the *in silico* design, analysis of secondary structures and verification of primers designed. The results showed that the use of additional variables or use of penalties using the software Primer3Plus affect in specificity, secondary structures formation in primers and in the products of amplification. In addition, default parameters, that many soft-

1. Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB), Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, UMSA.

estructuras secundarias de los primers y de los amplicones. Además, se determinó que los parámetros que tienen muchos software por defecto, no aseguran el diseño de primers convenientes y/o específicos, en este sentido es importante realizar el uso de penalizaciones. Asimismo, se identificó que el uso de Primer3Plus ha permitido disminuir la formación de estructuras secundarias, sin afectar la especificidad de amplificación del marcador seleccionado.

### **PALABRAS CLAVE**

Diseño de primers, estructuras secundarias, qPCR y software.

ware have, do not imply that suitable and / or specific primers can be obtained, meaning the importance of the use of penalties. Therefore, the use of Primer3Plus has allowed to decrease the formation of secondary structures without affecting the amplification specificity of the selected marker.

### **KEY WORDS**

*Design of primers, secondary structures, qPCR and software.*

## **INTRODUCCIÓN**

La tecnología genómica moderna permite estudiar millones de regiones de cada muestra de ADN. La mayoría de estas tecnologías requiere la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), técnica que requiere el uso de primers específicos los mismos no deben formar estructuras secundarias que afecten el rendimiento de la PCR.

El amplio uso de primers universales o publicados en artículos de investigación de referencia son generalmente el resultado del diseño primers, el cual requiere experiencia y destreza por estar sujeto a posibles errores (Camillo *et al.*, 2016), en ausencia de primers de referencia es imprescindible el diseño de los mismos. En este sentido, existe una demanda reciente de métodos o algoritmos para su diseño, debido también a la proliferación de nuevas tecnologías dentro la genómica y otros campos relacionados (Kim, Kang, An, Koo, & Kim, 2016), además se ha reportado que estos métodos presentan resultados favorables (Chuang, Cheng, & Yang, 2013) en los diferentes ensayos e investigaciones incluyendo aplicaciones clínicas (Thierry, y otros, 2014) para la identificación de diferentes microorganismos emergentes. No obstante, varios de estos primers han sido diseñados para marcadores específicos o particulares, por lo tanto, la amplificación de estos marcadores no podría ser las mismas o semejantes, afectando de esta forma el éxito del PCR.

Aunque no todos los aspectos del proceso de la qPCR están completamente descritos y modelados, se conocen ciertos factores que afectan la tasa de éxito de la qPCR, en sistemas que usan el SYBER1 como intercalante Green, la detección es más simple y económica de qPCR pero la unión del primer a regiones repetidas de la secuencia de DNA puede ser errónea y generar productos inespecíficos, otro factor determinante es la temperatura de fusión ( $T_m$ ) (Pachón, 2017). Los falsos positivos resultan en la formación de primers dimers y amplificación no específica. El éxito de la PCR depende de la calidad del templado, Taq polimerasa, solución buffer y el diseño de primers en los cuales debe haber un balance entre especificidad y eficiencia.

El desarrollo informático ha permitido la creación de diversos softwares que facilitan el diseño de primers incrementando la tasa de éxito del qPCR. Los cuales permiten tanto diseño automático como diseño particular o específico, de tal forma que nuevos usuarios puedan realizar el diseño manual, y un usuario con experiencia puede realizar un diseño más avanzado (Wang *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2015), en el que se emplea el uso de parámetros adicionales que son un conjunto de variables que intervienen en su características (Presti *et al.*, 2014).

Existen una variedad de software para el diseño de primers muchos de acceso libre como PrimerBlast y Primer3Plus empleado. Los autores del diseño y la creación digital de Primer3Plus, han examinado las versiones más recientes de navegadores tales como Firefox, Internet Explorer, Safari and Konqueror, permitiendo su uso en cualquier navegador. Por otro lado, Primer3Plus funciona con JavaScript, Microsoft Windows y en cualquier sistema operativo basado en Unix/Linux.

Cuando se diseñan y analizan primers se deben tomar en cuenta principalmente 3 aspectos descritos por Thornton & Basu: 1) Los dímeros y horquillas de los primers que se produzcan no deberán tener un  $\Delta G$  muy negativo ( $< -3.5$  kcal/mol), 2) No debe existir horquillas en el extremo 3', y 3) Las estructuras secundarias que resulten, no deben tener un  $T_m$  mayor a la temperatura de alineamiento.

El diseño de primers está siendo extensamente implementado en muchos laboratorios, sean clínicos o de investigación, permitiendo reducir costos, también permite tener un control personalizado y más completo sobre el experimento de la PCR.

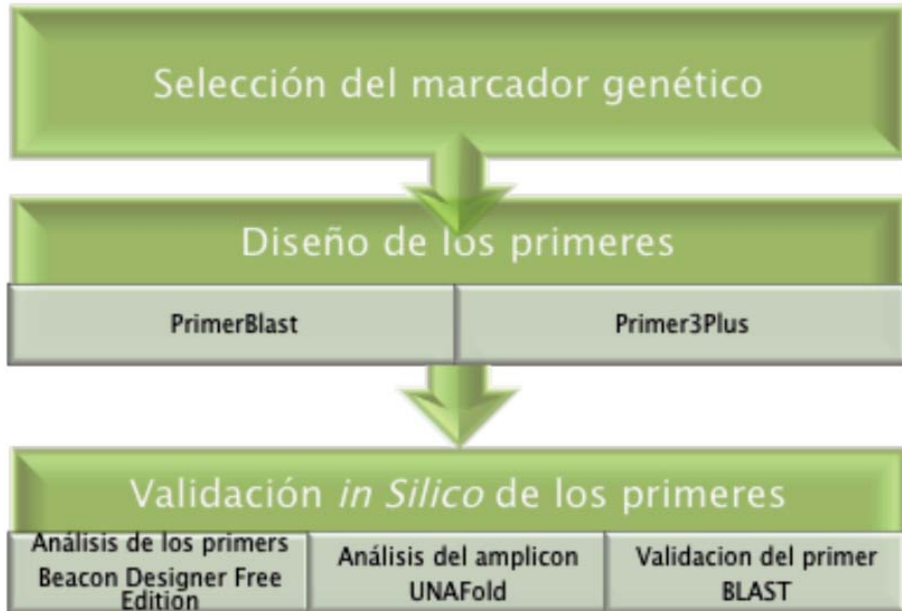
El presente estudio tiene por finalidad diseñar primers para el gen E1 del virus Chikungunya mediante 2 tipos de software, ambos de acceso libre, PrimerBlast y Primer3Plus para qPCR. La identificación de este gen (E1 codifica una proteína de membrana conocida por incrementar su habilidad de infección posterior a su mutación) podría ser útil para emplearlo como marcador genético si inicialmente se realiza una retrotranscripción puesto que el virus de tipo RNA de cadena sencilla.

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

El diseño de primers inicialmente se seleccionó el marcador o región genética del blanco, en gen E1 del virus de Chikunguya (Rodríguez *et al.*, 2015), se utilizó dos programas diferentes para diseño de oligonucleótidos denominados PrimerBlast y Primer3Plus y posteriormente se realizó el análisis de los oligos diseñados con el programa Beacon Designer Free Edition y del ampliación resultante mediante UNAFold, figura1.

**Figura 1. Flujo de trabajo. El diagrama resume la metodología realizada para el diseño *In silico* de primers.**



### Búsqueda del marcador genético

La secuencia nucleotídica (563 bp) del gen E1 del virus Chikungunya (CHKV) (Evia, 2015) fue obtenida mediante una búsqueda en la base de datos GenBank, número de acceso JX142137.1. (Benson *et al.*, 2000) para el diseño de los primers orientados al ensayo de PCR cuantitativo (qPCR) mediante parámetros estándar descritos por Rodríguez *et al.* (2015).

### Diseño de primers para el gen E1 del virus CHKV

Se ha diseñado primers que amplifiquen la región del gen E1 del virus CHKV mediante dos sitios web que proporcionan software online: 1) Primer-BLAST (Ye *et al.*, 2012) y 2) Primer3Plus (Untergasser, *et al.*, 2007).

1. El diseño de primers en el software Primer-BLAST del NCBI ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK\\_LOC=BlastHome](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome)) fue realizado de acuerdo a Rodríguez *et al.* (2015) y Untergasser *et al.* (2015), para el resto de los parámetros se utilizó los valores predeterminados por el software, figura2 y tabla 1 (Rodríguez *et al.*, 2015; Untergasser, *et al.*, 2007).

**Tabla 1. Parámetros generales empleados para el diseño de primers en Primer-BLAST**

PARÁMETRO	VALOR	DESCRIPCIÓN
Secuencia	JX142137.1	Nombre de la secuencia
Sequence ID	Chikungunya virus CHIKV/IRL/2009 E1 gene	Código de la secuencia
Product Size Ranges	80-150 100-200	Rangos de tamaño para los amplicones
Primer Size	20 25 28	Longitudes mínimas, óptimas y máximas para los primers diseñados
Primer Tm	60 64 70	Tm mínimo, óptimo y máximo para los primers diseñados
Max Tm Difference	2	Diferencia máxima aceptable entre los Tm de los primers
Product Tm	50	Tm mínimo, óptimo y máximo para el amplicón
Primer GC%	35 65 80	Porcentajes mínimos, óptimos y máximos de G y C en cualquier primer
GC Clamp	0	Numero específico de Gs y Cs consecutivos en el extremo 3' de ambos primers
Concentration of divalent cations	3.5	Concentración milimolar de cationes divalentes
Concentration of dNTPs	0.20	Concentración milimolar de trifosfatos deoxiribonucleotidos
Penaltis para los primers (for Primers)		
Tm	Lt=0 - 4 Gt=0 - 4	Describen los penaltis que permiten modificar el criterio que usa Primer3 para seleccionar los mejores primers
Size	Lt=0 y1 Gt=0 y1	
Self-Complementarity	0 y 3	
3' Self Complementarity	0 y 3	
Penaltis para el par de primers (for Primer Pairs)		
Product tm	Lt=0 y1 Gt=0 y1	Describen los penaltis que permiten modificar y ajustar el criterio que usa Primer3 para seleccionar los mejores primers
Tm Difference	0 y 2	
Any Complementarity	0 y 3	
3' Self Complementarity	0 y 3	

Figura 2. Interface básica de Primer-BLAST del NCBI. El programa muestra de forma predeterminada a *Homo sapiens* como organismo de referencia y no cuenta con organismos o especies de virus

Primer Pair Specificity Checking Parameters

Specificity check  Enable search for primer pairs specific to the intended PCR template

Search mode Automatic

Database Refseq mRNA

Exclusion  Exclude predicted Refseq transcripts (accession with XM, XR prefix)  Exclude uncultured/environmental sample sequences

Organism **Homo sapiens**  
Enter an organism name (or organism group name such as enterobacteriaceae, rodents), taxonomy id or select from the suggestion list as you type.  
[Add more organisms](#)

This will limit the primer specificity checking to the specified organism. It is strongly recommended that you always specify the organism if you are amplifying DNA from a specific organism (because searching all organisms will be much slower and off-target priming from other organisms is irrelevant). Click on "Add more organisms" label if you want to restrict to multiple organisms (enter only one organism in each input box).

Entrez query (optional)

Primer specificity stringency Primer must have at least 2 total mismatches to unintended targets, including at least 2 mismatches within the last 5 bps at the 3' end.  
Ignore targets that have 6 or more mismatches to the primer.

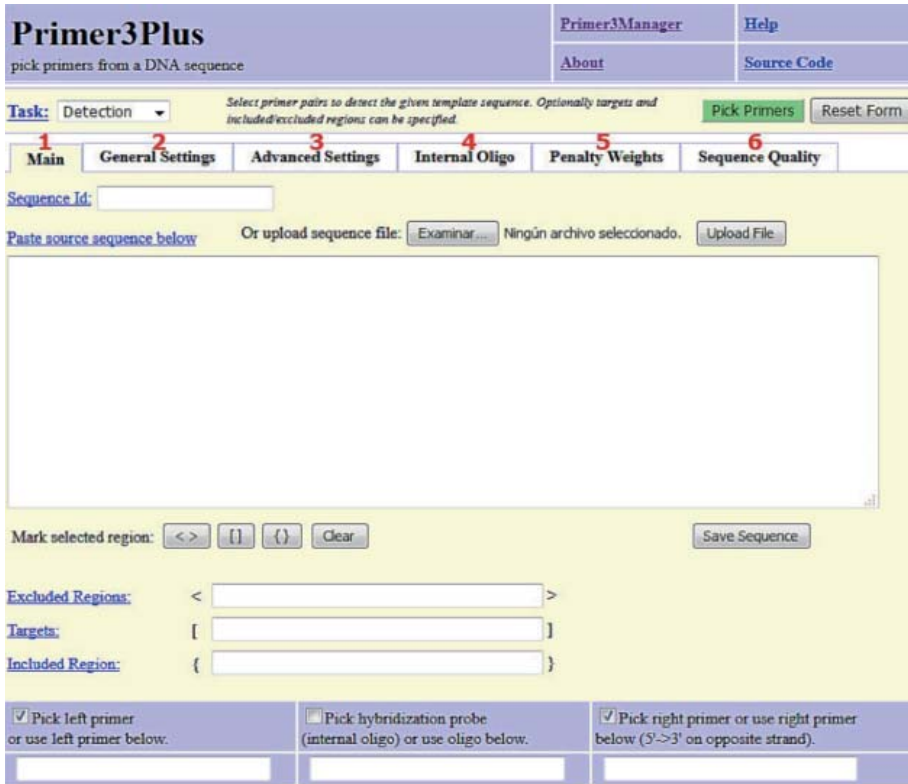
Max target size 4000

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

**Get Primers**  Show results in a new window  Use new graphic view

2. Primer3Plus (Bioinformatics, <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) fue empleado para el diseño de primers (figura 3), inicialmente la secuencia del gen E1 en formato FASTA fue ingresada en Principal (Main), posteriormente se asignaron valores fisicoquímicos óptimos para el diseño de primers (tabla 1) en la sección de configuraciones avanzadas (Advanced Settings), consecutivamente los penaltis (Penalty weights) fueron ajustados en un rango de 0 a 4 en mediante la variación de la temperatura de fusión ( $T_m$ ) uno de los parámetros más influyentes para la obtención de primers específicos (Untergasser *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 2015), de acuerdo a estas modificaciones se obtuvieron 6 grupos de primers (A, B, C, D, E, y F), en el grupo A se asignó el valor de 0 a todos los parámetros en la sección de Penaltis y para el resto de los grupos se asignó los valores de penaltis predeterminados por el software, el resto de los parámetros fueron estándar (Thornton & Basu, 2011).

**Figura 3. Interface de Primer3Plus, 6 secciones dispuestas en pestañas, ordenadas de mayor a menor frecuencia de uso y complejidad.**



## Análisis In silico de los primers y productos de amplificación

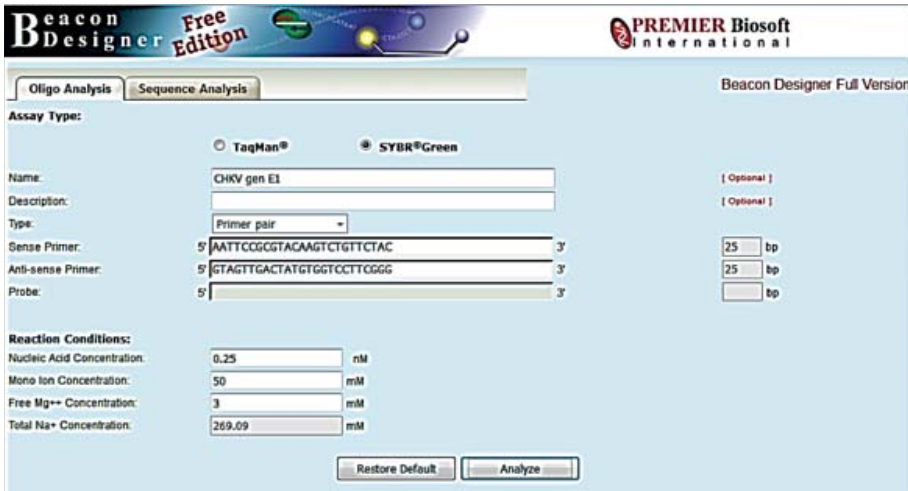
La calidad y especificidad de los primers obtenidos fueron analizados empleando Beacon Designer Free Edition (PRIMER Biosoft, <http://www.premierbiosoft.com/qOligo/Oligo.jsp?PID=1>), se ingresó el par de primers dentro su interface, seleccionando la opción SYBR®Green y dejando el resto de los campos de forma predeterminada (Figura 4). Asimismo, se identificó la formación de posibles estructuras secundarias (Apte, 2007).

Por otro lado, se analizaron los amplicones resultantes mediante el software UNAFold (IDT, Integrated DNA Technologies, Inc., <https://www.idtdna.com/UNAFold>), se ingresó la secuencia del amplicon resultante y asigno el valor de 60 °C a la temperatura y realizó click en Submit, consecutivamente las variables termodinámicas de los amplicones y la formación de dímeros fueron evaluados.

Finalmente, se determinó la especificidad de los primers de acuerdo a los valores de identidad (Ident) y E-Value presentados en Nucleotide-BLAST (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_TYPE=BlastSearch](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch)).



**Figura 4. Interface de Beacon Designer Free Edition. La página presenta un formulario de entrada para dos tipos de análisis, TaqMan y SYBRGreen, además, condiciones de la reacción qPCR.**



## 2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Diseño de primers mediante el Software Primer-BLAST

Inicialmente, se utilizó la secuencia obtenida con número de acceso JX142137.1 (Figura 5), se ingresó esta secuencia en la interfaz de Primer-BLAST (Figura 2).

**Figura 5. Secuencia obtenida de la base de datos de GenBank en formato FASTA con número de acceso JX142137.1, la secuencia tiene 563 bp.**

### Chikungunya virus CHIKV/IRL/2009 E1 gene, partial cds

GenBank: JX142137.1

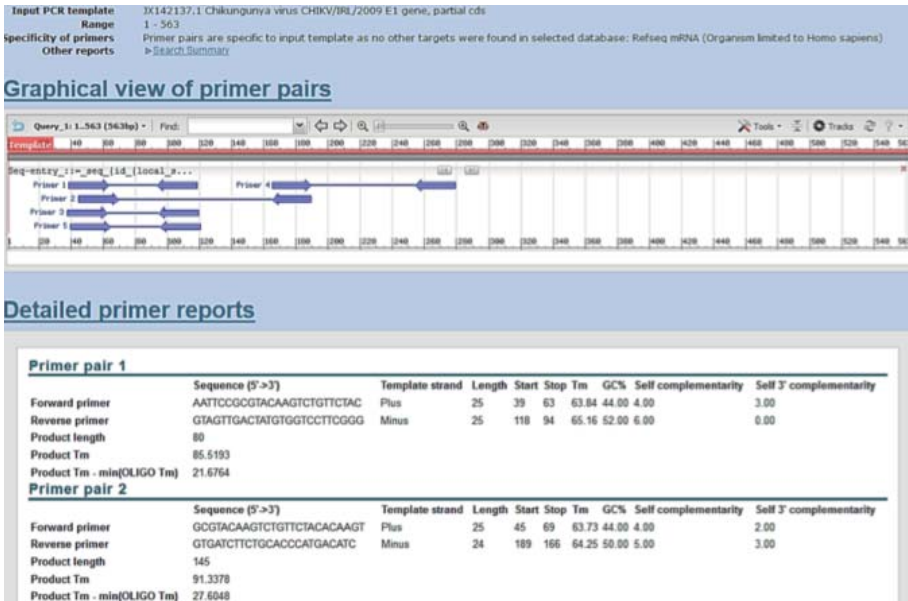
[GenBank](#) [Graphics](#) [PopSet](#)

```
>gi|401721289|gb|JX142137.1| Chikungunya virus CHIKV/IRL/2009 E1 gene, partial
cds
GCTGCAAACTCTTTTCGACGGCCCTTAGCCAGCGCCGAATTCGGCGTACAAAGTCTGTTCTACACAAGTA
CACTGTGCAGCTGAGTGCCACCCCGGAAGGACCACATAGTCAACTACCCGGCGTCACATACCACCTCG
GGGTCCAGGACATCTCCGCTACGGCGATGTCATGGGTGCAGAAGATCACGGGAGGTGTGGGACTGTTGT
TGCTGTTGCCGCACTGATTCCTAATCGTGGTGGCTATGCGGTGTCGTTGAGCAGGCACTAACTTGACAATTA
GTATGAAGGTATATGTGTCCCTAAGAGACACACTGTACATAGCAAATAATCTATAGATCAAAGGGCTAC
GCAACCCCTGAATAGTAACAAAATACAAAATCACTAAAAATATAAAAACAGAAAATACATAAATAGGT
ATACGTGTCCCCTAAGAGACACATTGTATGTAGGTGATAAGTATAGATCAAAGGGCCGAATAACCCCTGA
ATAGTAACAAAATATGAAAATCAATAAAAATCATAAAAATAGAAAAACCATAAACAGAAAGTAGTTCAAAGG
GCT
```

El tiempo de procesamiento del programa para la búsqueda de los primers fue aproximadamente 72 segundos, al terminar el programa reporto una lista de los primers encontrados (Figura 6), en esta lista el primer par de primers obtenidos se muestran en la tabla 2.



**Figura 6. Vista de la página de resultados de Primer-BLAST. Se tiene una vista grafica de la ubicación del alineamiento de los primers y un reporte con información detallada de estos.**



**Tabla 1. Lista de primers diseñados con PrimerBlast, la lista solo contiene el primer par de primers diseñados, posteriores diseños no fueron necesarios en este caso.**

Primer	Secuencia
Forward	AATTCGGGTACAAGTCTGTCTAC
Reverse	GTAGTTGACTATGGTCCTTCGGG

Posteriormente, el par de primers obtenidos fueron analizados de forma *In silico* con los programas correspondientes.

### Análisis de los primers diseñados en PrimerBLAST

Inicialmente, se analizó el par de primers con Beacon Designer Free Edition, diseñado para la evaluación de oligos por sus propiedades termodinámicas y estructuras secundarias. Posteriormente, se analizó la secuencia amplificada con UNAFold, que permite predecir los plegamientos o hibridación de ácidos nucleicos (Markham & Zuker, 2008).

Los valores fisicoquímicos, los dímeros y horquillas que podrían formar los primers en el experimento de PCR fueron determinados mediante el software Beacon Designer (Figura 7).

**Figura 7. Resultados del análisis de los primers presentados por Beacon Designer estructuras secundarias entre los primers, junto con la energía libre de Gibbs estimada necesaria para romper los enlaces formados. Los primers qPCR para este estudio mostrados anteriormente contienen dímeros cruzados con una  $\Delta G$  de  $-2.4$  kcal/mol, dímeros entre los mismos tipos de primers con una  $\Delta G$  de  $-5.2$  kcal/mol y  $-1.5$  kcal/mol, horquillas con una  $\Delta G$  de  $-1$  kcal/mol, y una pinza GC.**

Reaction Conditions:						
Nucleic Acid Concentration (nM)	0.25		Monovalent Concentration (mM)	50		
Free Mg <sup>++</sup> Concentration (mM)	3		Total Na <sup>+</sup> Concentration (mM)	259.09		
Sense Primer: AATCCGCGTACAAGTCTGTTCTAC						
Length (bp)	Tm (°C)	GC%	GC Clamp	Cross Dimer (ΔG)	Self Dimer (ΔG)	Hairpin (ΔG)
25	59.44	44	1	-2.4	-5.2	-1.0
Anti-sense Primer: GTAGTGCACATAGTGGTCCCTCGGG						
Length (bp)	Tm (°C)	GC%	GC Clamp	Cross Dimer (ΔG)	Self Dimer (ΔG)	Hairpin (ΔG)
25	60.68	52	1	-2.4	-1.5	-1.1

De acuerdo a las condiciones de reacción estándar, los resultados obtenidos presentan un vínculo de color rojo que al activarlos se observa la sección donde se encuentran las estructuras secundarias identificadas, agrupadas según el tipo de estructura secundaria, Cross Dimer son las formaciones entre Forward y Reverse, Self Dimer son las formaciones entre dos primers del mismo tipo. Para este experimento en la Figura 7 se observan los resultados con  $\Delta G$  negativos, lo que implica la formación de varios dímeros y horquillas.

- 1) Para el primer forward (Sense primer) el valor de  $\Delta G$  fue de  $-5,2$  kcal/mol en categorizado un valor bajo de acuerdo a los valores de  $\Delta G$  reportados por Thornton & Basu, 2011, los mismos no deben ser menores a  $-3,5$  kcal/mol. Por lo tanto, existe la probabilidad que se formen estructuras secundarias de tipo 'Self Dimer', la energía necesaria para romper los enlaces de estos dímeros tendrá que ser mayor. Sin embargo, se debe observar si los dímeros tienen interacciones en los extremos 3'.
- 2) Para el primer reverse (Anti-sense primer) la posible formación del 'Self Dimer' presento un  $\Delta G$  de  $-1,5$  kcal/mol.!

Asimismo, se observó la presencia de una horquilla ( $\Delta G$  bajo  $-1$  kcal/mol) y un dímero en el primer Forward con interacción en el extremo 3' (Lorenz, 2012). Asimismo, en el parámetro 'Cross Dimer' se observó valores inferiores a  $-1$  kcal/mol lo cual indica la formación dímeros con interacciones en el extremo 3' con (Thornton & Basu, 2011).

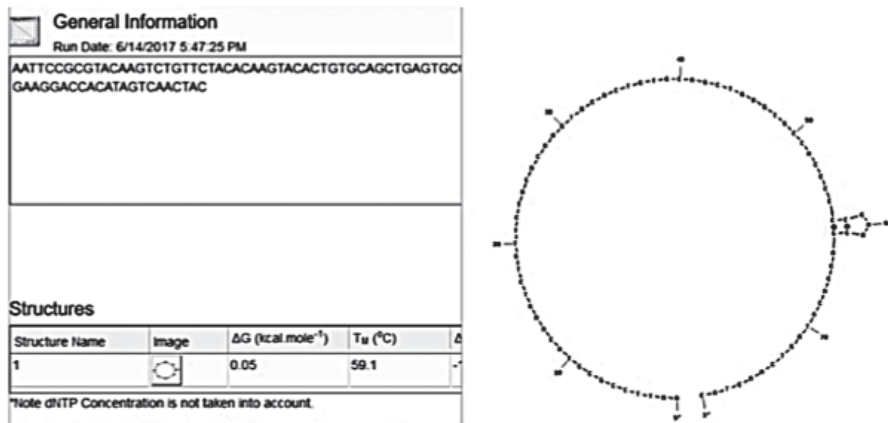
## Análisis del producto de amplificación del gen E1 obtenido mediante Primer-BLAST

El amplicon obtenido de 80 bp fue analizado mediante el software UNAFold, se identificó una estructura secundaria (Figura 4). Asimismo, se determi-

nó que la temperatura fusión era superior a la temperatura de alineamiento, por tanto, la formación de estructuras secundarias podría interferir en el desarrollo de la qPCR.

Por lo tanto, el Grupo de primers diseñados mediante Primer-BLAST para amplificar el gen E1 del virus CHKV deben ser descartados, y se deben evaluar otros primers.

**Figura 8. Vista de la página de UNAFold, se observan los resultados del análisis (Amplicon gen E1 CHKV) en una lista, según el número de estructuras secundarias, con sus valores fisicoquímicos. Se observa de forma gráfica en una ventana flotante la estructura secundaria.**



## Diseño de los primers con Primer3Plus

Se obtuvo 6 grupos de primers: A, B, C, D, E y F de acuerdo a la variación de penaltis, los grupos C y D no formaron estructuras secundarias ( $\Delta G$  negativas) de acuerdo a el software Beacon Designer, el primer reverse del Grupo B (Tabla 3), el  $\Delta G$  se encuentra dentro de los rangos de referencia (Thornton & Basu, 2011). Adicionalmente, se observa que los otros grupos si bien presentan una temperatura dentro del rango establecido, forman estructuras secundarias. La temperatura de fusión no debe superar los 60 °C ( $T_m$ ) (Thornton & Basu, 2011), ya que podría existir la formación de estructuras secundarias.

**Tabla 2. Lista de los pares de primers obtenidos de acuerdo a los penaltis. Se muestran las características fisicoquímicas de cada secuencia y el  $\Delta G$  para cada tipo de estructura secundaria, además del número de estructuras secundarias formadas. Grupo A sin uso de penaltis.**

GRUPO	PENALTI (Tm)	PRIMERS	Longitud	Tm (°C)	GC%	GC CLAMP	CROSS DIMER ( $\Delta G$ )	SELF DIMER ( $\Delta G$ )	HORQUI- LLAS ( $\Delta G$ )	ESTRUCTURAS SECUNDARIAS		CROSS DIMER
										Dímero	Horquilla	
A	0	F GTTCAGCAGGCACCTAATTGAC	22	57.28	50	1	-2.4	-0.9	-0.9	2	2	6
		R GGTTCGGTAGCCCTTTGATCT	21	57.89	52.38	1	-2.4	-2.0	0.0	1	0	
B	0	F GTGTGGGACTGGTTGTTCTGTTG	24	62.62	54.17	1	-1.1	0.0	0.0	0	0	9
		R TGTCAAGTTAGTGCCTGCTGAACGA	25	62.68	48	1	-1.1	-0.9	-0.9	2	2	
C	1	F CGGGCTCACATACCACCCCTC	20	59.9	65	1	0.0	0.0	0.0	0	0	0
		R AACAGCAACAACCCAGTCCCACA	22	60.26	50	1	0.0	0.0	0.0	0	0	
D	2	F CGGGTCACATACCACCCCTC	20	59.9	65	1	0.0	0.0	0.0	0	0	0
		R AACAGCAACAACCCAGTCCCACA	22	60.26	50	1	0.0	0.0	0.0	0	0	
E	3	F CTACCCGGTTCACATACCA	20	58.63	60	2	0.0	-4.3	0.0	1	0	0
		R CAACAGCAACAACCCAGTCCCA	21	58.5	52.38	2	0.0	0.0	0.0	0	0	
F	4	F CTACCCGGTTCACATACCA	20	58.63	60	2	0.0	-4.3	0.0	1	0	0
		R CAACAGCAACAACCCAGTCCCA	21	58.5	52.38	2	0.0	0.0	0.0	0	0	



Se observaron estructuras secundarias en los grupos de primers A, B, E y F, no obstante, los grupos A y B están dentro de los rangos aceptables ( $> -3.5$  kcal/mol y las interacciones entre las bases están distantes al extremo 3'). Sin embargo, los grupos E y F deben descartarse porque presentan  $\Delta G$  muy negativas y muestran interacciones en más de 2 pares de bases, estas interacciones pondrían afectar el rendimiento de la PCR.

**Tabla 3. Estructuras secundarias de los Grupos de primers obtenidas con Beacon Designer Free Edition. Las estructuras formadas deben ser examinadas para determinar si será posible la extensión, evitando la interacción de más de 2 bp en el extremo 3', que tengan un  $\Delta G$  menor a  $-3.5$  kcal/mol.**

GRUPO A			
Dímeros Secuencia Forward:		$\Delta G$	
5' GTTCAGCAGGCACTAACTTGAC 3'	-0.9	5'GTTCAGCAGGCACTAACTTGAC 3'	-0.7
3' CAGTTCAATCACGGACGACTTG 5'		3' CAGTTCAATCACGGACGACTTG 5'	
Horquillas Secuencia Forward:			
/CGGACGACTTG 5'	-0.9	/ACGACTTG 5'	-0.7
A		G	
\CTAACTTGAC 3'		\GCACTAACTTGAC 3'	
Dímeros Secuencia Reverse:			
5' GGTGCGTAGCCCTTGATCT 3'	-2.0		
3' TCTAGTTCCCGATGCGTTGG 5'			
Dímeros entre Primers Forward y Reverse:			
5' GTTCAGCAGGCACTAACTTGAC 3'	-2.4	5' GTTCAGCAGGCACTAACTTGAC 3'	-2.0
:		:       :	
3' TCTAGTTCCCGATGCGTTGG 5'		3' TCTAGTTCCCGATGCGTTGG 5'	
5' GTTCAGCAGGCACTAACTTGAC 3'	-2.0	5' GTTCAGCAGGCACTAACTTGAC 3'	-1.3
:		:	
3' TCTAGTTCCCGATGCGTTGG 5'		3' TCTAGTTCCCGATGCGTTGG 5'	
5' GTTCAGCAGGCACTAACTTGAC 3'	-0.7	5' GTTCAGCAGGCACTAACTTGAC 3'	-0.1
:		:       :	
3' TCTAGTTCCCGATGCGTTGG 5'		3' TCTAGTTCCCGATGCGTTGG 5'	
GRUPO B			
Dímeros Secuencia Reverse:			
5' TGCAAGTTAGTGCCTGCTGAACGA 3'	-0.9	5' TGCAAGTTAGTGCCTGCTGAACGA 3'	-0.7
3' AGCAAGTCGTCGGTGAATGACTGT 5'		3' AGCAAGTCGTCGGTGAATGACTGT 5'	

Horquillas Secuencia Reverse:			
/GATTGAACTGT 5'	-0.9	\GCCTGCTGAACGA 3'	-0.7
T		C	
/CGTGATTGAACTGT 5'		\TGCTGAACGA 3'	
Dímeros entre Primers Forward y Reverse:			
5' GTGTGGGACTGGTTGTTGCTGTTG 3'	-1.1	5' GTGTGGGACTGGTTGTTGCTGTTG 3'	-0.8
3' AGCAAGTCGTCCTGTGATTGAACTGT 5'		3' AGCAAGTCGTCCTGTGATTGAACTGT 5'	
5'GTGTGGGACTGGTTGTTGCTGTTG 3'	-0.8	5'GTGTGGGACTGGTTGTTGCTGTTG3'	-0.7
3' AGCAAGTCGTCCTGTGATTGAACTGT 5'		3' AGCAAGTCGTCCTGTGATTGAACTGT 5'	
5' GTGTGGGACTGGTTGTTGCTGTTG 3'	-0.7	5' GTGTGGGACTGGTTGTTGCTGTTG 3'	-0.7
3' AGCAAGTCGTCCTGTGATTGAACTGT 5'		3' AGCAAGTCGTCCTGTGATTGAACTGT 5'	
5' GTGTGGGACTGGTTGTTGCTGTTG 3'	-0.7	5' GTGTGGGACTGGTTGTTGCTGTTG 3'	
3' AGCAAGTCGTCCTGTGATTGAACTGT 5'		3' AGCAAGTCGTCCTGTGATTGAACTGT 5'	
5' GTGTGGGACTGGTTGTTGCTGTTG 3'	-0.7		
3' AGCAAGTCGTCCTGTGATTGAACTGT 5'			
GRUPO E y F			
Dímeros Secuencia Forward:			
5' CTACCCGGCGTCACATACCA 3'	-4.3		
3' ACCATACACTGCGGCCCATC 5'			

Se determinó que al asignar valores 1 y 2 como penaltis, los primers diseñados son de mayor estabilidad, y al analizarlos en Beacon Designer no formaron estructuras secundarias, lo que implica que la PCR que se realice con estos primers tendría mejores resultados. Por otro lado, al asignar valores de penaltis mayores a 2, se observa la formación de estructuras secundarias.

### Análisis de los amplicones obtenidos en Primer3Plus.




Los amplicones por cada Grupo de primers diseñados en Primer3Plus fueron analizados en UNAFold. En la Figura 5, los primers del Grupo C y D presentaban un  $\Delta G$  positivo o nulo, no obstante los valores de  $T_m$  están dentro de los valores de referencia, por tanto se determinó que los mismos son adecuados para realizar un ensayo de qPCR en el cual la reacción no excede la temperatura de alineamiento de  $60^\circ\text{C}$ , por tanto, esta reacción es efectiva.

**Figura 5. Resultados del análisis en UNAFold de amplicones resultantes.**  
**A. Gen E1 P3P A, amplicon de los primers con penaltis de 0 (Grupo A).**  
**B. Gen E1 P3P B, amplicon de los primers sin formación de estructuras secundarias.**  
**C. Gen E1 P3P Grupos C y D),**

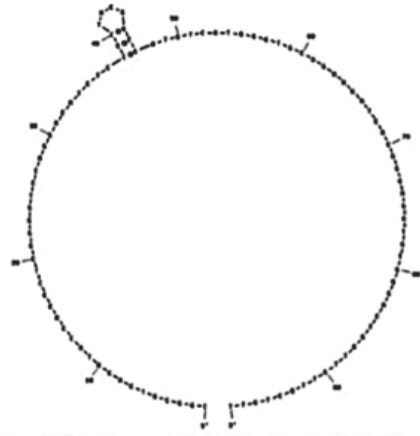
**A General Information**  
 Run Date: 6/14/2017 5:55:07 PM  
 CGGCGTCACATACCACCCTCGGGTCCAGGACATCTCCGCTACGGCGAT  
 TGCAGAAGATCAGGGAGGTGTGGACTGGTTGTTGCTGTT

---

**Structures**

Structure Name	Image	$\Delta G$ (kcal mole <sup>-1</sup> )	$T_M$ (°C)
1		0.04	59.6
2		0.4	52.4
3		0.5	57.9




\*Note dNTP Concentration is not taken into account.



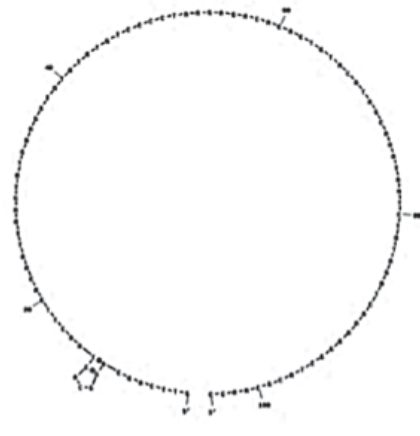
**B General Information**  
 Run Date: 6/14/2017 5:49:47 PM  
 GTTCAGCAGGACTAAGTACCAATTAAGTATGAAGGTATATGTGCCCT  
 CACTGTACATAGCAATAATCTATAGATCAAAGGGCTACGCAACC

---

**Structures**

Structure Name	Image	$\Delta G$ (kcal mole <sup>-1</sup> )	$T_M$ (°C)
1		0.63	34.9
2		1.03	52.5
3		1.57	26.4




\*Note dNTP Concentration is not taken into account.



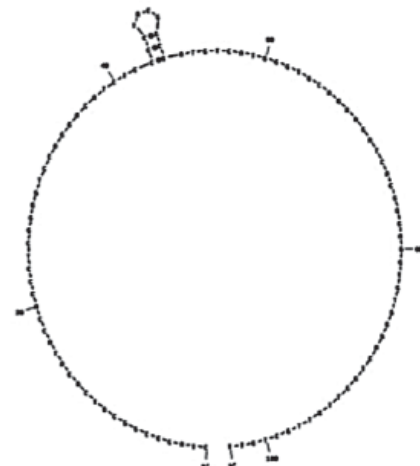
**C General Information**  
 Run Date: 6/14/2017 5:56:43 PM  
 CTACCCGGCGTCACATACCACCCTCGGGTCCAGGACATCTCCGCTACGG  
 TGGGTGCAGAAGATCAGGGAGGTGTGGACTGGTTGTTGCTGTT

---

**Structures**

Structure Name	Image	$\Delta G$ (kcal mole <sup>-1</sup> )	$T_M$ (°C)
1		0.04	59.6
2		0.4	52.4
3		0.5	57.9

\*Note dNTP Concentration is not taken into account.





Con respecto a los resultados obtenidos, se observó que el uso de penalis en el software Primers3plus permitió una búsqueda más adecuada de primers, que poseen un equilibrio entre especificidad y eficiencia para un mejor rendimiento en el ensayo de PCR en tiempo real. A diferencia del diseño de primers mediante el uso del software Primers3 en el cual se observó la formación de estructuras secundarias.

Para diseñar primers se debe tener en cuenta no solo los tiempos de análisis, sino el tiempo de búsqueda que dependerá principalmente de la longitud de la secuencia. En este sentido, diferentes software tienen en sus parámetros o variables, valores predeterminados automatizados y avanzados, dirigidos específicamente al diseño de primers de acuerdo a los tipos de PCR.

### Especificidad de los primers diseñados

La especificidad de los primers fueron evaluados mediante el sitio web de Nucleotide-BLAST, los resultados obtenidos se observan en la Tabla 5, todos los primers presentaron un porcentaje de cobertura de 100%, lo cual indica alta similitud de la secuencia con el gen E1 de virus de la Chikungunya.

Se determinó que el E-valor más cercano a la nulidad corresponde al grupo B con 0.002, seguido del grupo A con 0.024, pero este grupo no coincide con el target que se busca; y por último los grupos C, D, E y F coinciden con el target que se busca, esta medida es más significativa cuanto más cerca de 0.0 esté, (Sánchez, 2012), la cual es la medida más significativa para evaluar la especificidad de primers en el portal Blast del NCBI.

Por lo tanto, todos los grupos, excepto el grupo A, han tenido resultados significativos para el target de búsqueda, óptimos para su uso en la identificación del virus de la Chikungunya mediante PCR en tiempo real.

**Tabla 5. Análisis BLAST de los grupos de primers diseñados mediante software Primer3Plus.**

Grupo	Descripción	Puntaje Max	Puntaje Total	Cobertura	Valor E	Ident	Nº Acceso
A	Chikungunya virus isolate CHIKV/Homo sapiens/Brazil/2016/35AP	44.1	44.1	100%	0.024	100%	KY704955.1
B	Chikungunya virus isolate 13DX-16-0491 E1 gene, partial cds	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KY131440.1
C y D	Chikungunya virus isolate 13DX-16-0491 E1 gene, partial cds	40.1	40.1	100%	0.25	100%	KY131440.1
E y F	Chikungunya virus isolate 13DX-16-0491 E1 gene, partial cds	40.1	40.1	100%	0.25	100%	KY131440.1

## CONCLUSIONES

Existen varias guías para el diseño de primers, en este trabajo se han diseñado primers *In silico* empleando dos tipos de software libres, Primer-BLAST y Primer3Plus, para amplificar la región del gen E1 del virus de la Chikungunya empleando los mismos parámetros de entrada para ambos softwares y se determinó la factibilidad, eficacia que presenta el uso de penaltis y la eficiencia de Primer3Plus que permitió ajustar los parámetros establecidos y el ajuste de penaltis a un solo parámetro ( $T_m$ ), para obtener primers más específicos sin alterar los parámetros requeridos para llevar a cabo el ensayo de PCR. Los primers obtenidos mediante Primer3Plus son más estables y específicos. Por lo tanto, emplear el uso de penaltis a los diferentes parámetros permitiría mejorar la calidad de los primers y por ende efectivizar un ensayo de qPCR.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado gracias al apoyo académico del Dr. Oscar Cárdenas.

## REFERENCIAS

- Alicia Rodríguez, M. R. (2015). Design of Primers and Probes for Quantitative. En J. M. Walker, PCR Primer Design (págs. 31-56). New York: Chhandak Basu.
- Apte, A. (8 de Agosto de 2007). PREMIER Biosoft International announced today the release of a free edition of Beacon Designer, their popular oligo design tool for real time PCR. Obtenido de PREMIER Biosoft: [http://www.premierbiosoft.co/news/news/Beacon\\_Designer\\_FreeEdition.html](http://www.premierbiosoft.co/news/news/Beacon_Designer_FreeEdition.html)
- Camilo, C., Lima, G., Maluf, V., Guido, R., & Polikarpov, I. (2016). HTP-OligoDesigner: An Online Primer Design Tool for High-Throughput Gene Cloning and Site-Directed Mutagenesis. *Journal of Computational Biology*, 23(1), 27-29.
- Chuang, L.-Y., Cheng, Y.-H., & Yang, C.-H. (2013). Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnol Lett*, 1-9.
- Benson, D., Karsch, I., Lipman, D., Ostell, J., Rapp, B. & Wheeler, P. (2000). GenBank. Obtenido de National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* 28(1): 15-18.
- Evia, J. R. (2015). Fiebre chikungunya. ¿Es acaso la próxima amenaza? *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*. 62 (1): 20-32.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I. & Rozen, S. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 13:134.
- Kim, H., Kang, N., An, K., Koo, J., & Kim, M.-S. (6 de Mayo de 2016). MRPrimerW: a tool for rapid design of valid high-quality primers for multiple target qPCR experiments. *Nucleic Acids Research Advance Access*, 1-8.
- Lee, E., Kim, E., Shin, Y., & Song, J. (2015). Design and testing of multiplex RT-PCR primers for the rapid detection of influenza A virus genomic segments: Application to equine influenza virus. *Journal of Virological Methods*. 228 (1): 114-122.
- Lorenz, T. C. (Mayo de 2012). Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments*. (63): 1-15.
- Markham, N. & Zuker, M. (2008). UNAFold: software for nucleic acid folding and hybridization. *Methods Mol Biol*. 453:3-31
- Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J. Y., Sato, K., . . . Iwasaki, W. (2015). MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society Open Science*, 33.
- NA. (s.f.). TECHVAULT. Obtenido de Integrated DNA Technologies, Inc.: <http://www.idtdna.com/pages/support/technical-vault/faq-old/application-support/scitools/faqs/2011/06/24/what-is-the-recommended-delta-g-value-for-self-and-hetero-dimers>
- Pachón, D. M. (8 de Febrero de 2017). DISEÑO DE OLIGONUCLEOTIDOS INICIA-

- DORES (Primers). Obtenido de Centro de Bioinformática del Instituto de Biotecnología Universidad Nacional de Colombia: <http://bioinf.ibun.unal.edu.co/documentos/primers/primer.php>
- Prediger, E. (s.f.). Designing PCR primers and probes. Obtenido de Integrated DNA Technologies, Inc.: <http://www.idtdna.com/pages/decoded/decoded-articles/pipet-tips/decoded/2013/10/21/designing-pcr-primers-and-probes>
- Presti, A., Lai, A., Cella, E., Zehender, G., & Ciccozzi, M. (2014). Chikungunya virus, epidemiology, clinics and phylogenesis. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 7 (12): 925-932.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Córdoba, J., & Andrade, M. (2015). Design of Primers and Probes for Quantitative Real-Time PCR Methods. *Methods Mol Biol*. 1275 (1) :31-56.
- Sánchez, A. (20 de Junio de 2012). Aplicaciones guiadas: Blast. *Genome Browsers*. Obtenido de UNITAT D'ESTADÍSTICA I BIOINFORMÁTICA: <http://ueb.vhir.org/dl584>
- Thierry, A. R., Mouliere, F., Messaoudi, S. E., Mollevi, C., Lopez-Crapez, E., Rolet, F., . . . Nouaille, M. (2014). Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. *Nature Medicine*, 430-435.
- Thornton, B., & Basu, C. (2011). Real-Time PCR (qPCR) Primer Design Using Free Online Software. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. 39 (2): 145-54.
- Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., & Leunissen, J. A. (2007). Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res*. 35 (Web Server issue): W71-W74.
- Wang, Y., Tiwari, V. K., Rawat, N., Gill, B. S., Huo, N., You, F., & Gu, Y. (2016). GSP: a web-based platform for designing. *Bioinformatics Advance Access*. 32 (15): 1-2.
- Yang, Y., Kung, T., Hu, C., & Lin, S. (2015). Development of primer pairs from diverse chloroplast genomes for use in plant phylogenetic research. *Genetics and Molecular Research*. 14 (4): 14857-14870