

PCR (Polimerase Chain Reaction)

Polymerase Chain Reaction telah di gunakan secara luas sebagai salah satu penemuan paling penting abad ke-20 dalam biologi molekular. PCR telah dipakai untuk mengidentifikasi dan memanipulasi DNA, mendeteksi infeksi organism (HIV, hepatitis, TBC, HIN5, H1N1), mendeteksi variasi genetic (SSR, RAPD, AFLP) dan lainnya. PCR melibatkan tiga langkah berikut: denaturasi, annealing dan ekstensi. Pertama, materi genetik (DNA) didenaturasi, mengubah untai ganda molekul DNA menjadi untai tunggal. Kedua, Primer kemudian mengikat ke DNA komplementernya (annealing). ketiga, DNA akan digandakan/diperpanjang oleh DNA polimerase. Semua langkah ini sangat tergantung dengan suhu/ suhu sensitif yang pada umumnya terjadi berkisar pada suhu 94°C (denaturasi), 60°C (annealing) dan 72°C (elongasi).

Desain primer yang baik sangat penting untuk keberhasilan reaksi PCR. Pertimbangan desain yang penting yang diuraikan di bawah ini sebagai kunci untuk amplifikasi spesifik dengan hasil tinggi.

1. Panjang Primer:

Hal ini secara umum diterima bahwa panjang optimal primer PCR adalah 18-22 mer (basa).

2. Primer Melting Temperature:

Primer Melting Temperature (T_m) merupakan temperatur yang diperlukan oleh separoh primer dupleks mengalami disosiasi/lepas ikatan. Primer dengan T_m berkisar antara 52-58 °C sangat ideal, sedangkan T_m diatas 65°C akan mengurangi efektifitas annealing sehingga proses amplifikasi DNA kurang berjalan baik. T_m ini sangat ditentukan oleh jumlah basa GC (GC contains).

T_m primer dapat dihitung dengan formula:

A. T_m (°C) = ((G+C) x4) + ((A+T) x2).....secara kasar (kurang akurat)

B. T_m (°C) = { $\Delta H / \Delta S + R \ln(C)$ } - 273.15.....secara akurat

3. Primer annealing temperature :

The primer annealing temperature (T_a) merupakan suhu yang diperkirakan primer dapat berikatan dengan template (DNA) dengan stabil (DNA-DNA hybrid stability). Jika suhu aneling tinggi akan menyulitkan terjadinya ikatan primer dengan DNA template sehingga akan menghasilkan produk PCR yang rendah (kurang efisien). Namun jika T_a terlalu rendah akan menyebabkan terjadinya penempelan primer pada DNA template yang tidak spesifik. T_a dapat dihitung dengan menggunakan formula di bawah ini:

$$T_a = 0.3 \times T_m(\text{primer}) + 0.7 T_m(\text{product}) - 14.9$$

$$T_m(\text{primer}) = T_m \text{ primer}$$

$$T_m(\text{product}) = T_m \text{ produk PCR}$$

4. GC Content :

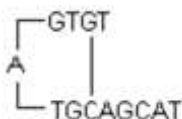
Jumlah Basa G dan C (GC content) di dalam primer yang ideal sekitar 40-60%.

5. GC Clamp :

Jumlah basa G dan C yang terdapat pada 5 basa terakhir (3') disebut dengan GC clamp. GC clamp yang baik sekitar 3 basa G/C dan tidak melebihi 5 basa G/C. keberadaan G/C di ujung 3' primer sangat membantu terjadinya stabilitas ikatan antara primer dengan DNA template yang diperlukan untuk inisiasi polymerase DNA (proses PCR).

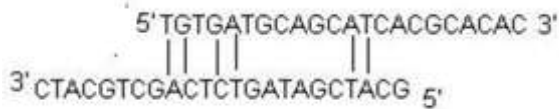
6. Primer Secondary Structures :

- i) Hairpins : terbentuknya struktur loop/hairpin pada primer sebaiknya dihindari, namun sangat sulit untuk memperoleh primer tanpa memiliki struktur hairpin. Hairpin pada ujung 3' dengan ΔG (energy yang diperlukan untuk memecah struktur hairpin) = -2 kcal/mol dan hairpin internal dengan $\Delta G = -3$ kcal/mol masih dapat ditoleransi.



ii) Self Dimer : primer dapat berikatan dengan primer lainnya yang sejenis disebut dengan self-dimer . self-dimer pada ujung 3' dengan $\Delta G = -5$ kcal/mol dan self- dimer pada bagian internal dengan $\Delta G = -6$ kcal/mol masih dapat ditoleransi.

iii) Cross Dimer : Primer dapat berikatan dengan primer pasangannya (reverse dan forward) sehingga disebut cross dimmers. Cross dimer re homologous. Optimally a 3' end cross dimer with a ΔG of -5 kcal/mol and an internal cross dimer pada ujung 3' dengan $\Delta G = -5$ kcal/mol dan self- dimer pada bagian internal dengan $\Delta G = -6$ kcal/mol masih dapat ditoleransi.



7. Repeats : primer sebaiknya tidak memiliki urutan pengulangan dari 2 basa dan maksimum pengulangan 2 basa sebanyak 4 kali masih dapat di toleransi. Misalnya ATATATAT.

8. Runs : Primers sebaiknya tidak memiliki urutan basa yang di ulang terus menerus. Pengulangan basa berurutan sampai 4 kali masih dapat di toleransi. Misalnya AGCGGGGATGGGG memiliki urutan basa G diulang 5 kali berturut-turut.

9. Avoid Cross homology : untuk meghindari cross homologi dapat dilakukan dengan cara menganalisis homologi primer dengan DNA genome melalui BLAST-NCBI.

10. Amplicon Length :

Panjang PCR produk yang ideal berkisar antara 100-500 basang basa.

11. Optimum Annealing temperature (T_a Opt):

Suhu annealing optimum sangat mempengaruhi hasil pcr. T_a Opt ini dapat dihitung dengan cara

$$T_a \text{ Opt} = 0.3 \times (T_m \text{ of primer}) + 0.7 \times (T_m \text{ of product}) - 25$$

5. Primer Pair T_m Mismatch:

Perbedaan T_m sepasang primer sebaiknya tidak lebih dari 5°C.

3. diperoleh hasil seperti di bawah

NCBI Primer-BLAST : results

Input PCR template: [NM_001167506.1](#) Homo sapiens RAB35, member [RAS oncogene family \(RAB35\)](#), transcript variant 7, mRNA (1-882)

Specificity of primers: [Primer pairs are specific to input template as no other targets were found in selected database: Genome database \(reference assembly only\) for specific species \(Organism limited to Homo sapiens\).](#)

For better specificity checking, we have substituted the PCR template with the GenBank refseq record [NM_001167606.1](#) which is identical to your input template

Summary of primer pairs

Note: A double in the template graph indicates the read-end position.

Detailed primer reports

Primer pair 1

| | Sequence (5'>3') | Strand on template | Length | Start | Stop | Tm | GC% |
|----------------|------------------------|--------------------|--------|-------|------|-------|--------|
| Forward primer | CAGCGGTGTGGGCAAGAGCA | Plus | 20 | 237 | 256 | 59.90 | 65.00% |
| Reverse primer | GACTGGAGTGGGCAAGGCGTGG | Minus | 20 | 1444 | 1473 | 59.07 | 70.00% |

4. di analisis dimer dan hairpin dengan software OLIGO ANALYZER

5. ORDER PRIMER