Centro de Treinamento Life Technologies	**TUTORIAL**	**Submissão de Sequências (Customização de TaqMan Assays)**

1. **OBJETIVO**: Análises prévias para submissão de sequências utilizadas para desenho de Assays TaqMan (Expressão Gênica e Genotipagem).

2. **RESPONSÁVEIS:** Todos os usuários de Custom TaqMan Assays.

3. **DESCRIÇÃO DO PROCEDIMENTO :**

O sucesso de customização dos Ensaios TaqMan depende fundamentalmente da qualidade da sequência que será utilizada para o desenho dos oligos. Para isso, durante o processo de escolha das sequências deve-se levar em conta os seguintes pontos:

- ✓ **Relevância biológica;**
- ✓ **Ambiguidades – substituir por N;**
- ✓ **Criteriosas análises de bioinformática;**
- ✓ **Escolha dos "target sites".**

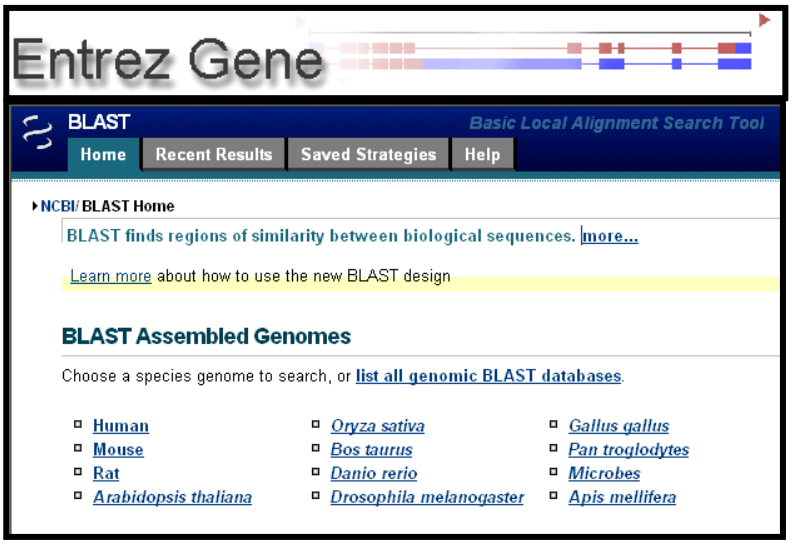
3.1 – Busca da Sequência Alvo

Buscar a sequência de interesse nos bancos de dados relacionados (Ex.: Entrez Gene, VectorBase, Ensembl etc).

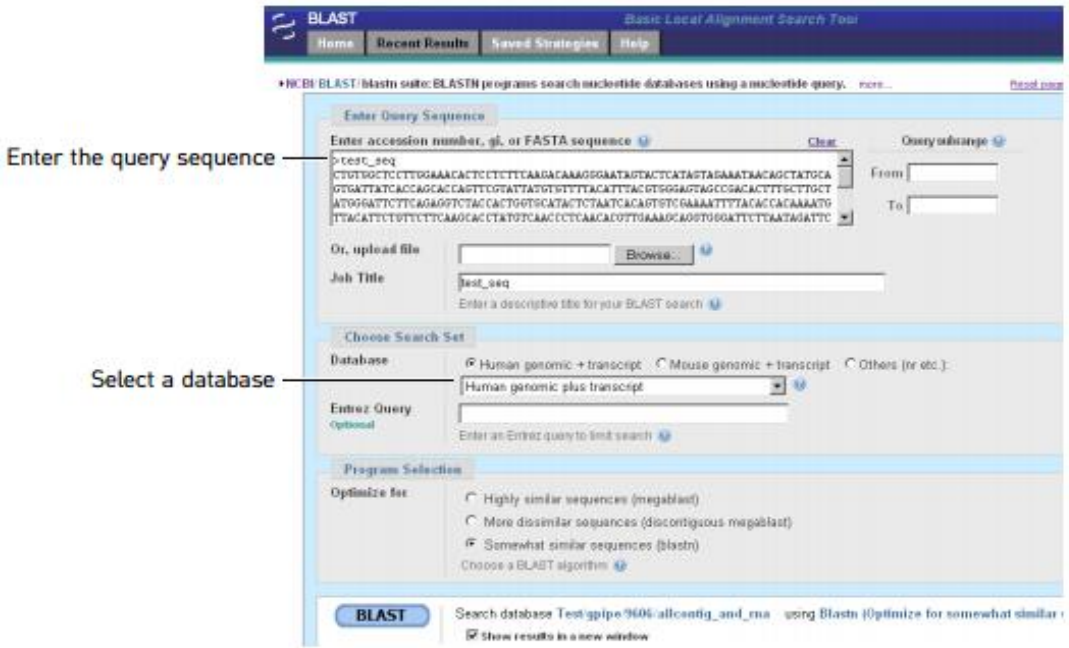
Observação: antes da pesquisa da sequência de estudo, verifique na literatura informações detalhadas sobre suas sequências alvo (por exemplo, se possui ou não isoformas de splicing, variantes, polimorfismos, regiões codificadoras e não codificadoras, e regiões promotoras). Caso seja análise de expressão gênica, verique sequências de exons e introns e priorize o desenho das sondas e/ou primers (caso seja TaqMan) ou de primers (caso seja intercalante de DNA) em junções exon-exon.

3.2 - Avaliação da Sequência Alvo - Relevância Biológica (BLAST)

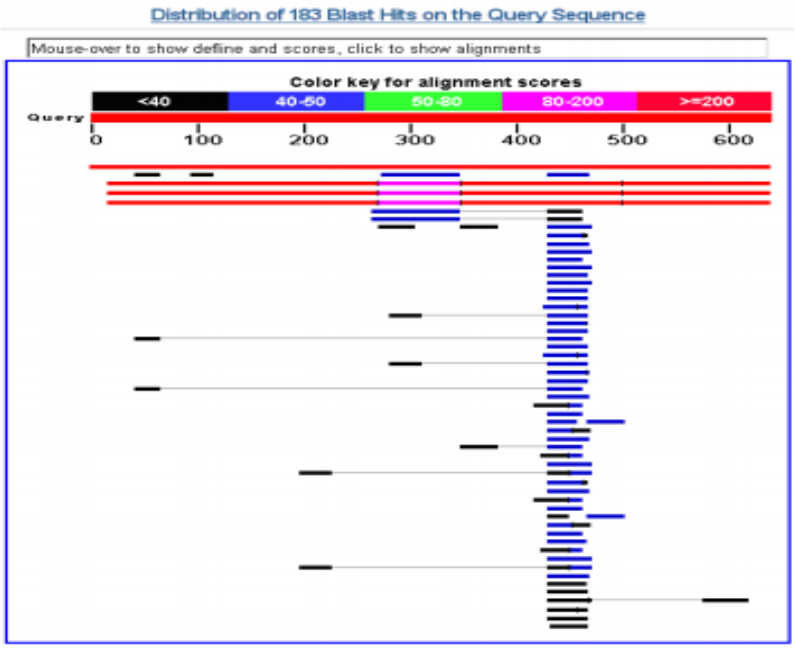
a) Acesse o link http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/ e insira a sequência de interesse (formato fasta):



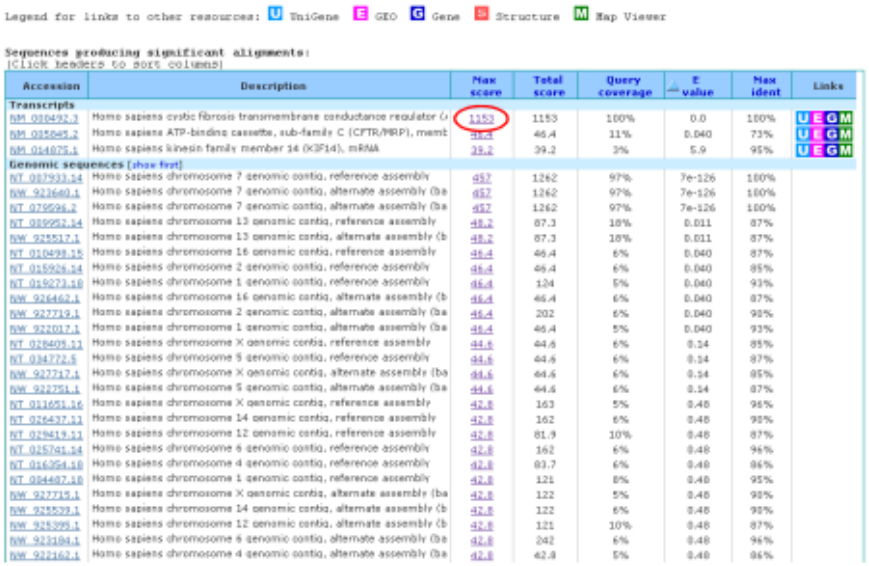
b) Inserção da sequência alvo (formato fasta)



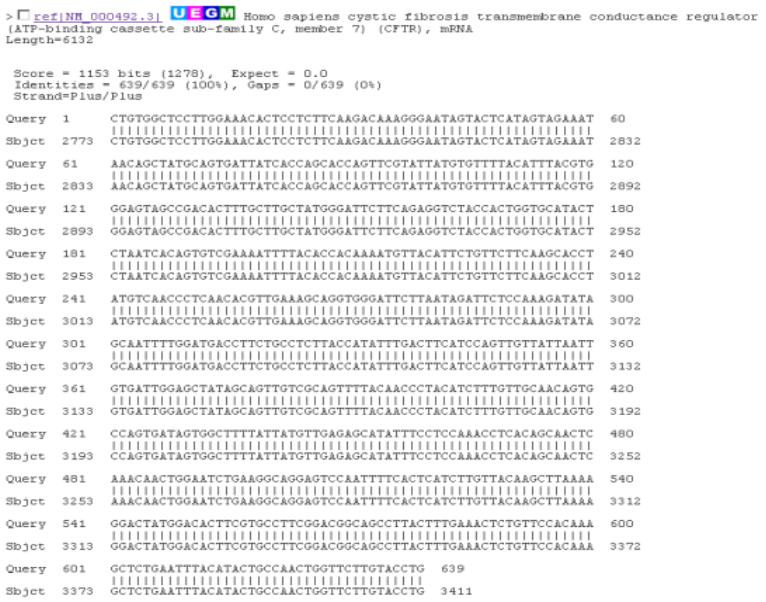
d) Representação gráfica do resultado da busca (alinhamento) realizado no BLAST



e) Verificar o perfil de *matching* da sequência submetida em relação ao organismo estudado e especificidade da sequência alvo.

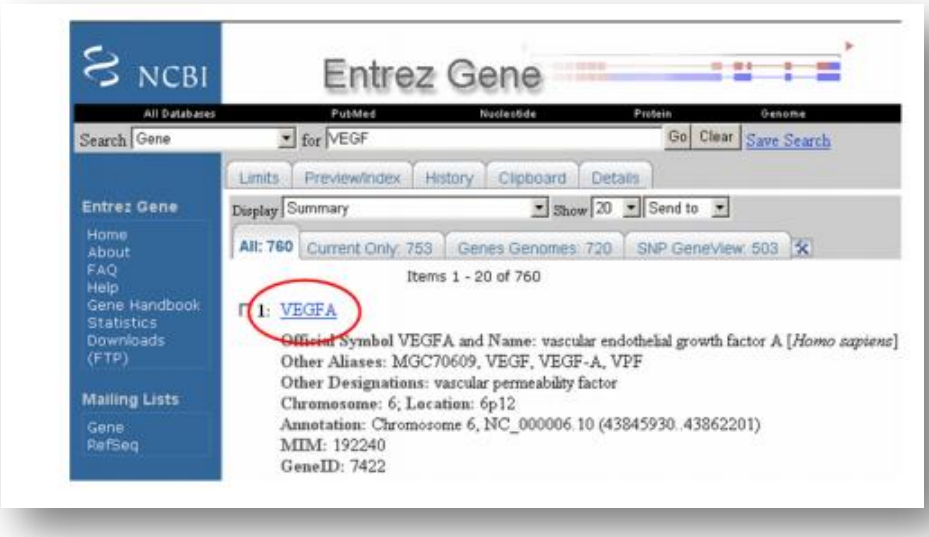


f) Checagem da sequência escolhida por meio do perfil de matching acima estabelecido (especificidade da sequência).

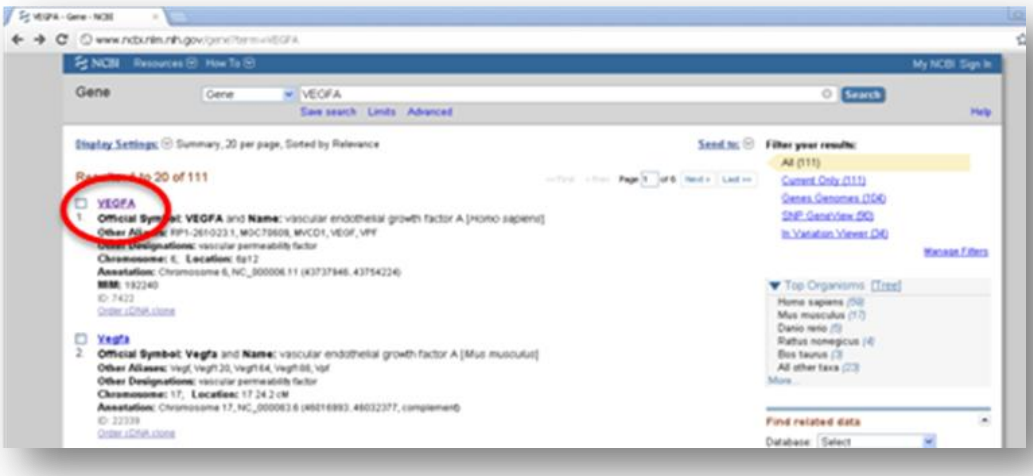


```
>ref|NM_000492.3| UEGM Homo sapiens cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
(ATP-binding cassette sub-family C, member 7) (CFTR), mRNA
Length=6132

 Score = 1153 bits (1278),  Expect = 0.0
 Identities = 639/639 (100%), Gaps = 0/639 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1     CTGTGGCTCCTTGGAAACACTCCTCTTCAAGACAAAGGGAATAGTACTCATAGTAGAAAT  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2773  CTGTGGCTCCTTGGAAACACTCCTCTTCAAGACAAAGGGAATAGTACTCATAGTAGAAAT  2832

Query  61    AACAGCTATGCAGTGATTATCACCAGCACCAGTTCGTATTATGTGTTTTACATTTACGTG  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2833  AACAGCTATGCAGTGATTATCACCAGCACCAGTTCGTATTATGTGTTTTACATTTACGTG  2892

Query  121   GGAGTAGCCGACACTTTGCTTGCTATGGGATTCTTCAGAGGTCTACCACTGGTGCATACT  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2893  GGAGTAGCCGACACTTTGCTTGCTATGGGATTCTTCAGAGGTCTACCACTGGTGCATACT  2952

Query  181   CTAATCACAGTGTCGAAAATTTTACACCACAAAATGTTACATTCTGTTCTTCAAGCACCT  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2953  CTAATCACAGTGTCGAAAATTTTACACCACAAAATGTTACATTCTGTTCTTCAAGCACCT  3012

Query  241   ATGTCAACCCTCAACACGTTGAAAGCAGGTGGGATTCTTAATAGATTCTCCAAAGATATA  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  3013  ATGTCAACCCTCAACACGTTGAAAGCAGGTGGGATTCTTAATAGATTCTCCAAAGATATA  3072

Query  301   GCAATTTTGGATGACCTTCTGCCTCTTACCATATTTGACTTCATCCAGTTGTTATTAATT  360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  3073  GCAATTTTGGATGACCTTCTGCCTCTTACCATATTTGACTTCATCCAGTTGTTATTAATT  3132

Query  361   GTGATTGGAGCTATAGCAGTTGTCGCAGTTTTACAACCCTACATCTTTGTTGCAACAGTG  420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  3133  GTGATTGGAGCTATAGCAGTTGTCGCAGTTTTACAACCCTACATCTTTGTTGCAACAGTG  3192

Query  421   CCAGTGATAGTGGCTTTTATTATGTTGAGAGCATATTTCCTCCAAACCTCACAGCAACTC  480
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  3193  CCAGTGATAGTGGCTTTTATTATGTTGAGAGCATATTTCCTCCAAACCTCACAGCAACTC  3252

Query  481   AAACAACTGGAATCTGAAGGCAGGAGTCCAATTTTCACTCATCTTGTTACAAGCTTAAAA  540
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  3253  AAACAACTGGAATCTGAAGGCAGGAGTCCAATTTTCACTCATCTTGTTACAAGCTTAAAA  3312

Query  541   GGACTATGGACACTTCGTGCCTTCGGACGGCAGCCTTACTTTGAAACTCTGTTCCACAAA  600
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  3313  GGACTATGGACACTTCGTGCCTTCGGACGGCAGCCTTACTTTGAAACTCTGTTCCACAAA  3372

Query  601   GCTCTGAATTTACATACTGCCAACTGGTTCTTGTACCTG  639
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  3373  GCTCTGAATTTACATACTGCCAACTGGTTCTTGTACCTG  3411
```

g) Após avaliar a relevância da sequência e identificar a região de interesse, proceder com o mapeamento físico do gene para encontrar a melhor região para desenho do ensaio. Para isso acesse o site http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/ e selecione Gene.



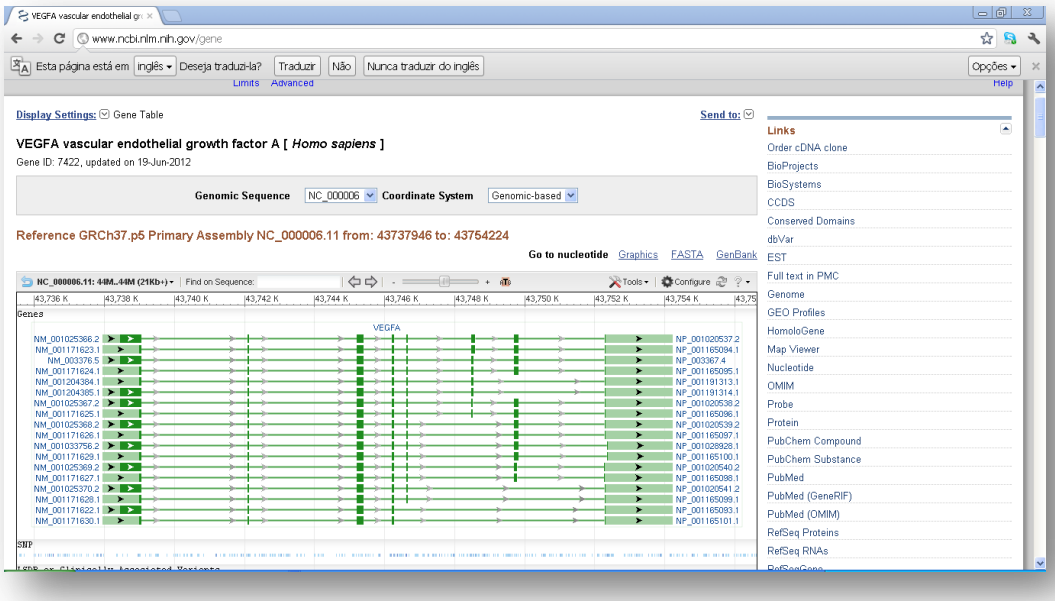
Centro de Treinamento Life Technologies	**TUTORIAL**	**Submissão de Sequências (Customização de TaqMan Assays)**



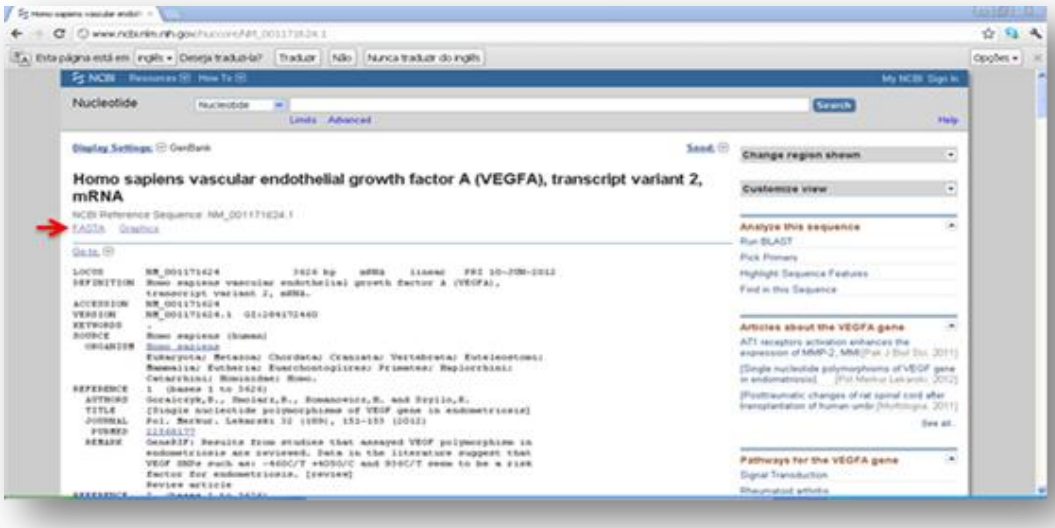
Elaborado por: FMU	Revisado por: JCR	Ass.:	**Data 23.01.2014**

Centro de Treinamento Life Technologies	**TUTORIAL**	**Submissão de Sequências (Customização de TaqMan Assays)**

O Mapeamento físico de uma sequência vai possibilitar aescolha/validação da região de interesse que será utilizada no desenho dos oligos. Nesse momento há possibildiade de escolher a sequência inteira ou parte dessa.

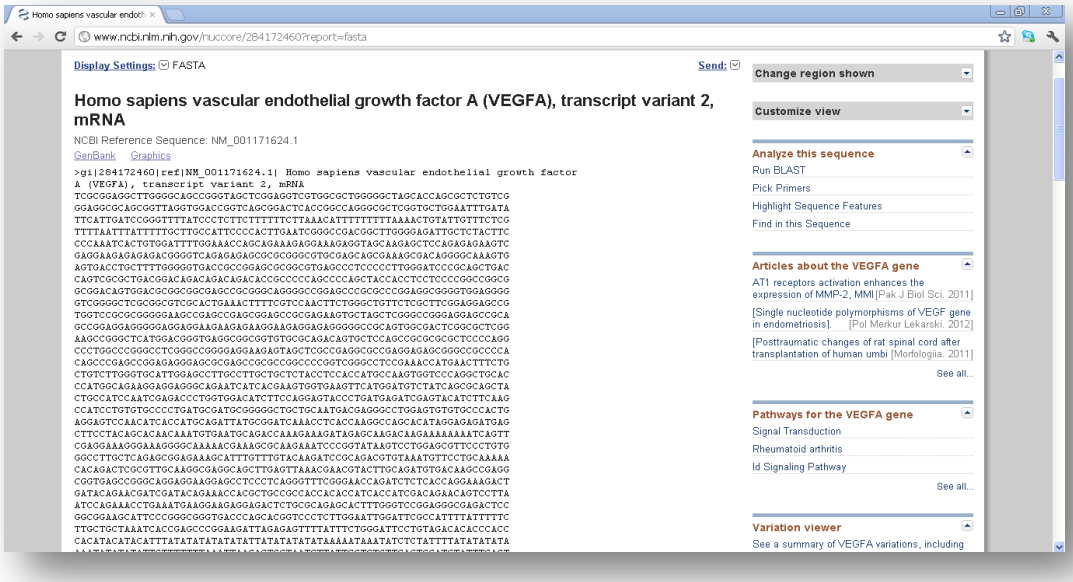


Supondo que seja utilizada uma parte da sequência previamente validada:

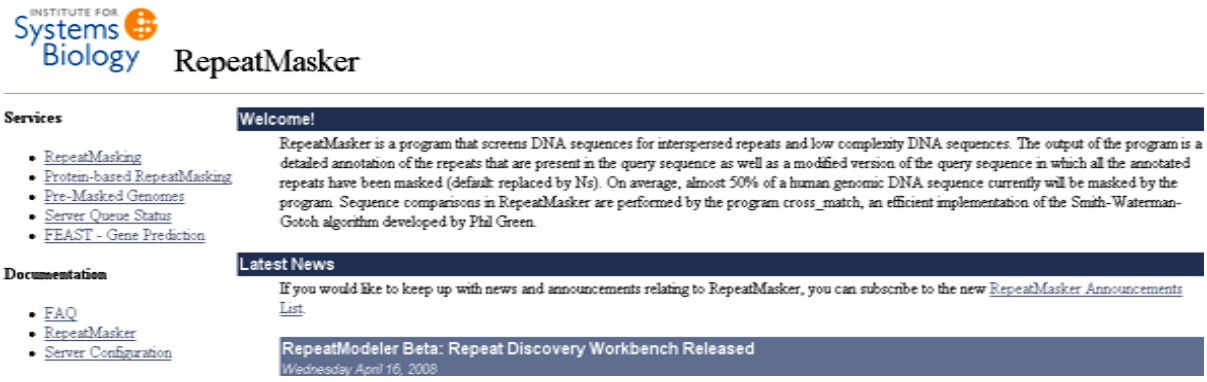


Elaborado por: FMU	Revisado por: JCR	Ass.:	**Data 23.01.2014**

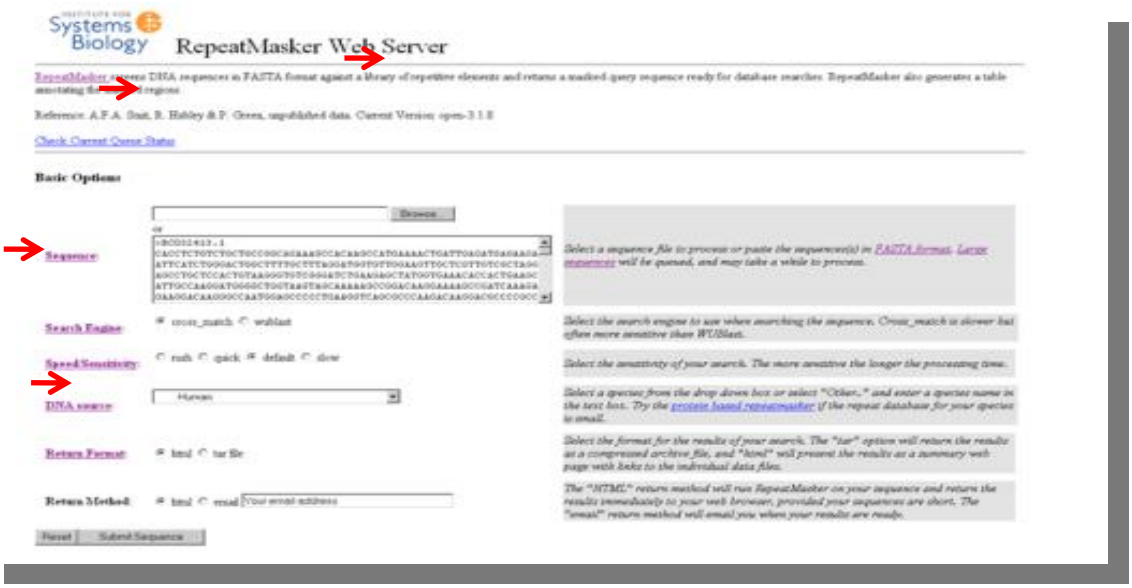
Pegue a sequência FASTA.



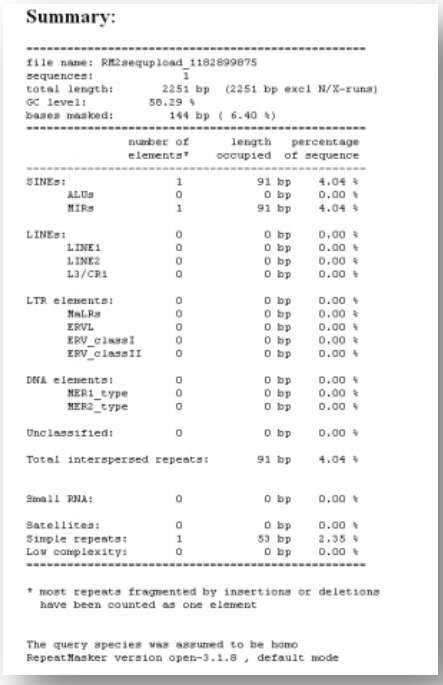
h) Acesse o programa: http://www.repeatmasker.org/ para fazer o mascaramento de regiões repetitivas e de baixa complexidade.



Insira a o fragmento previamente escolhido e avaliado quanto a relevância biológica e especificidade. Para isso pode se importar o fragmento (por meio do *Browser*) ou Copiar e Colar. Escolha o Organismo (*DNA source*) e submeta.



Um relatório sobre a existência de sequências repetitivas e um arquivo contendo a sequência mascarada (*RM2sequpload_1340304595.masked*) serão fornecidos.



Summary:

```
file name: RM2sequpload_1182899875
sequences:                1
total length:        2251 bp  (2251 bp excl N/X-runs)
GC level:           58.29 %
bases masked:        144 bp ( 6.40 %)
```

	number of elements*	length occupied	percentage of sequence
SINEs:	1	91 bp	4.04 %
ALUs	0	0 bp	0.00 %
MIRs	1	91 bp	4.04 %
LINEs:	0	0 bp	0.00 %
LINE1	0	0 bp	0.00 %
LINE2	0	0 bp	0.00 %
L3/CR1	0	0 bp	0.00 %
LTR elements:	0	0 bp	0.00 %
MaLRs	0	0 bp	0.00 %
ERVL	0	0 bp	0.00 %
ERV_classI	0	0 bp	0.00 %
ERV_classII	0	0 bp	0.00 %
DNA elements:	0	0 bp	0.00 %
MER1_type	0	0 bp	0.00 %
MER2_type	0	0 bp	0.00 %
Unclassified:	0	0 bp	0.00 %
Total interspersed repeats:		91 bp	4.04 %
Small RNA:	0	0 bp	0.00 %
Satellites:	0	0 bp	0.00 %
Simple repeats:	1	53 bp	2.35 %
Low complexity:	0	0 bp	0.00 %

* most repeats fragmented by insertions or deletions have been counted as one element

The query species was assumed to be homo
RepeatMasker version open-3.1.8 , default mode

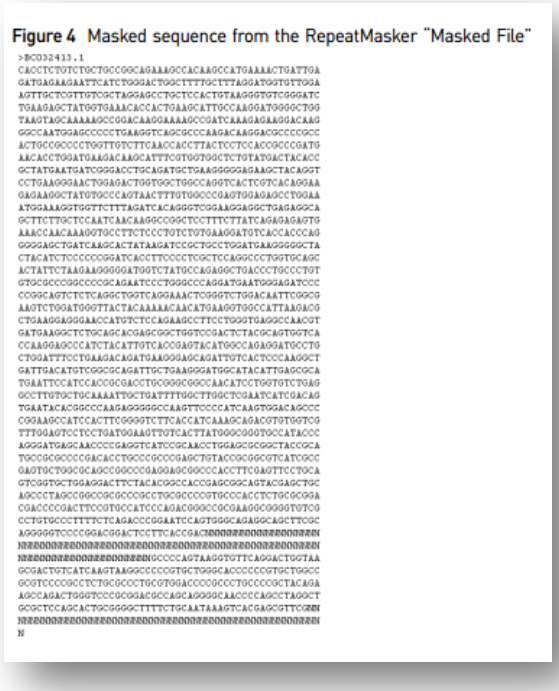


Figure 4 Masked sequence from the RepeatMasker "Masked File"

```
>BC032413.1
CACCTCTGTCTGCTGCCGGCAGAAAGCCACAAGCCATGAAAACTGATTGA
GATGAGAAGAATTCATCTGGGACTGGCTTTTGCTTTAGGATGGTGTTGGA
AGTTGCTCGTTGTCGCTAGGAGCCTGCTCCACTGTAAGGGTGTCGGGATC
TGAAGAGCTATGGTGAAACACCACTGAAGCATTGCCAAGGATGGGGCTGG
TAAGTAGCAAAAAGCCGGACAAGGAAAAGCCGATCAAGAGAAGGGACAAG
GGCCAATGGAGCCCCCTGAAGGTCAGCGCCCAAGACAAGGACGCCCCGCC
ACTGCCGCCCCTGGTTGTCTTCAACCACCTTACTCCTCCACCGCCCGATG
AACACCTGGATGAAGACAAGCATTTCGTGGTGGCTCTGTATGACTACACC
GCTATGAATGATCGGGACCTGCAGATGCTGAAGGGGGAGAAGCTACAGGT
CCTGAAGGGAACTGGAGACTGGTGGCTGGCCAGGTCACTCGTCACAGGAA
GAGAAGGCTATGTGCCCAGTAACTTTGTGGCCCGAGTGGAGAGCCTGGAA
ATGGAAAGGTGGTTCTTTAGATCACAGGGTCGGAAGGAGGCTGAGAGGCA
GCTTCTTGCTCCAATCAACAAGGCCGGCTCCTTTCTTATCAGAGAGAGTG
AAACCAACAAAGGTGCCTTCTCCCTGTCTGTGAAGGATGTCACCACCCAG
GGGGAGCTGATCAAGCACTATAAGATCCGCTGCCTGGATGAAGGGGGCTA
CTACATCTCCCCCCGGATCACCTTCCCCTCGCTCCAGGCCCTGGTGCAGC
ACTATTCTAAGAAGGGGGATGGTCTATGCCAGAGGCTGACCCTGCCCTGT
GTGCGCCCGGCCCCGCAGAATCCCTGGGCCCAGGATGAATGGGAGATCCC
CCGGCAGTCTCTCAGGCTGGTCAGGAAACTCGGGTCTGGACAATTCGGCG
AAGTCTGGATGGGTTACTACAAAAACAACATGAAGGTGGCCATTAAGACG
CTGAAGGAGGGAACCATGTCTCCAGAAGCCTTCCTGGGTGAGGCCAACGT
GATGAAGGCTCTGCAGCACGAGCGGCTGGTCCGACTCTACGCAGTGGTCA
CCAAGGAGCCCATCTACATTGTCACCGAGTACATGGCCAAGGGATGCCTG
CTGGATTTCCTGAAGACAGATGAAGGGAGCAGATTGTCACTCCCAAGCCT
GATTGACATGTCGGCGCAGATTGCTGAAGGGATGGCATACATTGAGCGCA
TGAATTCCATCCACCGCGACCTGCGGGCGGCCAACATCCTGGTGTCTGAG
GCCTTGTGCTGCAAAATTGCTGATTTTGGCTTGGCTCGAATCATCGACAG
TGAATACACGGCCCAAGAGGGGGCCAAGTTCCCCATCAAGTGGACAGCCC
CGGAAGCCATCCACTTCGGGGTCTTCACCATCAAAGCAGACGTGTGGTCG
TTTGGAGTCCTCCTGATGGAAGTTGTCACTTATGGGCGGGTGCCATACCC
AGGGATGAGCAACCCCGAGGTCATCCGCAACCTGGAGCGCGGCTACCGCA
TGCCGCGCCCCGACACCTGCCCGCCCGAGCTGTACCGCGGCGTCATCGCC
GAGTGCTGGCGCAGCCGGCCCGAGGAGCGGCCACCTTCGAGTTCCTGCA
GTCGGTGCTGGAGGACTTCTACACGGCCACCGAGCGGCAGTACGAGCTGC
AGCCCTAGCCGGCCGCCGCCGCTGCGCCCCGTGCCCACCTCTGCGCGGA
CGACCCCGACTTCCGTGCCATCCAGACGGGCCGCGAAGGCGGGGTGTCG
CCTGTGCCCTTTTCTCAGACCCGGAATCCAGTGGGCAGAGGCAGCTTCGC
AGGGGGTCCCCGGACGGACTCCTTCACCGACNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGCCCCAGTAAGGTGTTCAGGACTGGTAA
GCGACTGTCATCAAGTAAGGCCCCGTGCTGGGCACCCCCGTGCTGGCC
GCGTCCCGCTCTGCGCCCTGCGTGGACCCGCCCTGCCCCGCTACAGA
AGCCAGACTGGGTCCCGCGGACGCCAGCAGGGGCAACCCCAGCCTAGGCT
GCGCTCCAGCACTGCGGGGCTTTTCTGCAATAAAGTCACGAGCGTTCGNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
N
```

Elaborado por: FMU	Revisado por: JCR	Ass.:	**Data 23.01.2014**

Centro de Treinamento Life Technologies	TUTORIAL	Submissão de Sequências (Customização de TaqMan Assays)

SEMPRE analisar as sequências antes de submeter (File Builder ou Primer Express).

Sempre inserir nos programas acima:

1 – Sequências na orientação 5'-----3';
2 – Previamente avaliadas quanto a relevância biológica e especificidade;
3 – Previamente analisadas com relação a presença de elementos repetitivos (RepeatMasker);
4 – Utilizar somente a sequência no formato **FASTA** nos softwares File Builder e Primer Express;
5 – NÃO retire os N das sequências (tanto no File Builder quanto no Primer Express submeta as sequências com N).
5 – Para SNPs sempre inserir 100 bases 5' e 100 bases 3' do polimorfismo

E.x.:

File Builder:

>gnl|dbSNP|rs81505258|allelePos=101|totalLen=201|taxid=9823|snpclass=1|alleles='C/T'|mol=Genomic|build=131
CCATTTATATCAGCGTTCTTTTTATGAAAAAGCATCTGACTAGAAATTCAATAGAGAAGCATGTCATAATCAGTTTGAGGCCAAATCTTTAAATATAACA**[C/T]**GCTAATTTTAGTCCTAAGCATTTCAGCTGTACTTTATTGGTTTACAGCTTCATAGGAAGATGTGGCTTCTTAAGGAGGAAAAATCTTTTTTATATGGCTT

Primer Express:

>gnl|dbSNP|rs81505258|allelePos=101|totalLen=201|taxid=9823|snpclass=1|alleles='C/T'|mol=Genomic|build=131
CCATTTATATCAGCGTTCTTTTTATGAAAAAGCATCTGACTAGAAATTCAATAGAGAAGCATGTCATAATCAGTTTGAGGCCAAATCTTTAAATATAACA**Y**GCTAATTTTAGTCCTAAGCATTTCAGCTGTACTTTATTGGTTTACAGCTTCATAGGAAGATGTGGCTTCTTAAGGAGGAAAAATCTTTTTTATATGGCTT

Centro de Treinamento Life Technologies	TUTORIAL	Submissão de Sequências (Customização de TaqMan Assays)

Abaixo em destaque está um SNP, que NÃO é possível desenhar assays TaqMan para avaliação desse SNP.

Não mascarada

> AY853303

GCCCTCTTAATAAGGCTTATGTGCTTCTGCACAGTTC**A**CCTGACTGTGAAATGGGTATGATTGCCCCTTTTGTAC
AGATGGAGAAACTGAGGCTCAGAAATCGCTAAGGGATTGCCCACAGGTCCACAGTTCCCCAGGCTTCCCAATC
CACTCTCCACTCCCAGGTGTGGAGTGGAGTGGAGAGTCTTGCGCCAGGTCCTCA

Mascarada

>AY853303

GCCCTCTTAATAAGGCTTATGTGCTTCTGCACAGTTC**A**CCTGANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCC
CAGGCTTCCCAATCCACTCTCCACTCCCAGGTGTGGAGTGGAGTGGAGAGTCTTGCGCCAGGTCCTCA

Custom TaqMan Assays

Existem duas possibilidades para o desenho de ensaios costumizados:

1. File Builder v3.1 (Gratuito):

http://www6.appliedbiosystems.com/support/software/assaysbydesign/installs.cfm

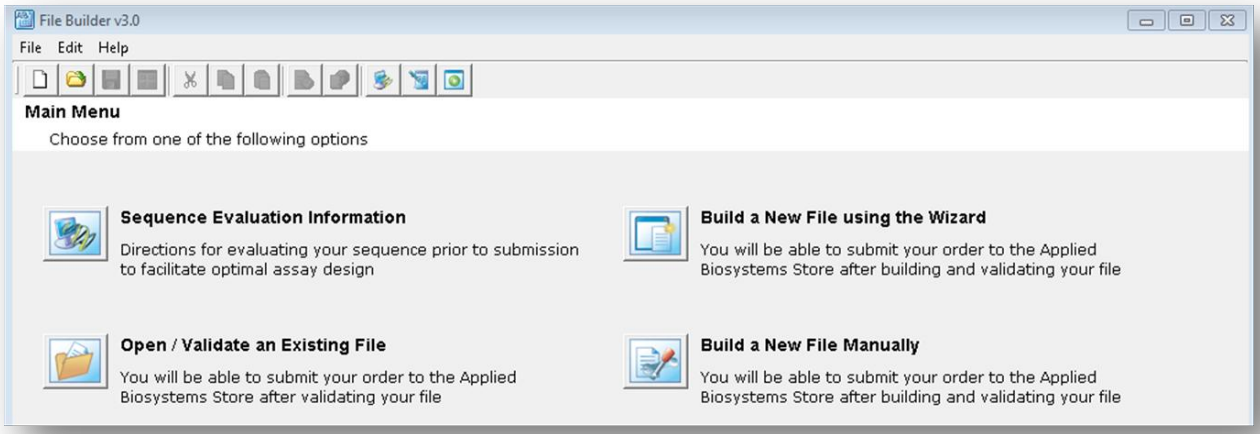
a) Usuário envia arquivo e a Life desenha e envia o ensaio em tubo único (a Life não faz as análises de sequências mencionadas anteriormente).

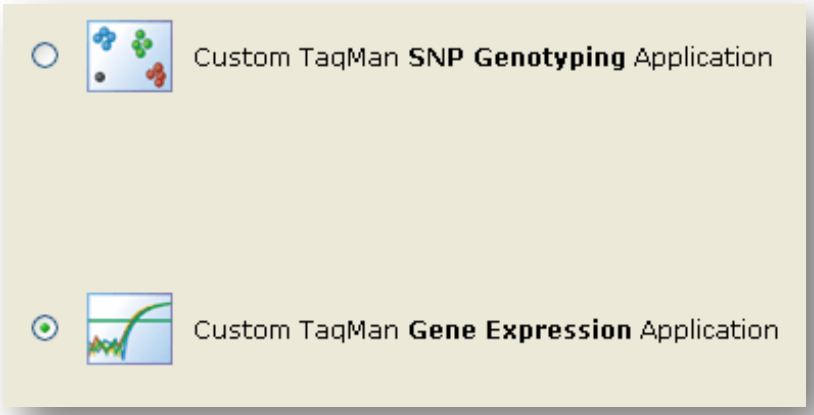
b) A Life somente realiza desenho de ensaios TaqMan. Não existe a possibilidade de desenho somente das sequências de primers (Ex. Primers para agentes intercalantes).

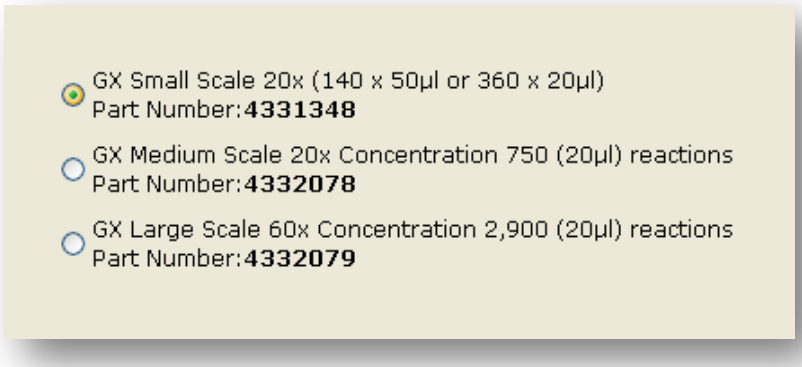
c) Software para gerar e validar arquivo de desenho de primers e sondas

Elaborado por: FMU	Revisado por: JCR	Ass.:	**Data 23.01.2014**

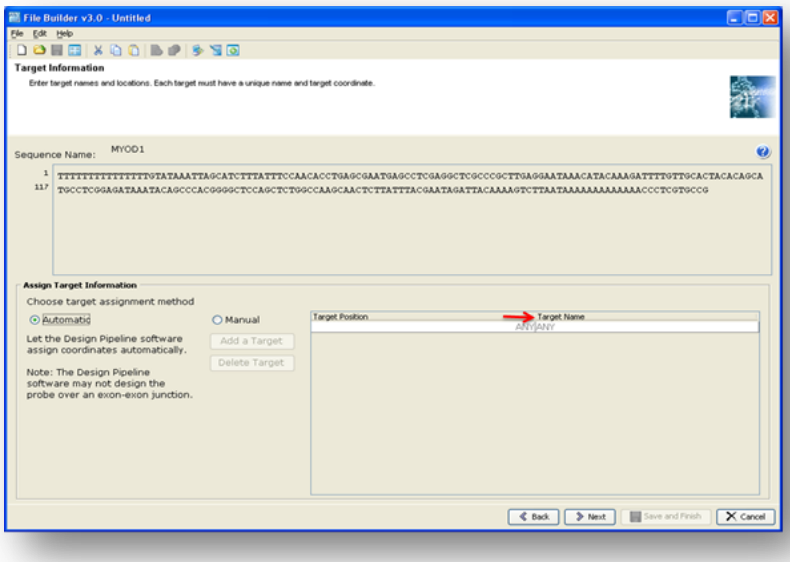
Centro de Treinamento Life Technologies	**TUTORIAL**	**Submissão de Sequências (Customização de TaqMan Assays)**

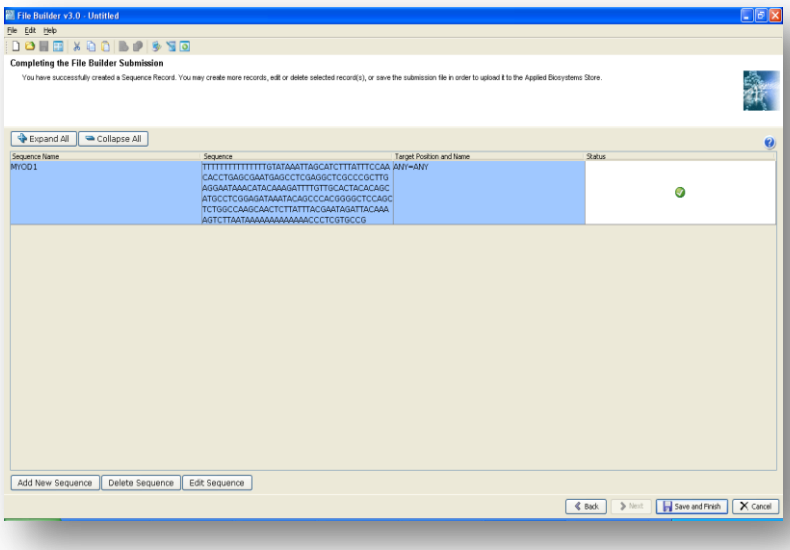






Centro de Treinamento Life Technologies	**TUTORIAL**	**Submissão de Sequências (Customização de TaqMan Assays)**



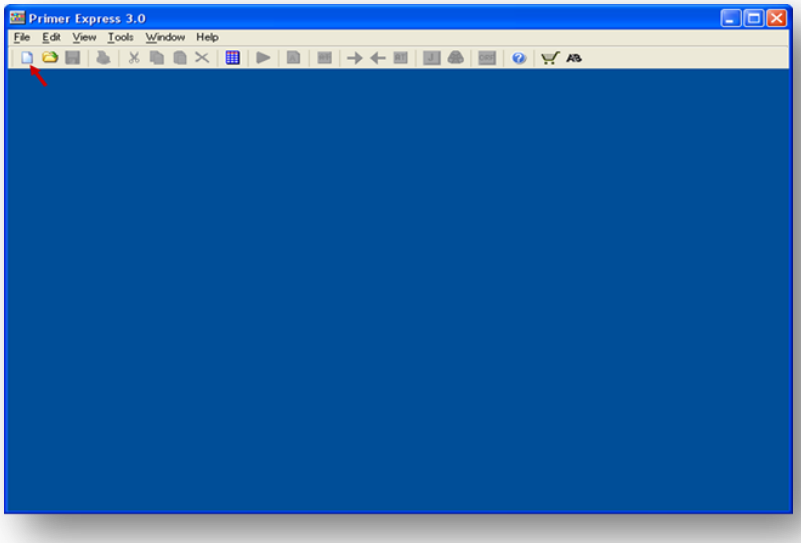


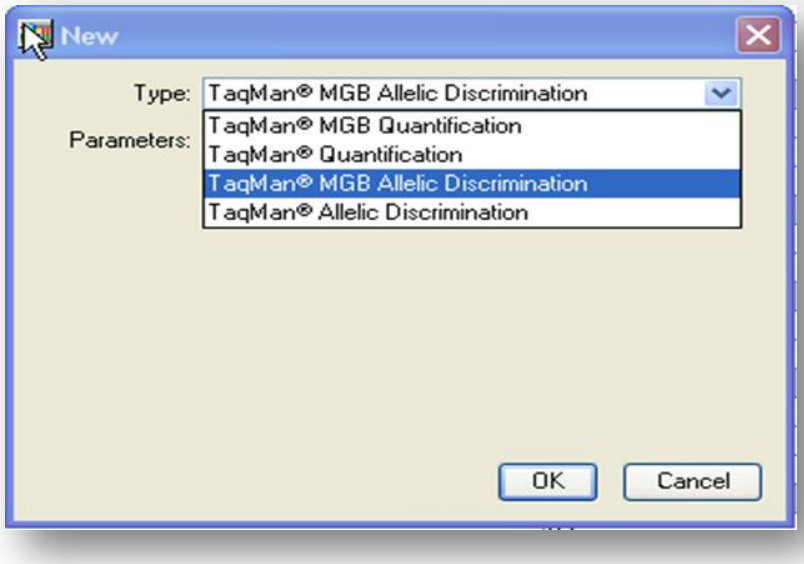
Nota (1): Acima está um exemplo de submissão para desenho de –ensaios de expressão gênica. Caso seja para genotipagem de SNPs o usuário deverá mostrar a localização do SNP da seguinte forma [base1/base2] – por exemplo: [A/G] – sinaliza que trata-se de uma troca de A para G.
Nota (2): O *Target Name* (em destaque acima) poderá conter no máximo 4 caracteres.
Nota (3): Os arquivos serão salvos em .txt. Enviar esse arquivo anexado para o Customer Care Brasil: orcamento.br@lifetech.com

Elaborado por: FMU	Revisado por: JCR	Ass.:	**Data 23.01.2014**

2. Primer Express (Software de licença única que acompanha todos os intrumentos de qPCR da Life Technologies, também existe a possibilidade para compra separadamente).

Abra o programa Primer Express, selecione a aplicação (quantificação ou discriminação alélica) e em seguida copie e cole a sequência previamente analisada.





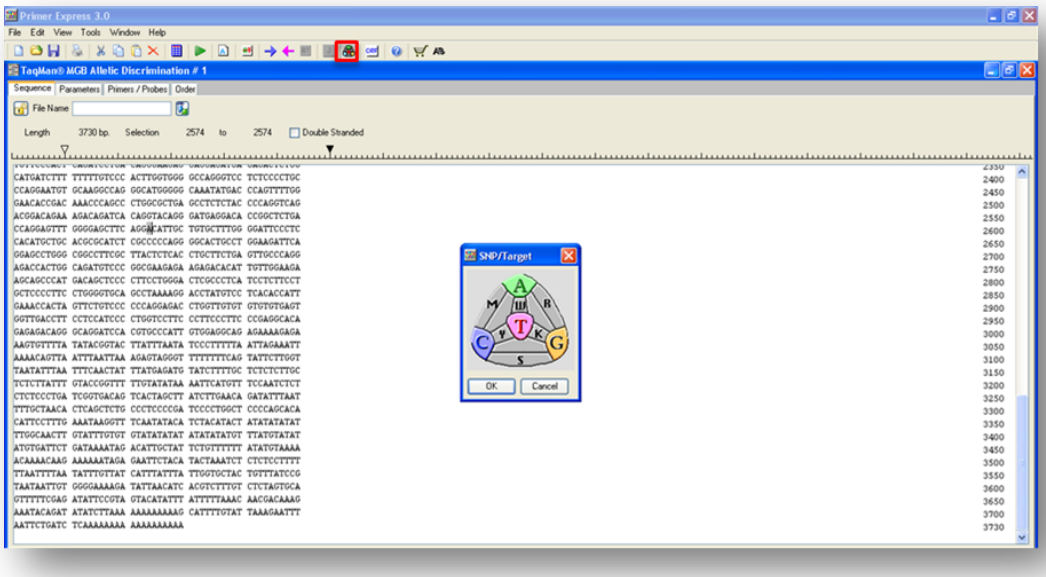
Centro de Treinamento Life Technologies	**TUTORIAL**	**Submissão de Sequências (Customização de TaqMan Assays)**

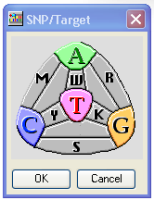
As sondas e os primers desenhados pelo software são utilizados para as seguintes aplicações:

- Quantificação Absoluta/Relativa; Presença/Ausência; e outras aplicações

- **<u>Discriminação Alélica</u>**

No caso de discriminação alélica, selecione o SNP de interesse e vá ao ícone SNP target (em destaque) para que assim possa ser incluido a especificação dos alelos de interesse.



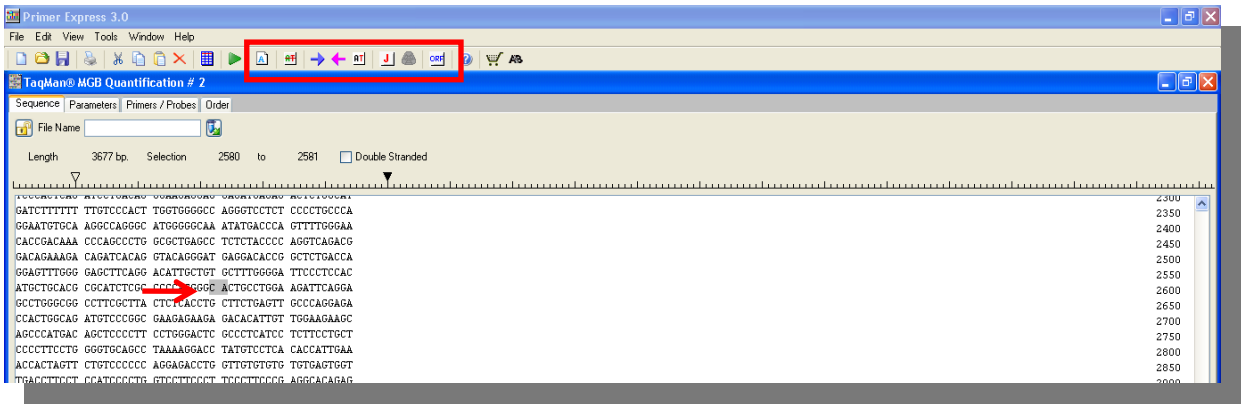


<u>Ícone ativado apenas para discriminação alélica.</u>

Elaborado por: FMU	Revisado por: JCR	Ass.:	**Data 23.01.2014**

Centro de Treinamento Life Technologies	**TUTORIAL**	**Submissão de Sequências (Customização de TaqMan Assays)**

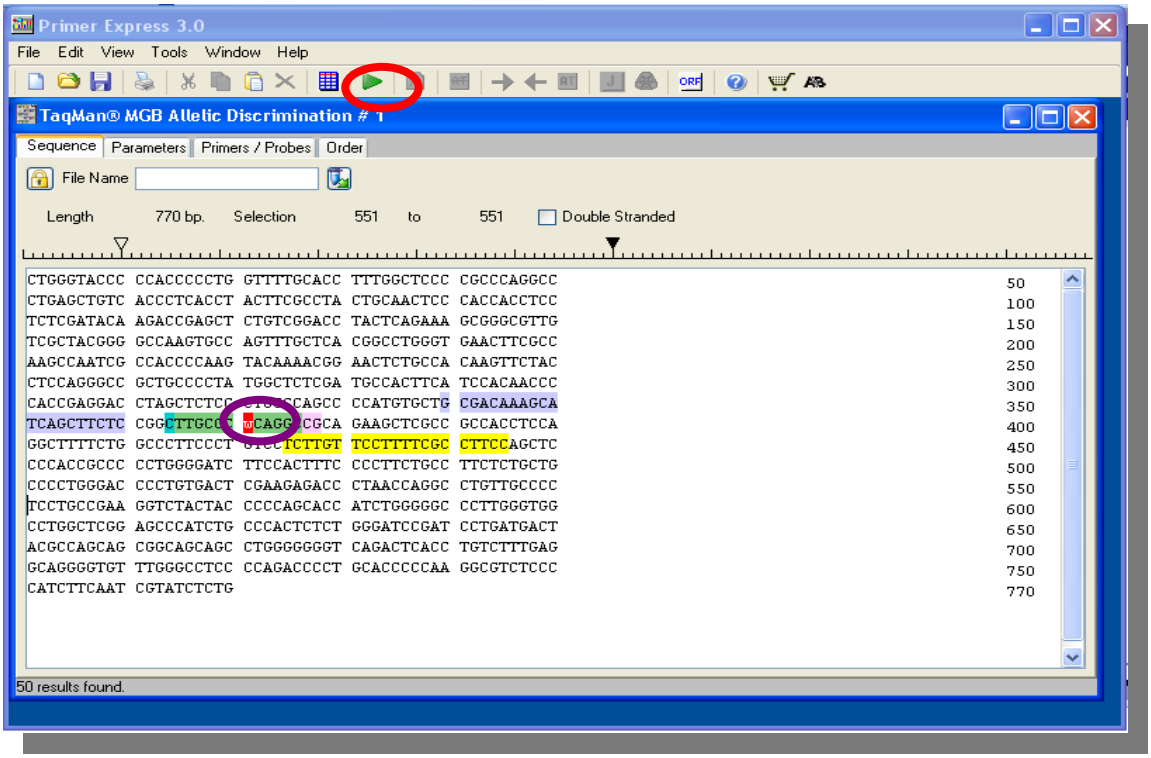
Os ícones para anotações (edições) no Primer Express (abaixo) só são ativados quando destacamos a região a ser editada.



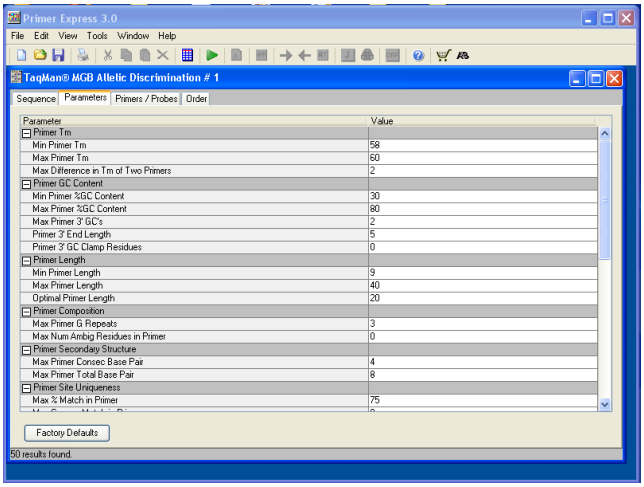
Annotation	Toolbar Button	Description	Example (shows the default annotation colors)
Clear		Removes the annotation from the selected region. **Note:** You can select **Edit > Annotate > Clear All** to remove all annotations in the sequence.	CGCAGCAGGT
Exclude		Excludes the selected region from the primer/probe search. **Note:** You can select **Edit >** Find and Exclude to search for a specific sequence, then exclude it. **Note:** Bases that are excluded (using the Exclude annotation) are not considered in primer and probe design. Masked bases (bases substituted with Ns) are considered.	~~CGCAGCAGGT~~
Fwd Primer		Specifies the selected region as a forward primer. When the software finds primers and probes, it looks only for reverse primers and probes that are compatible with the annotated forward primer. When selecting primer sequences, select sequences close enough to the probe sequence to ensure that amplicon length is within 50 to 150 bases.	CGCAGCAGGT
Rev Primer		Specifies the selected region as a reverse primer. When the software finds primers and probes, it looks only for forward primers and probes that are compatible with the annotated reverse primer. When selecting primer sequences, select sequences close enough to the probe sequence to ensure that amplicon length is within 50 to 150 bases.	CGCAGCAGGT
Probe Quantification documents only		Specifies the selected region as a probe. When the software finds primers and probes, it looks only for forward and reverse primers that are compatible with the annotated probe region.	CGCAGCAGGT
Junction Quantification documents only		Creates a junction annotation across two adjacent bases to mark a junction. When the software finds primers and probes, it attempts to find at least one primer or probe in each primer/probe set that crosses at least one junction. **Note:** The junction annotation supports only primer and probe design. It does not locate exon-exon junctions. Before applying a junction annotation, reference online bioinformatics databases or existing publications to locate junctions in a sequence. The Junction annotation can be used for a variety of applications, including: ▪ Exon-exon junction detection, to generate primers that amplify only mRNA (or cDNA made from it), but not genomic DNA. ▪ SiRNA and miRNA detection ▪ Transgenic DNA detection You can add any number of junction annotations to the sequence.	TGACTTCTGG AATGGGTAGT
SNP Target Allelic Discrimination documents only		Assigns the selected base as the SNP (single nucleotide polymorphism) target site. When you select this annotation, the SNP Target dialog box is displayed. Click the IUPAC code that represents the possible variations at the SNP target site, then click **OK**. SNP site location in MGB probes SNP site location in conventional probes	TCGACAAGG

Elaborado por: FMU	Revisado por: JCR	Ass.:	**Data 23.01.2014**

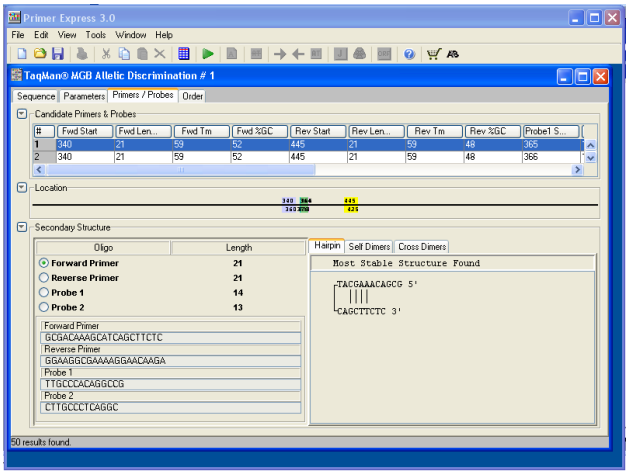
Centro de Treinamento Life Technologies	**TUTORIAL**	**Submissão de Sequências (Customização de TaqMan Assays)**



Parâmetros de análise (recomendado deixar *defaut*):



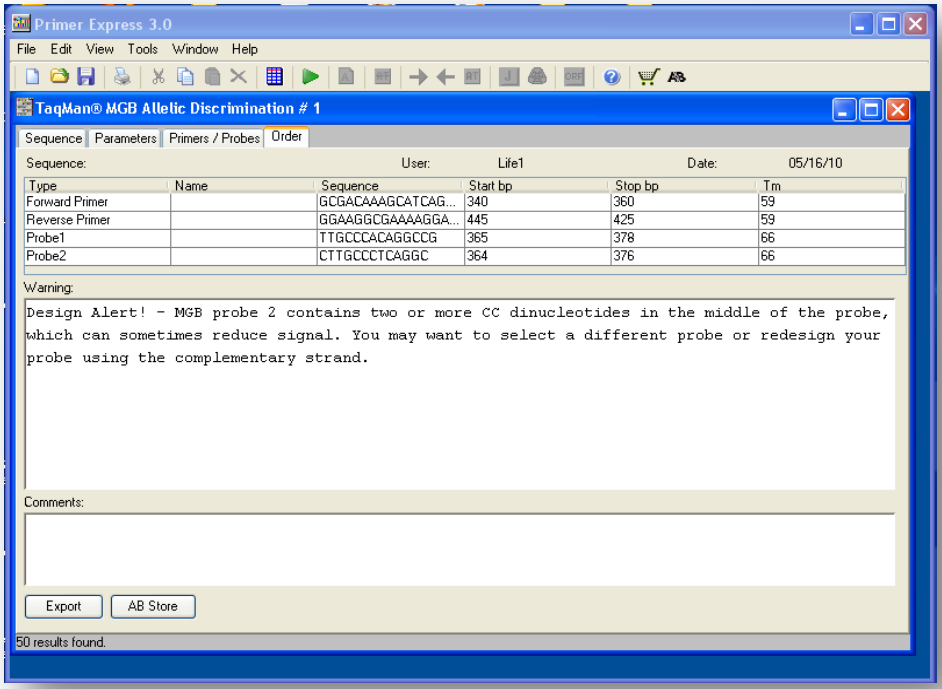
Tela de oligos e estruturas secundárias:



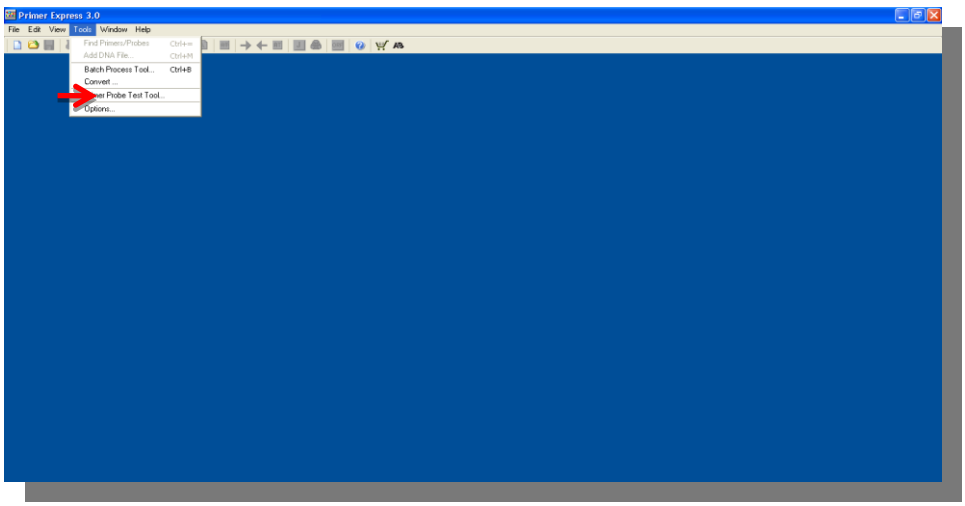
Tela de pedido (“Order”), nesse momento o usuário irá salvar (.txt) o conjunto de oligos escolhidos. Enviar esse arquivo anexado para o Customer Care Brasil: orcamento.br@lifetech.com

Elaborado por: FMU	Revisado por: JCR	Ass.:	**Data 23.01.2014**

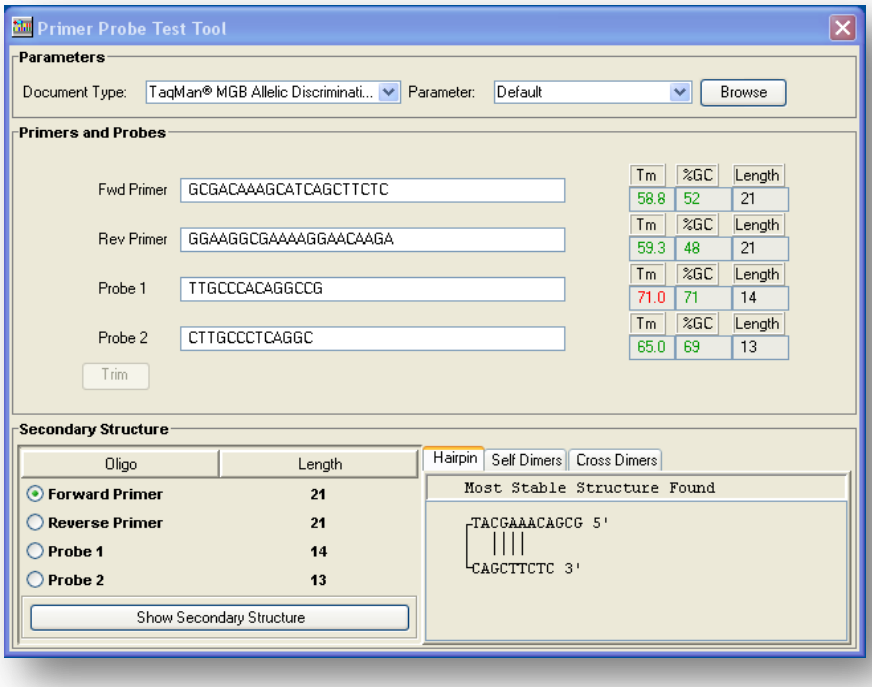
Centro de Treinamento Life Technologies	**TUTORIAL**	**Submissão de Sequências (Customização de TaqMan Assays)**



Tela para avaliação de oligos previamente desenhados. Vá em *Tools* --- *Primer Probe Test Tool* :



Centro de Treinamento Life Technologies	**TUTORIAL**	**Submissão de Sequências (Customização de TaqMan Assays)**



Nota (1): Acima está um exemplo de desenho de oligos para genotipagem (por isso há o desenho de duas probes). Para ensaios de expressão gênica, quantificação, dentre outros, o usuário pode optar pelo uso de sondas ou não (SYBR e MeltDoctor/HRM, por exemplo). Dessa forma, com o software Primer Express é possível tanto escolher para a síntese: primers + sondas TaqMan ou somente primers.
Nota (2): A Life recomenda a utilização de sondas com quencher MGB (para qualquer aplicação).
Nota (3): Os arquivos poderão ser salvos em .txt. Enviar esse arquivo anexado, contendo os primers e sonda(s) TaqMan, ou selecione apenas as sequências dos primers sempre na aba "Order" (no caso de SYBR e HRM) e envie para o Customer Care Brasil: orcamento.br@lifetech.com

Nota Final: Este tutorial tem por objetivo apresentar os requerimentos básicos para submissão de sequências para a Life Technologies realizar o desenho ou para desenho de oligos *in house*. Vale ressaltar que as análises de bioinformática constituem poderosas ferramentas para obtenção de bons oligos, porém não uma garantia de desenho perfeito!