

## Desain Primer dan Optimasi Suhu *Annealing* untuk Amplifikasi Gen *RET*

Nurul Aulia<sup>1</sup>, Yuni Ahda<sup>1\*</sup>, Afifatul Achyar<sup>1</sup>, Dwi Hilda Putri<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Program Studi Biologi, Universitas Negeri Padang, Jl. Prof Dr. Hamka Air Tawar Barat, Kecamatan Padang Utara, Kota Padang.

\*E-mail: [ahdayuni@fmipa.unp.ac.id](mailto:ahdayuni@fmipa.unp.ac.id)

**Abstrak:** Gen *RET* merupakan gen yang terletak pada kromosom 10q11.2 dan mengkode reseptor tirosin kinase. Mutasi gen *RET* pada manusia telah dikaitkan dengan penyakit Hirschsprung dan anomali kongenital ginjal atau saluran kemih. *RET* merupakan salah satu gen yang menyebabkan penyakit Hirschsprung, setidaknya 20% dari semua kasus penyakit Hirschsprung disebabkan oleh mutasi gen *RET*. Mutasi dapat berupa mutasi *nonsense*, mutasi *missense*, delesi dan insersi. Mutasi pada suatu gen dapat dilacak dengan teknik *sequencing*. Primer merupakan salah satu komponen yang penting untuk dilakukannya *sequencing* dan suhu *annealing* yang optimum merupakan kunci keberhasilan dari penempelan primer terhadap gen target. Penelitian ini bertujuan untuk mendesain primer dan menentukan suhu *annealing* yang optimal untuk mengamplifikasi gen *RET*. Primer didesain menggunakan *Geneious Prime*, yang kemudian dianalisis secara *in silico* berdasarkan kriteria primer yang baik. Optimasi suhu *annealing* yang dilakukan menggunakan *gradient PCR*. Hasil dari penelitian ini diperoleh primer yang dibuat menggunakan *Geneious Prime* menghasilkan primer terbaik yaitu primer forward 5'-AACACAGCGAGACTCCATCA-3' dan reverse 5'-TGGCTACACGGACTAAACC-3' yang spesifik mengamplifikasi Gen *RET*. Suhu *annealing* yang optimum untuk kedua primer yaitu 53.2°C.

### Kata Kunci: Gen *RET*, Desain Primer, Optimasi Suhu

**Abstract:** The *RET* gene, which codes for a tyrosine kinase receptor, is found on chromosome 10q11.2. Hirschsprung disease and congenital kidney or urinary tract malformations have both been linked to *RET* gene mutations in humans. At least 20% of all instances of Hirschsprung's disease are brought on by mutations in the *RET* gene, one of the genes that causes Hirschsprung's disease. Mutations can take the form of nonsense, missense, deletion, or insertion mutations. Sequencing methods can be used to monitor gene mutations. One of the crucial elements of sequencing is the primer, and the effectiveness of primer attachment to the target gene depends on using the right annealing temperature. The objective of this work is to amplify the *RET* gene by designing primers and figuring out the ideal annealing temperature. Geneious Prime was used to create the primers, which were then subjected to an *in silico* analysis based on sound main criteria. Using gradient PCR, the annealing temperature was optimized. The findings of this investigation demonstrated that the optimal primers, forward primers 5'-AACACAGCGAGACTCCATCA-3' and reverse primers 5'-TGGCTACACGGACTAAACC-3', which selectively amplify the *RET* gene, were

created using Geneious Prime. 53.2°C is the ideal annealing temperature for both primers.

### **Keywords: RET Gene; Primer Design; Temperature Optimization**

Proto-onkogen *RET* terletak pada kromosom 10q11.2 dan mengkode reseptor tirosin kinase (Mulligan, 2014). *RET* diekspresikan dalam sel *neural crest* yang diperlukan untuk proliferasi, diferensiasi, dan kelangsungan hidup sel. *RET* juga terlibat dalam kelangsungan hidup dan konektivitas motoneuron. Selain itu, pensinyalan *RET* berkontribusi pada regulasi dan fungsi hematopoietik sel dan spermatogenesis. Mutasi gen *RET* pada manusia telah dikaitkan dengan penyakit Hirschsprung (HD) dan anomali kongenital ginjal atau saluran kemih (Subbiah *et al.*, 2020).

*RET* merupakan salah satu gen yang menyebabkan HD (Lorente-Ros *et al.*, 2020), karena telah diidentifikasi pada 50% kasus familial dan 15%-35% kasus sporadis HD. Secara total, setidaknya 20% dari semua kasus HD disebabkan oleh mutasi gen *RET* (Alves *et al.*, 2013; Tjaden and Trainor, 2013). Mutasi dapat berupa mutasi *nonsense*, mutasi *missense*, delesi dan insersi (Bradnock *et al.*, 2017).

Berdasarkan penelitian Chin *et al* (2008) pada populasi Taiwan menunjukkan mutasi *missense* heterozigot gen *RET* pada 2 dari 15 pasien HD. Mutasi yang ditemukan adalah mutasi titik pada ekson 2 dan ekson 3. Berdasarkan penelitian Ruiz-Ferrer *et al.* (2006) ditemukan mutasi pada exon/intron 4 berupa mutasi *missense*. Berdasarkan penelitian Nunez-Torres *et al* (2011) ditemukan mutasi pada exon/intron 2. Berdasarkan penelitian Jiang *et al* (2019) ditemukan mutasi *missense* pada exon 2 dan 4 dan ditemukan mutasi *frameshift* pada exon 4.

Mutasi dapat dilacak dengan teknik *sequencing* (Grada & Weinbrecht, 2013). Sekuensing DNA bertujuan untuk menentukan urutan wilayah kecil yang diminati (~1 kilobase) dan menggunakan produk PCR sebagai *template*. Terdapat beberapa komponen yang dibutuhkan untuk sekuensing DNA, salah satunya adalah primer (Putri, 2019). Perancangan primer yang baik adalah kunci keberhasilan dalam proses amplifikasi DNA (He *et al.*, 1994). Secara umum, primer yang ideal memiliki panjang antara 18 sampai 30 oligonukleotida (Borah, 2011). Primer yang baik merupakan primer yang memenuhi kriteria parameter primer. Persyaratan umum untuk primer adalah harus memiliki suhu leleh yang sama ( $T_m$ ) dan kandungan G/C yang seimbang, namun harus menghindari *self-complementarity* dan struktur *hairpin* (Ye *et al.*, 2012). Oleh karena itu dalam penelitian ini akan dilakukan desain primer secara *in silico* dan optimasi suhu *annealing* primer untuk mengamplifikasi gen *RET*.

### **METODE PENELITIAN**

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Genetika dan Bioteknologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang pada Bulan November 2022 - Maret 2023. Primer didesain menggunakan aplikasi *Geneious Prime*. Sekuen gen *RET* (*Accession*: NG\_007489) di-*download* pada situs NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) dalam format *GenBank*. Selanjutnya kandidat primer dipilih sesuai dengan kriteria parameter primer yang baik.

Kriteria parameter yang baik yaitu memiliki panjang nukleotida 18-24 bp, memiliki suhu ( $T_m$ ) 50-60°C (Badriyya & Achyar, 2021), perbedaan suhu ( $T_m$ ) antar primer tidak lebih dari 5°C, kandungan %GC antara 40-60% (Chen *et al.*, 2003), harus menghindari *self-complementarity* dan struktur *hairpin* (Ye *et al.*, 2012). Selanjutnya primer yang sesuai dengan kriteria primer yang baik di uji sensitivitas secara *in silico* menggunakan Primer-Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>) yang terdapat pada situs NCBI. Uji sensitivitas menggunakan Primer-Blast karena memiliki tingkat deteksi sensitivitas yang tinggi (Ye *et al.*, 2012).

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan sampel darah (manusia sehat yang tidak terkena penyakit HD) yang sebelumnya dikumpulkan dengan mengisi *inform consent* (Nomor: LB.0202/5.7/95/2023). Sebanyak 300 µl darah diisolasi menggunakan Wizard® Genomic DNA Purification Kit dari Promega sesuai instruksi yang tersedia. Sebanyak 35 µl DNA *Rehydration Solution* dimasukkan kedalam pellet dna untuk direhidrasi. Kemurnian dan konsentrasi sampel DNA diukur dengan alat NanoPhotometer. Kemurnian larutan DNA dapat dihitung melalui perbandingan A260 nm dengan A280 nm. DNA dinyatakan murni jika memiliki nilai rasio OD260/OD280 berkisar antara 1,8-2,0 (Siswanto *et al.*, 2016). Selanjutnya DNA disimpan pada suhu -20°C.

Optimasi suhu *annealing* menggunakan *gradient* PCR dengan komposisi reaksi terdiri dari GoTaq Green Master Mix 5 µl, primer RET 10 µM *forward* dan *reverse* 0,4 µl, *Nuclease-Free water* 2,9 µl, dan DNA *template* 1,3 µl. Kemudian program PCR diatur sebagai berikut: tahap denaturasi awal pada suhu 95°C selama 5 menit, tahap pengulangan siklus sebanyak 35 kali yang terdiri dari tahap denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, tahap *annealing* pada gradien suhu 51°C-61°C ( $T_m$  primer  $\pm$  5°C) selama 30 detik dan tahap suhu elongasi pada 72°C selama 1 menit, setelah itu tahap terakhir siklus elongasi akhir hanya sekali pada suhu 72°C selama 5 menit.

Produk PCR divisualisasi dengan melakukan elektroforesis gel agarose 1,5%. Elektroforesis dilakukan dengan *running buffer* TAE 1X selama 40 menit pada 100 volt. Lalu hasil elektroforesis dilihat menggunakan UVTEC.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan kandidat primer 3 (Tabel 1) dipilih karena sesuai dengan kriteria primer yang baik. Pada penelitian ini dilakukan desain primer secara *in silico* menggunakan program *Geneious Prime*. Desain primer dilakukan terhadap sekuens gen *RET* (*Accession*: NG\_007489).

Tabel 1. Kandidat primer gen *RET*

Sequence (5' → 3')	Karakteristik					
	%GC	$T_m$ (°C)	$T_m$ <i>hair pin</i>	$T_m$ <i>self-dimer</i>	Panjang Basa (nt)	Produk PCR (bp)
Kandidat primer 1	57.9	59.1	None	1.2	19 bp	

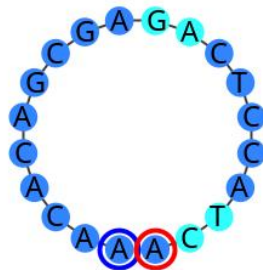
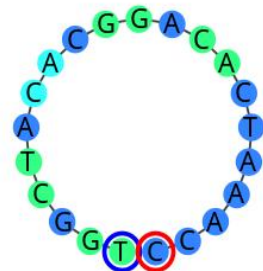
<i>Forward</i> TAGCTGGCTCTCTAGGGCT						708 bp
<i>Reverse</i> AAACGAACTGTGGCCGGA	55.6	59.5	None	5.11		18 bp
Kandidat primer 2 <i>Forward</i> CTTCCAACCAGCACGAGT	57.9	59.9	None	None		19 bp
<i>Reverse</i> AAACGAACTGTGGCCGGA	55.6	59.5	None	5.1		20 bp
Kandidat primer 3 <i>Forward</i> AACACAGCGAGACTCCATCA	50.0	59.0	None	None		20 bp
<i>Reverse</i> TGGCTACACGGACACTAAACC	52.4	60.0	None	None		21 bp

Parameter yang dianalisis oleh *Geneious Prime* meliputi panjang basa, produk PCR, *melting temperature* ( $T_m$ ), %GC, *hairpin*, *self-dimer* dan *pair dimer*. Panjang basa 18-30 bp merupakan panjang primer yang ideal (Achyar *et al.*, 2021), kandidat primer 3 memiliki panjang basa yang ideal yaitu berkisar 20-21 bp.

Kandungan %GC tiap primer harus berada pada kisaran 40-60% (Syamsurizal *et al.*, 2020). Suhu *annealing* PCR akan dipengaruhi oleh kandungan %GC (Guanin (G) dan sitosin (C)) yang memiliki tiga ikatan hidrogen karena itu membutuhkan banyak energi dan panas untuk memutuskannya (Putri & Wahyuni, 2019). Sebaiknya hindari penggunaan primer dengan tiga atau lebih basis G atau C dalam dimer 3' karena dapat menstabilkan primer *annealing* dengan cara yang tidak diinginkan (Pradnyaniti *et al.*, 2013). Kandidat primer 3 memiliki %GC yang sesuai yaitu berkisar 50.0-55.0%.

*Melting temperature* ( $T_m$ ) kandidat primer 3 memiliki  $T_m$  *forward* 59.0°C dan *reverse* 60.0°C dengan selisih 1°C.  $T_m$  dari pasangan primer dengan jarak 1°C masih dapat diterima (Thornton & Basu, 2011). Biasanya, suhu leleh  $T_m$  pasangan primer adalah antara 50°C dan 62°C. PCR dapat berhasil dilakukan jika perbedaan suhu leleh pasangan primer tidak melebihi 5°C. Perbedaan suhu leleh ideal pasangan primer adalah nol karena primer ditempatkan dalam tabung yang sama saat melakukan percobaan PCR (Chuang *et al.*, 2013).

Tabel 2. Karakteristik Hasil Desain Primer

Karakteristik Primer	DNA Fold	Amplikon
Kandidat primer 3 RET_EX4F Sequence (5'-3') AACACAGCGAGACTCCATCA Type:Primer Bind Length: 20 bp Tm: 59.0 %GC: 50.0 Hairpin Tm: None Self Dimer Tm: None		784 bp
RET_EX4R Sequence (5'-3') TGGCTACACGGACACTAAAC C Type: Length: 21 bp Tm: 60.0 %GC: 52.4 Hairpin Tm: None Self Dimer Tm: None		

Dalam mendesain primer harus menghindari *hairpin*, *self-dimer* dan *pair dimer*. *Hairpin* merupakan struktur sekunder yang sebaiknya dihindari dalam mendesain primer (Pratiwi, 2015). *Hairpin* adalah primer yang menempel pada dirinya sendiri sehingga membentuk struktur sekunder (Chuang *et al.*, 2013) sedangkan *Self-dimer* terjadi apabila terbentuk ikatan pada dua primer yang sejenis (primer *forward* dengan primer *forward* atau primer *reverse* dengan primer *reverse*) (Yang *et al.*, 2009). Kandidat primer 3 (Tabel 2) tidak memiliki (*none*) *hairpin*, *self-dimer* dan *pair dimer*. Hal ini juga dibuktikan dengan gambaran *DNA Fold* yang menunjukkan tidak adanya ikatan antara basa nukleotida (Achyar *et al.*, 2021).

```

Products on target templates
>NC_000010.11 Homo sapiens chromosome 10, GRCh38.p14 Primary Assembly

product length = 784
Features associated with this product:
  proto-oncogene tyrosine-protein kinase receptor ret isofo...
  proto-oncogene tyrosine-protein kinase receptor ret isofo...

Forward primer 1 AACACAGCGAGACTCCATCA 20
Template 43104496 ..... 43104515

Reverse primer 1 TGGCTACACGGACACTAAACC 21
Template 43105279 ..... 43105259
    
```

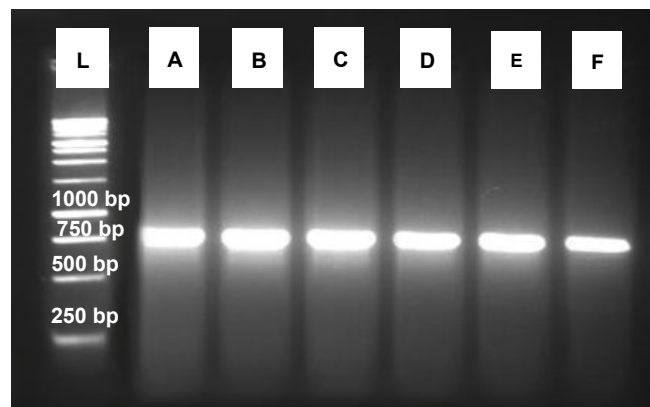
Gambar 1. Hasil Primer-BLAST Primer

Spesifisitas primer diuji berdasarkan database *Refseq representative genomes* menggunakan Primer-BLAST. Kandidat primer 3 menunjukkan bahwasannya primer secara spesifik menempel pada daerah *chromosome 10* (Gambar 1) yang merupakan lokasi gen *RET* (10q11). Panjang produk PCR (784 bp) sesuai dengan panjang produk yang didesain menggunakan aplikasi *Geneious Prime*.

#### Optimasi suhu *annealing* primer secara *in vitro* dengan *gradient PCR*

Berdasarkan hasil (Gambar 2) diperoleh suhu optimum adalah 53.2°C pada primer. Ini didasarkan pada pita tunggal dan paling tebal dengan ukuran amplicon (Ahda et al., 2021) yang sesuai yaitu 784 bp, artinya primer yang digunakan bersifat spesifik karena primer ini hanya mengamplifikasi sekuen target dan tidak menghasilkan *unspecific band* (Rusyanthini et al., 2015).

Suhu *annealing* merupakan parameter penting untuk keberhasilan amplifikasi karena mempengaruhi spesifisitas (urutan *template*) dan kestabilan ikatan hidrogen DNA-DNA (Fraige et al., 2013). Suhu *annealing* untuk setiap pasangan primer ditentukan menurut suhu leleh ( $T_m$ ) yang ditentukan oleh pemasok (hasil sintesis primer). Hasil sintesis untuk  $T_m$  primer *forward* 56.1°C dan *reverse* 56.9°C. Variasi suhu *gradient PCR* berada pada kisaran suhu 51°C-61°C karena mengikuti rentang suhu ( $T_m$ ) hasil sintesis primer.



Gambar 2. Hasil Elektroforesis Gradient PCR. Ladder 1 kb (L), suhu *annealing* 51.0°C (A), 53.2°C (B), 55.6°C (C), 57.7°C (D), 59.7°C (E), 61.0°C (F).

Hasil visualisasi elektroforesis (Gambar 2) menunjukkan bahwasannya primer mengamplifikasi DNA dengan baik. Pada hasil visualisasi tidak menunjukkan adanya pita DNA yang berada dibawah 250 bp..Jika terdapat pita DNA dibawah 250 bp, maka pita tersebut merupakan dimer. Dimer tersebut menandakan kurangnya konsentrasi DNA cetakan pada reaksi PCR (Ahda et al., 2012).

#### KESIMPULAN

Hasil dari penelitian ini diperoleh primer yang dibuat menggunakan *Geneious Prime* menghasilkan primer terbaik yaitu primer forward 5'-AACACAGCGAGACTCCATCA-3' dan reverse 5'-TGGCTACACGGACTAAACC-3' yang spesifik mengamplifikasi Gen *RET*. Suhu *annealing* yang optimum untuk kedua primer yaitu 53.2°C.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Achyar, A., Putri, A. I., Putri, D. H., & Ahda, Y. (2021). Primer design, in silico PCR and optimum annealing temperature for *Escherichia coli* detection in refillable drinking water samples. *Tropical Genetics*, *1*(2), 52-60.
- Ahda, Y., Muharni, I. R., & Putri, D. H. (2012). Kualitas DNA hasil isolasi dari beberapa bagian batang rambut untuk bahan analisis DNA forensik. *EKSAKTA*, *1*.
- Ahda, Y., Pranata, A., & Achyar, A. (2021). The Characteristic of Luciferase cDNA of *Lamprigera* sp.(Lampyridae: Coleoptera). In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 1940, No. 1, p. 012074). IOP Publishing.
- Alves, M. M., Sribudiani, Y., Brouwer, R. W., Amiel, J., Antiñolo, G., Borrego, S., Ceccherini, I., Chakravarti, A., Fernández, R.M., Garcia-Barcelo, M.M. & Hofstra, R. M. (2013). Contribution of rare and common variants determine complex diseases-Hirschsprung disease as a model. *Developmental biology*, *382*(1), 320-329.
- Badriyya, E., & Achyar, A. (2021). Primer Design of SNP rs4506565 Transcription Factor 7 like 2 (TCF7L2) Gene to Detect Type-2 Diabetes Mellitus. In *2nd International Conference on Contemporary Science and Clinical Pharmacy 2021 (ICCSCP 2021)* (pp. 197-202). Atlantis Press.
- Borah, P. (2011). Primer designing for PCR. *Science Vision*, *11*(3), 134-136.
- Chen, S. H., Lin, C. Y., Cho, C. S., Lo, C. Z., & Hsiung, C. A. (2003). Primer Design Assistant (PDA): a web-based primer design tool. *Nucleic acids research*, *31*(13), 3751-3754.
- Chin, T. W., Chiu, C. Y., Tsai, H. L., Liu, C. S., Wei, C. F., & Jap, T. S. (2008). Analysis of the RET gene in subjects with sporadic Hirschsprung's disease. *Journal of the Chinese Medical Association*, *71*(8), 406-410.
- Chuang, L. Y., Cheng, Y. H., & Yang, C. H. (2013). Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnology letters*, *35*, 1541-1549.
- Fraige, K., Travensolo, R. F., & Carrilho, E. (2013). Analysis of seven STR human loci for paternity testing by microchip electrophoresis. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *56*, 213-221.
- Grada, A., & Weinbrecht, K. (2013). Next-generation sequencing: methodology and application. *The Journal of investigative dermatology*, *133*(8), e11.
- He, Q., Marjamäki, M., Soini, H., Mertsola, J., & Viljanen, M. K. (1994). Primers are decisive for sensitivity of PCR. *Biotechniques*, *17*(1), 82-84.
- Jiang, Q., Wang, Y., Li, Q., Zhang, Z., Xiao, P., Wang, H., Liu, N., Wu, J., Zhang, F., Chakravarti, A. & Li, L. (2019). Sequence characterization of RET in 117 Chinese Hirschsprung disease families identifies a large burden of de novo and parental mosaic mutations. *Orphanet journal of rare diseases*, *14*(1), 1-9.
- Lorente-Ros, M., Andrés, A. M., Sánchez-Galán, A., Amiñoso, C., García, S., Lapunzina, P., & Solera-García, J. (2020). New mutations associated with Hirschsprung disease. *Anales de Pediatría (English Edition)*, *93*(4), 222-227.
- Mulligan, L. M. (2014). RET revisited: expanding the oncogenic portfolio. *Nature Reviews Cancer*, *14*(3), 173-186.

- Núñez-Torres, R., Fernández, R. M., Acosta, M. J., Enguix-Riego, M. D. V., Marbá, M., Carlos de Agustín, J., Castaño, L., Antiñolo, G & Borrego, S. (2011). Comprehensive analysis of RET common and rare variants in a series of Spanish Hirschsprung patients confirms a synergistic effect of both kinds of events. *BMC medical genetics*, 12(1), 1-7.
- Pradnyaniti, D. G., Wirajana, I. N., & Yowani, S. C. (2013). Desain primer secara in silico untuk amplifikasi fragmen gen rpoB Mycobacterium tuberculosis dengan polymerase chain reaction (PCR). *Jurnal Farmasi Udayana*, 2(3), 279788.
- Pratiwi, A. (2015). Optimasi suhu desain primer gen blaZ resistensi pada bakteri Staphylococcus aureus secara in silico. *Jurnal Mahasiswa Farmasi Fakultas Kedokteran UNTAN*, 4(1).
- Putri, D. H., & Wahyuni, W. (2019). Primer Design For Identification Of Beta-Carotene Encoding Genes In Cassava. *Serambi Biologi*, 4.
- Putri, D. H. (2019). Analysis Internal Primer Of Genes 16s Rrna Endophytic Bacteria Producing Compound Antimicrobial For Sequencing. *Serambi Biologi*, 4.
- Ruiz-Ferrer, M., Fernández, R. M., Antiñolo, G., López-Alonso, M., Eng, C., & Borrego, S. (2006). A complex additive model of inheritance for Hirschsprung disease is supported by both RET mutations and predisposing RET haplotypes. *Genetics in Medicine*, 8(11), 704-710.
- Rusyanthini, E. P., Wirajana, I. N., & Yowani, S. C. (2015). Optimization of Annealing Temperature for Amplification of 507 bp fragment of rpoB Gene of Clinical Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis Isolate 86. *Indonesia Journal of Biomedical Science*, 9(2).
- Siswanto, J. E., Berlian, T., Putricahya, E., Panggalo, L. V., & Yuniani, L. (2016). Isolasi DNA pada sampel darah tepi dan swab buccal pada bayi penderita ROP: Perbandingan hasil uji konsentrasi dan indeks kemurnian. *Jurnal Sari Pediatri*, 18(4), 270-277.
- Subbiah, V., Yang, D., Velcheti, V., Drilon, A. and Meric-Bernstam, F., 2020. State-of-the-art strategies for targeting RET-dependent cancers. *Journal of Clinical Oncology*, 38(11), p.1209.
- Syamsurizal, S., Saputra, H., Putri, D. H., & Badriyya, E. (2020). Primers Designed For Amplifying TCF7L2 Gen. *Jurnal Biota*, 6(2), 63-70.
- Thornton, B., & Basu, C. (2011). Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochemistry and molecular biology education*, 39(2), 145-154.
- Tjaden, N. E. B., & Trainor, P. A. (2013). The developmental etiology and pathogenesis of Hirschsprung disease. *Translational research*, 162(1), 1-15.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics*, 13, 1-11.