

Karakteristik Primer pada *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk Sekuensing DNA: Mini Review

Dinda Eling K. Sasmito¹, Rahadian Kurniawan², Izzati Muhimmah³

¹ Magister Teknik Informatika, Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta

^{2,3} Jurusan Teknik Informatika, Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta

¹dindaelingsasmito@gmail.com, ²rahadiankurniawan@ymail.com,

³izzati@uii.ac.id

Abstrak Kesuksesan dalam melakukan desain primer pada *Polymerase Chain Reaction* (PCR) sangat dipengaruhi oleh karakteristik primer yang digunakan. Beberapa penelitian mengenai desain primer telah dilakukan menggunakan berbagai macam algoritma dan karakter primer yang berbeda-beda. Dengan mengetahui karakteristik primer yang digunakan pada penelitian-penelitian sebelumnya, diharapkan penelitian selanjutnya dapat lebih memberikan hasil yang lebih signifikan, khususnya dalam bidang sekuensing DNA. Paper ini bertujuan untuk memberikan panduan untuk mengetahui beberapa sifat/karakteristik primer yang signifikan terhadap keoptimuman desain primer. Harapannya, setelah mengetahui sifat/karakteristik yang signifikan peneliti dapat menghemat waktu komputasi dengan hanya mempertahankan parameter primer yang memberikan nilai optimal.

Keywords: *Polymerase Chain Reaction, desain primer, bioinformatika*

1 Pendahuluan

Bioinformatika adalah disiplin ilmu baru yang menggabungkan ilmu komputer, kimia dan statistika untuk mengatur, menganalisis, dan mendistribusikan informasi biologis untuk menjawab pertanyaan-pertanyaan kompleks di bidang biologi. Saat ini, banyak teknik analisis molekuler yang digunakan di seluruh dunia diantaranya: PCR, *flow cytometry*, *tissue microarray*, *different blots*, diagnosis genetic, dll. Dari beberapa teknik tersebut, PCR adalah teknik yang paling diterima secara luas, umumnya digunakan untuk melakukan diagnosis yang membutuhkan spesifisitas dan sensitivitas yang sangat tinggi. PCR umumnya digunakan untuk berbagai tugas, seperti deteksi penyakit keturunan, identifikasi sidik jari genetik, diagnosis penyakit menular, kloning gen, pengujian paternitas, dan komputasi DNA. Untuk membuat sebuah alat PCR yang spesifik, efektif dan efisien bagi peneliti maupun klinisi, aspek yang paling penting adalah melakukan desain pada primer (desain primer). Primer adalah molekul oligonukleotida untai tunggal yang terdiri atas sekitar 30 basa. Desain primer yang tepat adalah salah satu faktor yang paling penting dalam keberhasilan sekuensing DNA.

Dalam beberapa tahun terakhir, banyak publikasi yang membahas teknik-teknik desain primer dalam bidang sekuensing DNA. Karena banyaknya penelitian mengenai desain primer ini, maka perlu adanya literatur review yang dapat digunakan sebagai panduan bagi penelitian lain yang akan meneliti pada bidang yang sejenis, khususnya desain primer dalam sekuensing DNA. Beberapa literatur review mengenai desain

primer pernah dilakukan sebelumnya diantaranya [2], [3]. Pada penelitian [2], dilakukan review tentang analisis algoritma dan pembobotan parameter yang digunakan pada beberapa tools desain primer, sedangkan pada [3], membahas tentang desain primer pada beberapa tools desain primer online.

Dari beberapa literatur review yang dilakukan sebelumnya belum ada yang spesifik membahas karakter Primer yang digunakan pada penelitian Desain Primer. Oleh karena itu, review ini merangkum beberapa penelitian sebelumnya untuk memberikan panduan untuk mengetahui beberapa sifat/karakteristik primer yang signifikan terhadap keoptimuman desain primer. Harapannya, setelah mengetahui sifat/karakteristik yang signifikan peneliti dapat menghemat waktu komputasi dengan hanya mempertahankan parameter primer yang memberikan nilai optimal.

2 Materi dan Metode

Keberhasilan reaksi PCR sangat ditentukan oleh beberapa faktor [1]: (1) deoksiribonukleotida triphosphat (dNTP), (2) oligonukleotida primer, (3) DNA template (cetakan), (4) komposisi larutan buffer, (5) jumlah siklus reaksi, (6) enzim yang digunakan, dan (7) faktor teknis dan non-teknis lainnya, misalnya kontaminasi. Oligonukleotida primer (desain primer) memegang peranan penting untuk spesifisitas maksimal dan efisiensi PCR [2][3]. Primer yang baik ditentukan oleh beberapa sifat/karakter primer [2][3][4]:

a. Panjang primer

Desain primer yang diperlukan untuk PCR adalah sepasang primer yang dikenal dengan forward primer dan reverse primer. Primer yang diperoleh merupakan rangkaian basa nukleotida yang unik dan diusahakan memiliki ukuran pendek untuk meminimalkan biaya. Panjang primer berkisar 18-30 basa, didasarkan pada pertimbangan kombinasi acak yang mungkin ditemukan pada satu urutan genom. Probabilitas menemukan 1 basa A, G, C atau T pada satu basa adalah $\frac{1}{4}$ (4^{-1}), probabilitas menemukan dua basa sequence (AG, AC, CG, dll) adalah $\frac{1}{16}$ (4^{-2}), probabilitas menemukan 4 basa sequence (ACGT, CGAT, dll) adalah $\frac{1}{256}$ (4^{-4}). Sehingga 17 basa primer secara statistik akan ditemukan sekali dalam setiap 4^{17} basa sequence, atau sekitar 17 miliar basa sequence. Primer dengan panjang lebih dari 30 basa tidak disarankan, karena tidak menunjukkan spesifisitas yang lebih tinggi. Selain itu, primer yang panjang dapat berakibat terhibridasi dengan primer lain sehingga tidak membentuk polimerisasi DNA.

Panjang primer yang digunakan pada penelitian berbeda-beda, namun tetap meminimalkan ukuran primer. Kampke dkk [1] dan Jain Shing Wu dkk [2] menggunakan panjang primer 16-28 basa. Sementara dalam teorinya, Burpo [9] menggunakan batas 18-22 basa. Penelitian lain [3], [4] tidak menggunakan panjang primer sebagai batasan langsung, melainkan menggunakan selisih panjang forward primer dan reverse primer.

b. Primer Melting Temperature (Tm)

Primer Melting Temperature (Tm) atau suhu leleh merupakan temperatur yang diperlukan oleh primer untuk mengalami disosiasi / lepas ikatan. Suhu leleh

primer yang digunakan harus sama untuk memastikan kinerja yang konsisten pada pasangan primer. Terdapat beberapa formula yang dapat digunakan untuk menghitung suhu leleh primer, Wallace's Formula, Bolton and McCarthy's Formula dan *Thermodynamic Basis Sets for Nearest Neighbor Interactions*.

$$Tm_w (P) = (nG + nC) * 4 + (nA + nT) * 2 \dots\dots\dots (1)$$

$$Tm_B (P) = 81.5 + 16.6 (\log_{10}[Na^+]) + 0.41 * (GC \text{ content}) - \frac{675}{|P|} \dots\dots\dots (2)$$

$$Tm,1 (P) = \frac{\Delta H (P)}{\Delta S (P)+R \cdot \ln \frac{1}{4}} + T_0 + t \dots\dots\dots (3)$$

Keterangan:

- T_w(P) : *Primer Melting Temperature* (Tm) Wallace's Formula
- T_B(P) : *Primer Melting Temperature* (Tm) Bolton and Mc Carthy's Formula
- T_{m,1}(P) : *Primer Melting Temperature* (Tm) berdasarkan Thermodynamic Basis Sets for Nearest Neighbor Interactions.
- nG : jumlah basa G pada primer
- nC : jumlah basa C pada primer
- nA : jumlah basa A pada primer
- nT : jumlah basa T pada primer
- GC content : jumlah persentase basa G dan C pada primer
- Na⁺ : kandungan konsentrasi garam pada primer
- |P| : panjang primer
- R : 1,987 (cal/°)
- γ : 50 x 10⁻⁹, konsentrasi molar
- T₀ : -273,15°C
- t : -21,6°C
- ΔH : Enthalpy
- ΔS : Entropy

Pada penelitiannya, Kampke [1] menggunakan Bolton and McCarthy's Formula untuk menghitung suhu leleh, sementara penelitian lain lebih memilih menggunakan Wallace's Formula [2], [4]. Beberapa penelitian menganggap suhu leleh sebagai salah satu sifat/karakteristik yang perlu dipertimbangkan, namun tidak menyebutkan metode yang digunakan dalam penelitiannya [5], [6]. Selain itu juga ada penelitian yang tidak menggunakan suhu leleh sebagai sifat/karakteristik desain primer yang dipertimbangkan [7], dan penelitian yang menggunakan selisih suhu leleh pada forward primer dan reverse primer [2],[3],[4]. Bahkan dalam penelitiannya, Cheng Hong Yang dkk [3] membandingkan hasil yang diperoleh menggunakan Wallace's formula serta Bolton and McCarthy's Formula.

c. Primer Annealing Temperature (Ta)

Primer Annealing Temperature (Ta) merupakan suhu yang diperkirakan agar primer dapat berkaitan dengan template (DNA) secara stabil. Suhu aneling yang tinggi akan menyulitkan terjadinya ikatan primer sehingga menghasilkan produk PCR yang kurang efisien. Sebaliknya, suhu aneling yang terlalu rendah menyebabkan terjadinya penempelan primer pada DNA di tempat yang tidak spesifik. Nilai suhu aneling yang sebanding dengan suhu leleh menyebabkan suhu aneling tidak dimasukkan dalam perhitungan keoptimalan desain primer.

$$Ta = 0.3 * Tm (P) + 0.7 * Tm (product) - 14.9 \dots\dots\dots (4)$$

Keterangan:

Ta : *Primer Annealing Temperature*
 Tm (P) : *Primer Melting Temperature*
 Tm(product) : *Product Melting Temperature*, suhu leleh pada produk

d. Selisih *Primer Melting Temperature* (ΔT_m)

Pasangan primer sebaiknya tidak memiliki selisih suhu leleh yang tinggi. Pasangan primer dengan selisih suhu leleh yang lebih dari 5°C menyebabkan penurunan proses amplifikasi, atau bahkan memungkinkan tidak terjadi proses amplifikasi.

e. GC Content

Aturan umum yang diikuti oleh sebagian besar program desain primer [2][3][4] adalah menggunakan persen basa G dan C antara 40% hingga 60% [9].

$$GC\ Content = \frac{nG+nC}{|p|} \times 100 \dots\dots\dots (5)$$

Keterangan:
 nG : Jumlahbasa G pada primer
 nC : Jumlahbasa C pada primer
 |p| : Panjang primer

f. GC Clamp

Beberapa program mensyaratkan pasangan primer memiliki basa GC pada ujung 3' dari primer[3],[4]. GC Clamp yang dimaksud adalah ujung C, G, CG atau GC, yang diyakini membuat hibridisasi lebih stabil.Namun perlu dihindari lebih dari 3 basa G atau C pada 5 basa terakhir ujung 3' karena ujung 3'-nya bisa melipat membentuk struktur dimer yang mengakibatkan ujung 3' primer tidak terikat pada template. Penelitian yang mempertimbangkan struktur hairpin untuk desain primer adalah [2][3][4].

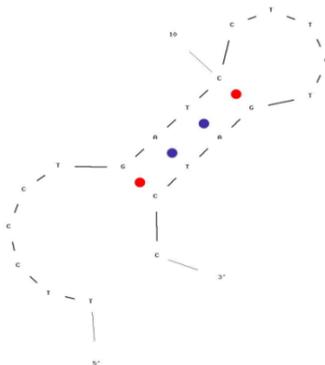
g. Secondary Structures

Reaksi PCR sebaiknya tidak mengandung *secondary structures* berupa hairpin atau dimer. Stabilitas *secondary structure* ditentukan oleh energi bebas (ΔG) dan suhu lelehnya. Hal ini menyebabkan primer tidak dapat menempel dengan template DNA.

1) Hairpin

Hairpin adalah struktur yang dibentuk oleh basis pasangan asam polynucleic antara urutan komplementer untai tunggal baik DNA maupun RNA. Terbentuknya struktur loop /hairpin pada primer sebaiknya dihindari, namun sangat sulit untuk memperoleh primer tanpa memiliki struktur haripin. 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.

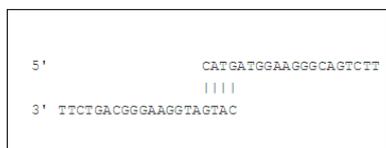
Kedua primer sebaiknya tidak memiliki basa nukleotida T pada ujung 3'-nya karena dapat menyebabkan mismatch/ketidakcocokan. Banyaknya mismatch atau mismatch pada ujung 3'-primer juga dapat menyebabkan hairpin.



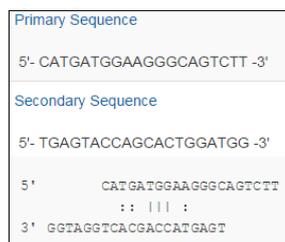
Gambar 1. Struktur Hairpin

2) Self Dimer dan Cross Dimer

Primer yang 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. Primer yang berikatan dengan primer pasangannya (reverse dan forward) disebut dengan Cross-Dimer. 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.



a



b

Gambar 2. Struktur Dimer, (a) Self-Dimer, (b) Cross-Dimer

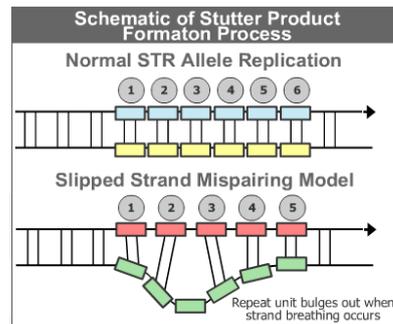
h. Self-Complementary (SC) dan Pair-Complementary (PC)

Selain *secondary structures*, *complementary* pada primer dan pasangan primer juga harus dihindari. *Self complementary* dapat menyebabkan struktur hairpin yang stabil hanya dengan 4 pasangan basa GC pada ujung maupun bagian tengah primer. Primer harus berisi kurang dari 4 basa komplementer, terutama pada ujung 3'. *Pair complementary* terutama pada ujung 3' primer dapat menyebabkan struktur dimer.

i. Repeats & Runs

Perulangan yang cukup panjang dengan basa sama (lebih dari tiga basa berurutan sama, misal basa AGCGGGGGATG memiliki 5 basa berurutan G) harus dihindari karena dapat menyebabkan terjadinya breathing pada primer dan mispriming, sehingga proses penempelan primer menjadi sulit. Primer sebaiknya juga tidak memiliki urutan pengulangan dari 2 basa dan maksimum pengulangan 2

basa sebanyak 4 kali masih dapat di toleransi. Misalnya ATATATAT Hal ini juga menyebabkan terbentuknya struktur hairpin.



Gambar 3. *Breathing* pada Primer

Sumber: http://www.nfstc.org/pdi/Subject04/pdi_s04_m01_02_j.htm

j. Specificity atau keunikan

Primer merupakan rangkaian basa nukleotida yang berasal dari template/DNA target. Primer yang baik adalah rangkaian basa nukleotida yang unik pada template tersebut, sehingga tidak terdapat pada *sequence* atau lokasi lain pada template. Bahkan sebaiknya untuk menghindari cross homologi, primer dilakukan analisis melalui BLAST-NCBI untuk mengetahui bahwa primer yang digunakan benar-benar unik dan tidak menempel pada organisme lain. Penelitian yang mempertimbangkan specificity dalam desain primer adalah [2][3][4][5][6].

k. Product Length

Jarak antara ujung 5' kedua primer dikenal dengan istilah *amplicon* atau *product length*. Pada umumnya, *product length product length* yang digunakan adalah <2000 basa. Jarak ini dirasa cukup untuk proses amplifikasi pada *template*.

l. Restriction Site

Restriction Site diberikan jika diperlukan. Untuk kasus primer yang memiliki *restriction site*, algoritma tertentu digunakan untuk memeriksa kesamaan pola dari ujung 5' ke ujung 3' primer, dan memproses apakah terdapat enzim sesuai *restriction* yang diberikan atau tidak. Seperti dalam penelitian terdahulu [2], jika terdapat *restriction site* yang sama (panjang pola primer yang cocok, kurang dari atau sama dengan panjang enzim restriksi, dan lebih dari atau sama dengan panjang enzim restriksi minus 3 $[(L_c-3) \leq P_m \leq L_c]$), maka algoritma yang digunakan akan menyesuaikan nilai yang dimiliki untuk proses seleksi primer yang optimal.

3 Hasil

Pada review ini, penulis merangkum karakteristik primer yang digunakan untuk masing-masing penelitian sebelumnya. Materi penelitian adalah penelitian terdahulu sejak tahun 2001 hingga 2014. Penelitian yang ditinjau adalah penelitian-penelitian dari berbagai jurnal, konferensi dan publikasi internasional seperti jurnal

Bioinformatics, IEEE, GECCO, dll. Tabel 1. Menunjukkan desain primer masing-masing penelitian.

Tabel 1. Desain Primer PCR pada Penelitian Terdahulu

No	Penulis	Topik Pembahasan	Tahun	Sifat / Karakteristik Primer												
				P	$\Delta P $	T _m	T _a	ΔT_m	GC Content	GC Clamp	Hairpin / SC	Dimer / PC	Repetition	Specificity / Unique	Product Length	Restriction site
1	Koichiro Doi, dkk [7]	Desain primer multiplex PCR: meminimalkan panjang primer	1999	✓	✓				✓		✓	✓			✓	
2	Thomas Kampke, dkk [1]	Menghitung interaksi oligonukleotida untuk PCR pasangan primer : Dynamic Programming	2001	✓		✓			✓			✓				
3	Jain Shing Wu, dkk [2]	Desain primer optimum yang memperhatikan sifat-sifat / karakteristik yang diperlukan	2004	✓				✓	✓	✓	✓	✓		✓		✓
4	Feng Mao Lin, dkk [5]	Desain primer multiplex PCR	2005	✓		✓			✓		✓	✓		✓		
5	Ali Bashir, dkk [6]	Desain primer multiplex PCR	2007			✓			✓			✓		✓		
6	Cheng Hong Yang, dkk [3]	Desain primer optimum yang memperhatikan sifat-sifat / karakteristik yang diperlukan : Product Size	2008		✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	
7	Maryam Amoozegar, dkk [4]	Desain primer optimum yang memperhatikan sifat-sifat / karakteristik yang diperlukan	2014		✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	

Keterangan:

- |p| : Panjang primer
- $\Delta|p|$: selisih panjang forward primer dan reverse primer
- T_a : Primer Annealing Temperature
- T_m : Primer Melting Temperature
- ΔT_m : Selisih Primer Melting Temperature

4 Diskusi

Dari Tabel 1. diatas dapat diketahui bahwa *GC Content* dan *Struktur Dimer* menjadi hal yang selalu dilibatkan dalam penelitian. *GC Content* berperan dalam meningkatkan stabilitas primer. Ikatan hidrogen yang kuat pada pasangan basa G dan C menyebabkan primer lebih stabil untuk menempel pada *template*, sehingga *GC Content* disarankan berkisar antara 40% hingga 60%. *Struktur dimer* dapat terjadi apabila primer memiliki banyak basa komplementer. Jika ikatan basa komplementer lebih stabil dibandingkan ikatan primer dan template, bahkan dengan suhu aneling yang tinggi, maka primer tidak dapat berikatan dengan template. Sehingga produk PCR yang dihasilkan akan berkurang secara signifikan.

Primer Annealing Temperature (Ta) atau suhu aneling dan perulangan basa secara berurut tidak digunakan sebagai batasan desain primer pada penelitian. Nilai suhu aneling yang sebanding dengan suhu leleh menyebabkan suhu aneling tidak digunakan sebagai sifat/kriteria yang dipertimbangkan dalam mendesain primer oleh penelitian yang ditinjau. Sementara perulangan basa secara berurut hanya disarankan untuk dihindari, dan lebih menekankan pada terbentuknya struktur hairpin [6] yang menjadi akibat adanya perulangan basa secara berurut.

Hal yang cukup menarik terjadi karena beberapa penelitian sebelum 2007 mempertimbangkan karakteristik panjang primer, namun selanjutnya karakteristik panjang primer digantikan dengan selisih panjang forward primer dan reverse primer. Pada penelitian yang dilakukan oleh Kampke dkk [5] dan Wu dkk [6] menggunakan panjang primer 16-28 basa. Penelitian [9] dan [11] tidak menyebutkan panjang primer yang digunakan, hanya menyarankan meminimalkan panjang primer untuk meminimalkan biaya. Sementara penelitian lain [7][8] tidak menggunakan panjang primer sebagai batasan langsung, melainkan menggunakan selisih panjang forward primer dan reverse primer. Primer yang panjang memiliki spesifisitas tinggi dan suhu leleh yang tinggi dengan biaya yang lebih mahal, namun primer yang lebih pendek memiliki spesifisitas rendah dengan biaya yang lebih murah. Hal ini yang menjadi pertimbangan Yang dkk [7] untuk tidak mempertimbangkan panjang primer dalam penelitiannya. Sebagai penggantinya, untuk tetap mempertahankan stabilitas primer, Yang dkk mengganti sifat/kriteria menjadi selisih panjang primer dengan batas optimum 3 basa.

Selain itu, dari beberapa penelitian tersebut mempertimbangkan melting temperature / suhu leleh, sementara beberapa lainnya memprioritaskan pada selisih suhu leleh pasangan primer. Hal ini cukup menarik untuk dicari tahu mengenai formula mana yang lebih akurat untuk menghitung suhu leleh. Pada penelitiannya, Kampke dkk [5] menggunakan *Thermodynamic Basis Sets for Nearest Neighbor Interactions* untuk menghitung suhu leleh, sementara penelitian lain lebih memilih menggunakan Wallace's Formula [8]. Beberapa penelitian menganggap suhu leleh sebagai salah satu sifat/karakteristik yang perlu dipertimbangkan, namun tidak menyebutkan metode yang digunakan dalam penelitiannya [9], [10]. Selain itu juga ada penelitian yang tidak menggunakan suhu leleh sebagai sifat/karakteristik desain primer yang dipertimbangkan [11]. Penelitian Wu dkk [6] tidak mempertimbangkan suhu leleh pada desain primer, namun menggantinya dengan selisih suhu leleh. Wu dkk [6] mempertimbangkan bahwa selisih suhu leleh sepasang primer tidak boleh lebih dari 5°C. Hal ini dijadikan pertimbangan dengan harapan pasangan primer akan

menempel di *template* pada suhu yang sama. Penelitian Yang dkk [7] menggunakan kedua formula Bolton and McCarthy's dan Wallace's, bahkan membandingkan akurasi keduanya. Hasil penelitiannya menyebutkan Wallace's Formula memberikan hasil yang lebih akurat dibandingkan Bolton and McCarthy's Formula.

Secara algoritma, beberapa penelitian tersebut dilakukan menggunakan berbagai algoritma untuk merancang desain primer PCR yang optimal. Penelitian terkait interaksi oligonukleotida untuk PCR pasangan primer [5], menjadi dasar dalam pengembangan berbagai algoritma yang digunakan untuk desain primer pada PCR. Penelitian terkait desain primer optimum yang memperhatikan sifat-sifat / karakteristik yang diperlukan dalam suatu primer telah dilakukan menggunakan metode *Genetic Algorithm* [6], *Memetic Algorithm* [7], *Gravitational Search Algorithm* [8]. Penelitian telah dikembangkan hingga desain primer untuk modifikasi PCR, Multiplex PCR [9], [10], [11]. Multiplex PCR merupakan modifikasi PCR untuk mendeteksi penghapusan atau duplikasi secara cepat pada jumlah gen yang besar.

5 Kesimpulan

Desain primer yang baik sangat penting untuk keberhasilan reaksi PCR. Penelitian terkait desain primer memiliki beberapa sifat-sifat/karakteristik yang perlu dipertimbangkan. Kombinasi sifat/karakteristik yang digunakan pada setiap penelitian hampir mirip satu sama lain, baik untuk desain primer single maupun multiplex primer. Setelah mengetahui beberapa sifat/karakteristik primer yang penting untuk mendesain primer PCR, maka selanjutnya dapat dilakukan penelitian untuk mencari sifat/karakteristik yang signifikan terhadap keoptimuman desain primer tersebut. Harapannya, setelah mengetahui sifat/karakteristik yang signifikan peneliti dapat menghemat waktu komputasi dengan tetap mempertahankan desain primer yang optimal.

Referensi

- [1] T. Yuwono, *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction*. Andi Publisher, 2007.
- [2] F. J. Burpo, "A critical review of PCR primer design algorithms and cross-hybridization case study," pp. 1–12, 2001.
- [3] K. A. Abd-elsalam, "Minireview Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design," vol. 2, no. May, pp. 91–95, 2003.
- [4] NFSTC, "National Forensic Science Technology Center (NFSTC)." [Online]. Available: http://www.nfstc.org/pdi/Subject04/pdi_s04_m01_02.htm. [Accessed: 03-Oct-2014].
- [5] T. Kämpke, M. Kieninger, and M. Mecklenburg, "Efficient primer design algorithms," *Bioinformatics*, vol. 17, no. 3, pp. 214–25, Mar. 2001.
- [6] J.-S. Wu, C. Lee, C.-C. Wu, and Y.-L. Shiue, "Primer design using genetic algorithm," *Bioinformatics*, vol. 20, no. 11, pp. 1710–7, Jul. 2004.
- [7] C.-H. Yang, Y.-H. Cheng, H.-W. Chang, and L.-Y. Chuang, "Primer design with specific PCR product size using Memetic algorithm," *2008 IEEE Conf. Soft Comput. Ind. Appl.*, pp. 332–337, Jun. 2008.
- [8] M. Amoozegar and E. Rezvannejad, "Primer design using gravitational search algorithm," *2014 Iran. Conf. Intell. Syst.*, pp. 1–6, Feb. 2014.

- [9] F.-M. Lin, H.-D. Huang, H.-Y. Huang, and J.-T. Horng, "Primer design for multiplex PCR using a genetic algorithm," *Proc. 2005 Conf. Genet. Evol. Comput. - GECCO '05*, p. 475, 2005.
- [10] A. Bashir, Y.-T. Liu, B. J. Raphael, D. Carson, and V. Bafna, "Optimization of primer design for the detection of variable genomic lesions in cancer.," *Bioinformatics*, vol. 23, no. 21, pp. 2807–15, Nov. 2007.
- [11] K. Doi and H. Imai, "A Greedy Algorithm for Minimizing the Number of Primers in Multiple PCR Experiments.," *Genome Inform. Ser. Workshop Genome Inform.*, vol. 10, pp. 73–82, Jan. 1999.