

LAMP 法プライマ - 設計支援ソフトによる

プライマ - 設計の実例

1 M13 を鋳型 (Target) としたプライマーの設計

1.1 Target 配列のアップロード

PrimerExplorer Ver.4 の初期画面 (図 1.1) で Target 配列を読み込ませます。

まず、「参照」ボタンをクリックして Target 配列のファイルを選択します。入力する Target 配列の長さは 2kbp 以下に設定します。また、読み込み可能なファイル形式はプレーンテキスト形式 (配列のみ)、FASTA 形式、GenBank 形式の 3 種類です。

つぎに、パラメータセット (プライマー設計条件) を以下の 3 つから選択します。

- ①自動判定: Target 配列の GC 含量に応じてパラメータの初期設定値を変化させます。GC 含量が 45% 以下の場合は“AT rich”時のパラメータを、60% 以上の場合は“GC rich”時のパラメータを、それ以外の場合は“Normal”時のパラメータを適用します。
- ②通常: ユーザが設計条件をマニュアルで入力してプライマーを設計します。ただし、デフォルト条件として①の“Normal”時のパラメータが示されています。
- ③ユーザ指定: 右側の[参照...]ボタンをクリックし、パソコン内に保存してある設計条件パラメータファイルを指定してください。指定されたパラメータファイルの値を初期設定値としてプライマーを設計することができます。

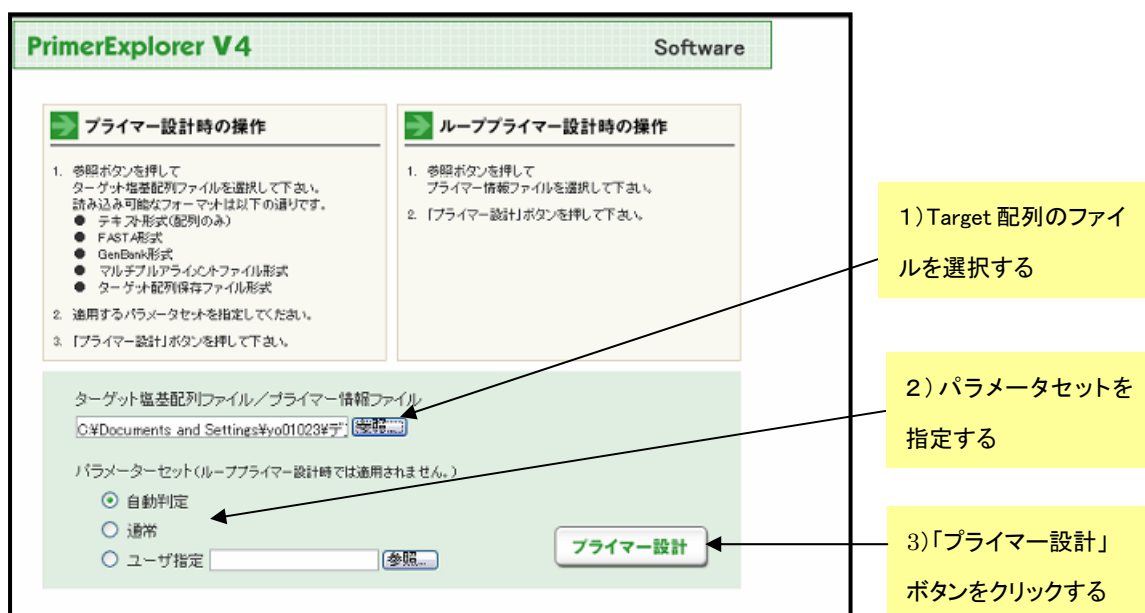


図 1.1 PrimerExplorer の初期画面

1.2 プライマーの設計 (イージーモード)

例として M13 の一部の配列 (長さ; 1969bp、GC 含量 = 48.2%) を使用してプライマーを設計します。「Generate」ボタンをクリックします(図 1.2 参照)。パラメーターを変更する必要はなく、増幅効率が高いと予想されるプライマーセットが 5 つ表示されます。プライマーセット候補絞り込みと優先順位付けが行われます。Generate sets 欄に 5 つのプライマーが設計されたことが表示されます。次に「Display」ボタンを押して、結果を一覧表画面に表示させます(図 1.3)。

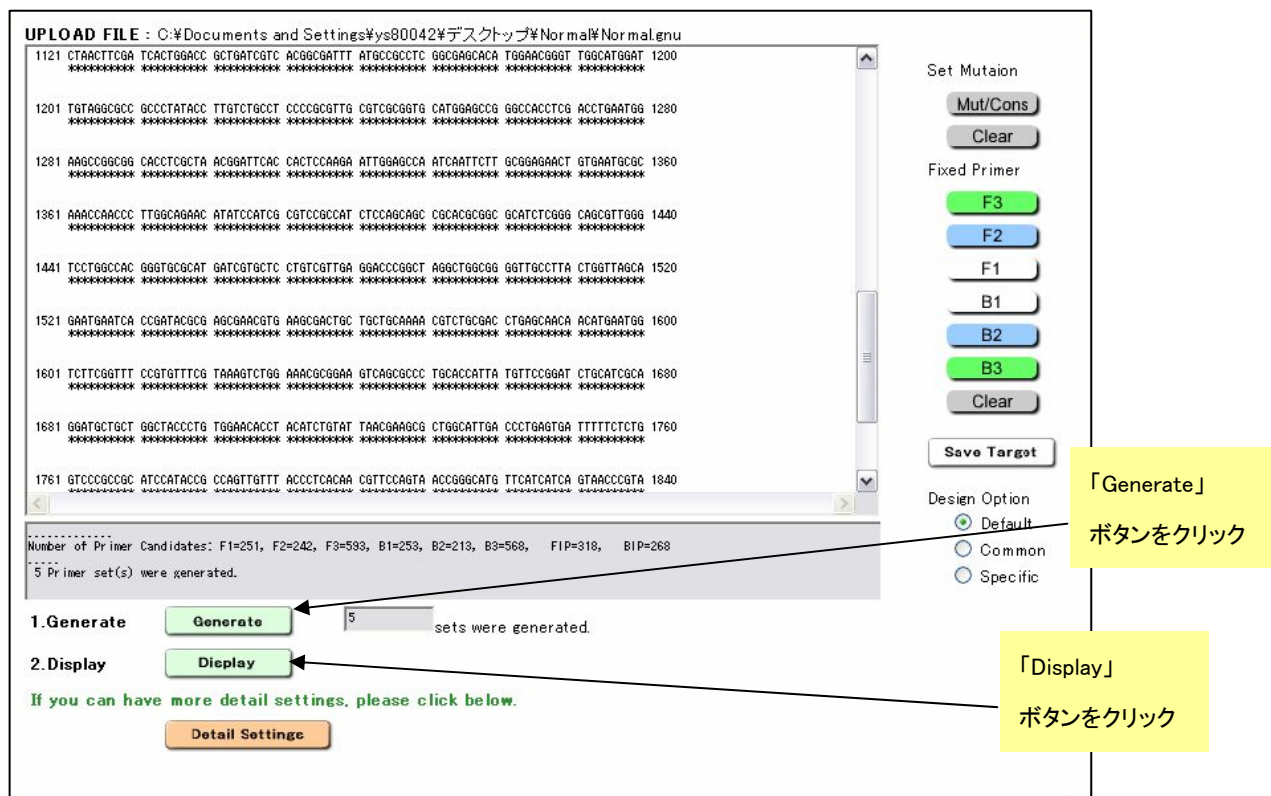


図 1.2 イージーモードでのプライマー設計画面

ターゲット配列に沿って設計されたプライマーセットが一覧表示されます。ここで、「Save List」ボタンを押すと、一覧表示画面を Excel file の形で保存することができます。つぎに画面左端のチェックボタンをチェックし、「Confirm」ボタンを押します。チェックしたプライマーセットのプライマー詳細表示画面が現れます(図 1.4)。各項目に問題がないかチェックし、問題がなければ「Order」ボタンを押してプライマーを発注します。また各プライマーセットの「Primer Information」を押し、プライマーの情報を保存します。この情報はループプライマーの設計に利用します。

PrimerExplorer V4
Software

1. Push "Order" button in order to transfer to a Genome ORDER site.
(Colored primers will be ordered.)
2. Push "Primer Information" button to download Primer Information format file.

DesignId 070115143852

Primer Information

1 ID:26 dimer(minimum)dG=-2.36

label	5'pos	3'pos	len	Tm	5'dG	3'dG	GCrat	Sequence
F3	607	624	18	59.42	-3.96	-4.69	0.56	ACTACTGGGCTGCTTCCT
B3	784	802	19	60.31	-5.20	-4.90	0.58	GTCCCTCGCGGAAATGACC
FIP		41						AGCTGACTGGTTGAAGGCTCT-GCAGGATCCATAAGCGGA
BIP		40						CATGACTATCGTCGCCGCACT-CACCTGTCTACGAGTTGC
F2	628	646	19	60.88	-6.10	-5.20	0.59	GCAGGATCCATAAGCGGA
F1c	668	689	22	65.68	-5.49	-5.93	0.55	AGCTGACTGGTTGAAGGCTCT
B2	751	769	19	59.31	-5.50	-5.40	0.58	CACCTGTCTACGAGTTGC
B1c	709	729	21	64.31	-4.56	-6.57	0.57	CATGACTATCGTCGCCGCACT

Primer Information

2 ID:40 dimer(minimum)dG=-1.95

label	5'pos	3'pos	len	Tm	5'dG	3'dG	GCrat	Sequence
F3	1576	1593	18	59.72	-7.03	-4.72	0.56	CCGACCTGAGCAACAACA
B3	1769	1786	18	59.08	-5.00	-5.75	0.56	AACTGGCGTATGGATGC
FIP		41						ACATAATGCTGCAGGGGCTG-TCAATGGTCTTGGTTCCG
BIP		40						CCGAGGATGCTGCTGCTAC-AATCACTCAGGTCATGCC
F2	1594	1613	20	59.76	-4.07	-5.30	0.50	TGAATGGTCTTGGTTCCG
F1c	1643	1663	21	65.39	-3.29	-7.42	0.57	ACATAATGCTGCAGGGGCTG
B2	1733	1752	20	59.64	-4.06	-5.40	0.50	AATCACTCAGGTCATGCC
B1c	1677	1696	20	65.39	-7.02	-5.42	0.65	CCGAGGATGCTGCTGCTAC

Primer Information

3 ID:6 dimer(minimum)dG=-2.23

label	5'pos	3'pos	len	Tm	5'dG	3'dG	GCrat	Sequence
F3	128	145	18	60.55	-5.84	-5.42	0.61	ACCTGGATGCTGTAGGC
B3	317	334	18	59.61	-6.54	-6.03	0.61	GGCTCAAAGTAGCCAAGC
FIP		40						GTGACTGGCGATGCTCGG-GCTTGGTTATGCCGGTACTG
BIP		39						TATGGGTTGCTGCTAGGCTA-CAAAGCGTGGACAGTG
F2	150	169	20	60.49	-5.85	-4.23	0.55	GCTTGGTTATGCCGGTACTG
F1c	198	217	20	65.19	-4.90	-6.19	0.65	GTGACTGGCGATGCTCGG
B2	279	296	18	60.06	-5.01	-5.05	0.61	CAAAGCGTGGACAGTG
B1c	218	238	21	65.98	-4.98	-6.50	0.57	TATGGGTTGCTGCTAGGCTA

図 1.4 プライマー詳細表示画面

1.3 プライマーの設計（エキスパートモードでの設計）

イージーモードである程度の性能をもつプライマーは設計できますが、さらに性能の良いプライマーを設計したい場合や、ユーザー自身がプライマーをカスタマイズしたい場合は、エキスパートモードで設計します。イージーモードの「Detail Settings」ボタンを押して（図 1.5）、エキスパートモードに移行します（図 1.6）。デフォルトではパラメータセットは「自動判定」になっています。「自動判定」では、入力した Target 配列の GC 含量が自動的に計算され、次に表示される設計画面で自動的にプライマー設計条件（「Normal 配列設計条件」、「GC rich 配列設計条件」、「AT rich 配列設計条件」）が選択されます。表示されたプライマー設計画面を見ると、「Parameter Set」は「Normal」が選択されていることがわかります。Normal のパラメータ条件は図 1. 6 の通りです。

次に「Generate」ボタンをクリックして、プライマー設計を開始します。設計が始まると、メッセージエリアに現在の設計の進行状況が表示されます。設定したパラメータ条件に合う各プライマー領域の候補数がそれぞれ表示され、さらにそれらの領域を組合せたインナープライマー（FIP、BIP）の候補数が示され、それと基にプライマーセットが生成されます。ここでは、全部で 1,000 のプライマーセットが設計されました（図 1.7）。続いて「Display」ボタンをクリックして結果を一覧表示させます。

「Detail Settings」ボタンをクリック

1. Generate Generate [] sets were generated.
2. Display Display

If you can have more detail settings, please click below.
Detail Settings

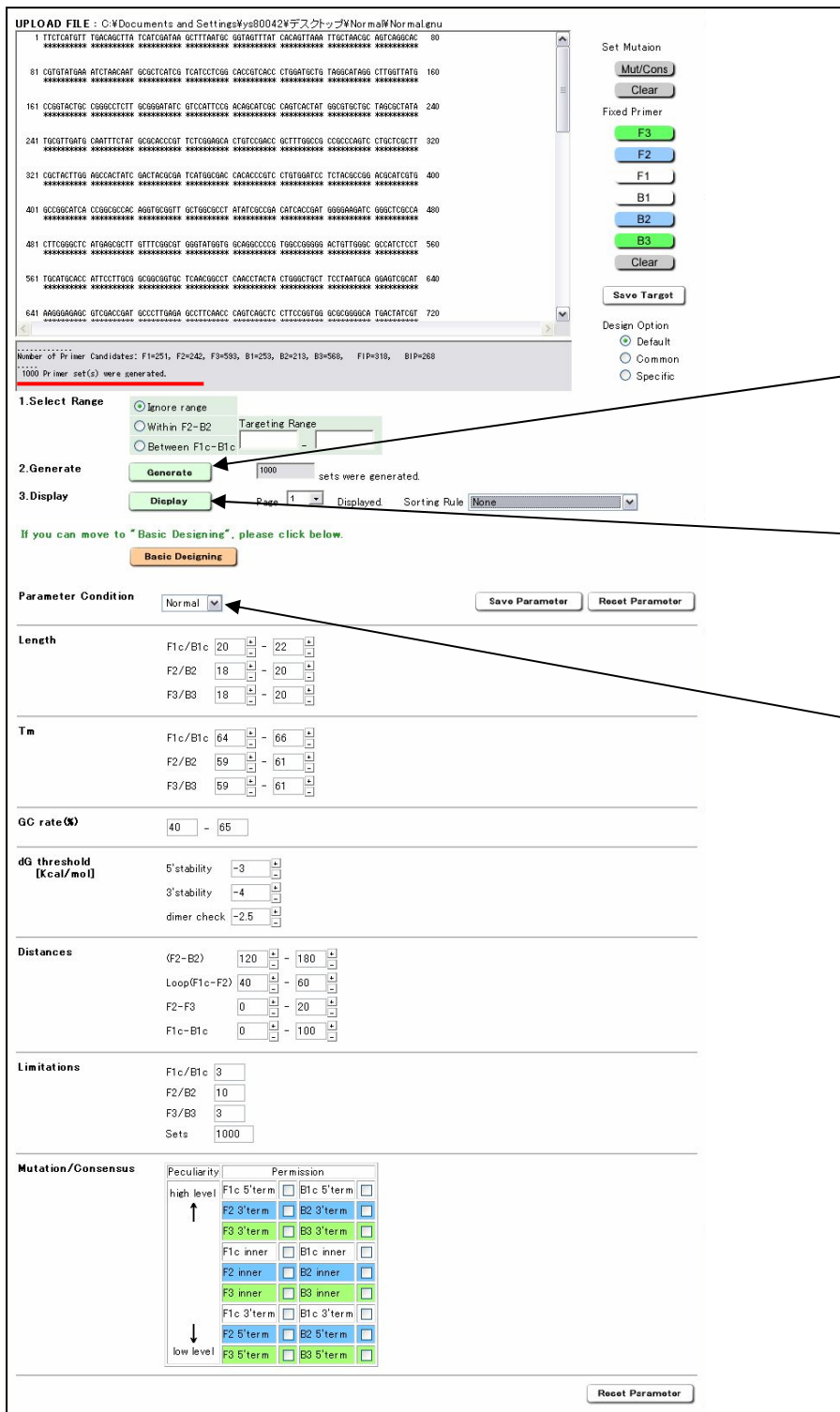
Set Mutation
Mut/Cons
Clear

Fixed Primer
F3
F2
F1
B1
B2
B3
Clear

Design Option
 Default
 Common
 Specific

Save Target

図 1.5 プライマー設計画面



「Generate」ボタンをクリックする

「Display」ボタンをクリックする

「Parameter Set」は「Normal」が選択されている

図 1.6 エキスパートモード

1.4 結果の表示

結果の一覧表示画面(図1. 8a、8b)では、一番左側に各プライマーセットのID Number、その右にダイマー形成の指標となる自由エネルギー変化の値が示されています。この自由エネルギー変化の値が低くなればなる

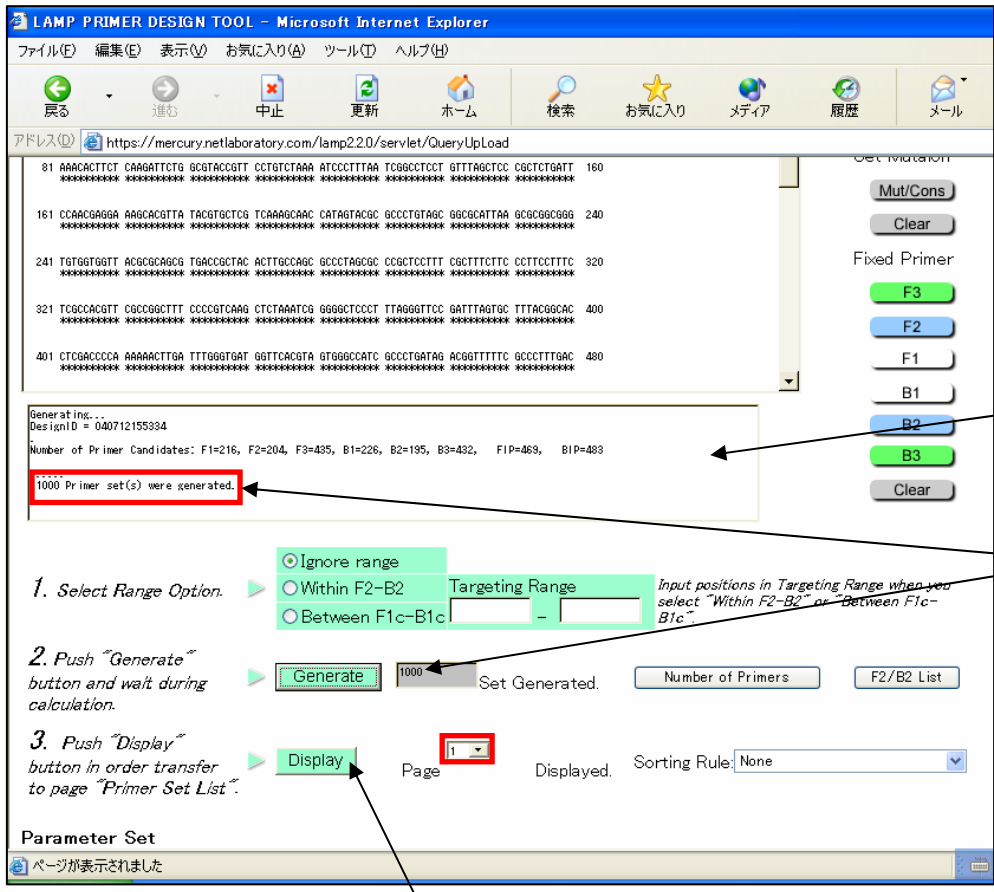


図 1.7 設計画面

「Display」ボタンをクリックして結果を表示させる

程ダイマーが形成されやすくなり、プライマーとして不適当になります。緑の大文字部分が F3 領域、青の大文字が F2 領域、黒の小文字が F1c 領域、黒の大文字が B1c 領域、青の小文字が B2 領域、緑の小文字が B3 領域となっています。

プライマーセットは F2 領域の 5' 末端の位置を規準に設計され、設計条件を満たすプライマーセットが Target 配列の全長にわたり 5' 末端から 3' 末端方向へ順番に表示されます。各々種類の F2 領域に対して一種類の他領域(F3、F1c、B1c、B2、B3 領域)が組み合わされ、各々の F2 領域に対して表示されます。Target 配列の 5' 末端から 3' 末端まで順次設計表示された後、再び 5' 末端からプライマー設計が開始され 3' 末端まで設計が行われます。この操作が 1,000 候補設計されるまで何回も繰返されます。

図 1.9 の結果の一覧画面に示したように、この例では入力 Target の全長が 1,969bp で、1 回の 5' 末端から 3' 末端までのプライマーセット設計で計 59 組のセットができ、2 回目は再び 5' 末端から 3' 末端までプライマー設計が 60 組から 118 組まで行われています。1 回目の最後のプライマーセットに含まれる F2 領域の 5' 末端は 1,281bp の位置まで設計されました(F3 の 5' 末端は 1440bp)。この中から数種類のプライマーを選択して詳細条件を比較検討します。

図 1.8a 結果の一覧表示画面-1 (1 ページ目)

PrimerExplorer V4 Software

DesignId 070606181335

Primer set: sorting rule [None]

Target DNA CACAGTAAATTGCTAACGCTAGTCAGGCACCGTGTATGAAATCTAACAAATGGCGTCATCGTCATCCTCCGGCACCGTCACCCCT
 (Complement) gtgtcaatttaacgattgcctcagtcocgtggcacatacttagattgttacccgagtagcagtaggagccgtggcagtgagg
 CONSENSUS(*)

Primer ID	dimer	Energy	Sequence	Region
[1]	-2.01	[1]	TGCTAACGCAGTCAGGCA	F3 領域
[2]	-2.01	[2]	TGCTAACGCAGTCAGGCA	F3 領域
[3]	-2.46			
[4]	-2.46			
[5]	-2.46			
[6]	-2.23			
[7]	-2.49			
[8]	-2.49			
[9]	-2.16			
[10]	-1.82			
[11]	-1.82			
[12]	-1.82			

2) 「Confirm」ボタンをクリック

1) 選択したプライマーセットの左端のボックスをチェックする

Region	5' End Position
B1c 領域	1351
B2 領域	1401
B3 領域	1441

B3 領域の 5' 末端の位置は 1440bp になっている

図 1.8b 結果の一覧表示画面-1 (2 ページ目)

The image shows a complex software interface with a large data table. The table has multiple columns, some containing text and others containing numerical values or status indicators (e.g., green and red cells). On the right side, there is a vertical sidebar menu with several items, some of which are highlighted in green. The overall layout is typical of a professional data analysis or reporting tool.

图 1.9 結果の一覧表示画面(全体画面)

1.5 プライマーセットの選択

Target配列の異なる領域を増幅するプライマーセットを 10~15 種類ほど選択して、詳細情報を比較することにより適当なプライマーを選択します。もしもあらかじめ増幅する領域が決まっているなら、その領域を増幅するプライマーセットを選択します。

ここでは「Target配列を増幅するためには、どの領域を使っても構わない」と前提します。

プライマーセットの一覧表示画面(図1. 8a)において、出来るだけ全長にわたってプライマーセットを選択します。例として ID Number 1、5、8、9、10、14、15、17、19、32 の 10 種類を選択します。まずこれらのプライマーセットの左側にあるボックスをチェックして、「Details」ボタンをクリックし、詳細表示画面を開きます。

The screenshot shows a table of primer sets for two different dimer targets. Callouts point to specific data points: Tm value, primer length, 3' and 5' positions, 5' terminal stability, 3' terminal stability, GC content, and the sequence itself.

Primer Information									
1 ID:1 dimer(minimum)dG=-2.01									
label	5'pos	3'pos	len	Tm	5'dG	3'dG	GCrate	Sequence	
F3	62	79	18	60.91	-4.49	-6.25	0.56	TGCTAACGCCAGTCAGGCA	
B3	250	268	19	59.11	-6.85	-4.56	0.53	GGGTGCGCATAGAAATTGC	
F1P			41					GCAGTACCGGCATAACCAAGCC-AATGCGCTCATCGTCATCC	
B1P			39					GCCTCTTGCGGGATATCGTCC-GCTAGCAGCACGCCATAG	
F2	98	116	19	59.84	-5.73	-4.76	0.53	AATGCGCTCATCGTCATCC	
F1c	149	170	22	65.71	-4.98	-5.85	0.59	GCAGTACCGGCATAACCAAGCC	
B2	217	234	18	59.71	-5.23	-4.07	0.61	GCTAGCAGCACGCCATAG	
B1c	174	194	21	64.55	-5.93	-6.04	0.62	GCCTCTTGCGGGATATCGTCC	

Primer Information									
2 ID:2 dimer(minimum)dG=-2.01									
label	5'pos	3'pos	len	Tm	5'dG	3'dG	GCrate	Sequence	
F3	62	79	18	60.91	-4.49	-6.25	0.56	TGCTAACGCCAGTCAGGCA	
B3	250	268	19	59.11	-6.85	-4.56	0.53	GGGTGCGCATAGAAATTGC	
F1P			40					GCAGTACCGGCATAACCAAGCC-ATGCGCTCATCGTCATCC	
B1P			39					GCCTCTTGCGGGATATCGTCC-GCTAGCAGCACGCCATAG	
F2	99	116	18	59.08	-6.97	-4.76	0.56	ATGCGCTCATCGTCATCC	
F1c	149	170	22	65.71	-4.98	-5.85	0.59	GCAGTACCGGCATAACCAAGCC	
B2	217	234	18	59.71	-5.23	-4.07	0.61	GCTAGCAGCACGCCATAG	

図 1.10 プライマー詳細表示画面

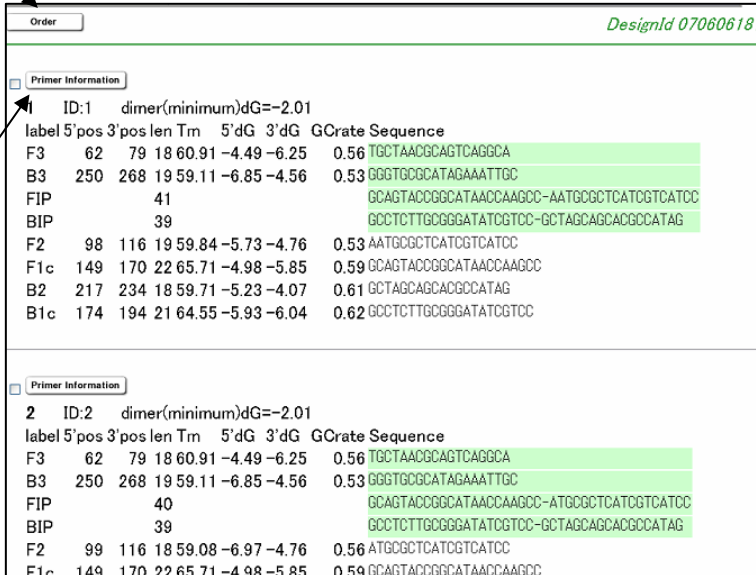
図1. 10の画面で各プライマーセットの F2 領域の 3' 末端、F1c 領域の 5' 末端、B2 領域の 3' 末端、B1c 領域の 5' 末端の安定性をチェックします。これらはプライマーが遺伝子増幅を始める際の基点となりますので、末端の安定性が重要になります。具体的には各 ΔG (安定性) が -4.0 kcal/mol 以下であるかどうかを調べます。例えば、 $\Delta G = -6.5 \text{ kcal/mol}$ の末端の方が $\Delta G = -4.0 \text{ kcal/mol}$ の末端よりも安定です。

例では、ID Number 1 では F1c の 5' 末端の安定性が -3.99 となっており、末端の安定性が不適となるため除きます。残りのセットについてはどれを選んでも構いませんが、出来れば末端の安定性が高いプライマーセットを選びます。ここでは ID Number 5、8、10、14、17 を選択しました。

ID Number の上に「Primer Information」ボタンがありますが(図 1.11)、これは選択したプライマーセットに対するループプライマーを設計する際に使用するものです。ループプライマー設計の説明のところで使用しますので、「Primer Information」ボタンをクリックしてプライマー情報を保存する操作を行います。画面の指示に従って保存場所とファイル名を指定し、「プライマー情報ファイル」を保存してください。(図 1. 12 参照)

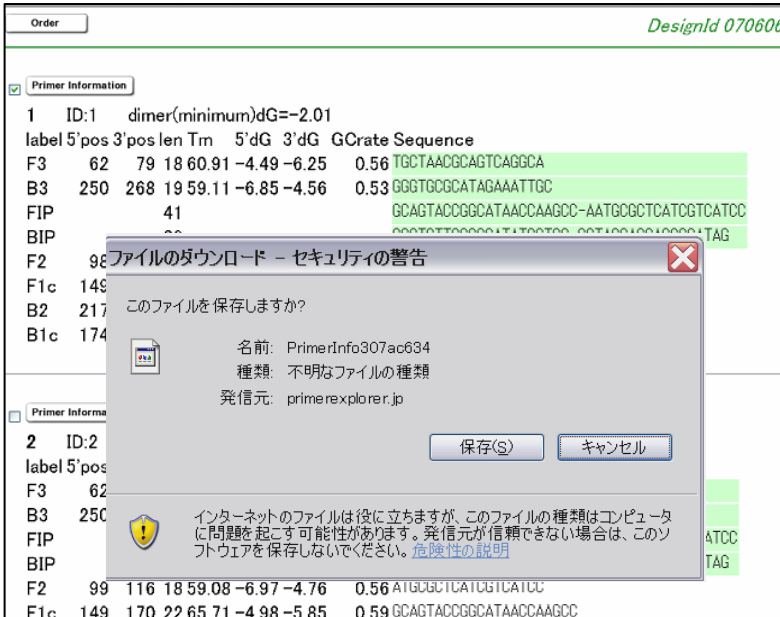
プライマーを発注する画面に進むためには「Order」ボタンをクリックします。(図 1. 13 参照)

2)「Order」ボタンをクリックして注文画面に進む



1)ループプライマーを設計する際に使うプライマー情報を保存するために「Primer Information」ボタンをクリックする

図 1.11 選択プライマー表示画面



このファイルを保存しますか?

名前: PrimerInfo307ac634
種類: 不明なファイルの種類
発信元: primerexplorer.jp

保存(S) キャンセル

インターネットのファイルは役に立ちますが、このファイルの種類はコンピュータに問題を起す可能性があります。発信元が信頼できない場合は、このソフトウェアを保存しないでください。[危険性の説明](#)

図 1.12 プライマー情報の保存画面



図 1.13 ログイン画面 (ログイン後、発注画面が示されます)

2 AT rich 配列でのプライマー設計

AT rich な遺伝子配列を用いてプライマー設計を行います。使用するのはウイルス遺伝子の一部で、長さは 1,140bp、GC 含量 = 34.5%です。

PrimerExplorer Ver.4 の初期画面で Target 配列を読み込ませます。

Target配列ファイルを入力し、パラメータセット「自動判定」が選択されていることを確認した後、「プライマー設計」ボタンをクリックします。(図は省略します)

「Generate」ボタンをクリック

「Parameter Set」は「AT rich」が選択されている

プライマーの長さが長めに、Tm 値が低めに設定されている

Parameter Condition	Value
Parameter Set	AT rich
Length	F1c/B1c: 20 - 25
	F2/B2: 18 - 25
	F3/B3: 18 - 25
Tm	F1c/B1c: 60 - 63
	F2/B2: 55 - 58
	F3/B3: 55 - 58
GC rate(%)	30 - 65
dG threshold [Kcal/mol]	5' stability: -3
	3' stability: -4

図 2.1 プライマー設計画面

配列の GC 含量が自動計算され、AT rich と判定されたため、「Parameter Set」は自動的に「AT rich」が選択されました。プライマーの長さが長めに、T_m 値が低めに設定されています(図2. 1参照)。

つぎに「Generate」ボタンをクリックしてプライマー設計を行います。その結果、1,000 候補のプライマーが設計されます(図は省略します)。続いて「Display」ボタンをクリックして、設計結果を表示させます。

5' 末端から 3' 末端方向へ向かって 170 セットのプライマーセットが設計され、171 セット目からは再び 5' 末端から 3' 末端へプライマーが設計されています。(図2. 2参照)

あとは第1章と同様の方法(p.18~23 参照)で、プライマーの詳細情報を比較してプライマーセットを選択します。また、その際には各プライマー領域の T_m 値が F1 と F2 間及び B1 と B2 間で 5°C 程度異なることを確認します。

Primer set: sorting rule [None]		DesignId 070606183331									
Target DNA		CTATTAGTAGAATTGATGCCACCTTTTCAGCTCGCGCCCCAAATGAAAATATAGCTAAACAGGTTATTGACCATTTGCGAAA									
(Complement)		gataatcatcttaactacggtggaaaagtcgagcgcgggtttacttttatatcgatttgtccaataactggtaaacgcttt									
CONSENSUS(*)		*****									
Primer ID	dG(dimer)	11	21	31	41	51	61	71	81	91	
<input type="checkbox"/> [1]	-1.83	[1]	TGATGCC	ACCTTTTCAGC		GCCCCAAATGAAAATATAGCT					
<input type="checkbox"/> [2]	-2.32			[2]		GCCCCAAATGAAAATATAGCTAAACAGGTTATTGACCATTTGC					
<input type="checkbox"/> [3]	-2.32			[3]		GCCCCAAATGAAAATATAGCT AACAGGTTATTGACCATTTGC					
<input type="checkbox"/> [4]	-2.32			[4]		GCCCCAAATGAAAATATAGCT ACAGGTTATTGACCATTTGC					
<input type="checkbox"/> [5]	-1.51			[5]		GCCCCAAATGAAAATATAGCT AGGTTATTGACCATTTGCGA					
<input type="checkbox"/> [6]	-1.51			[6]		GCCCCAAATGAAAATATAGCT GGTTATTGACCATTTGCGA					
<input type="checkbox"/> [7]	-1.69			[7]		CCAAATGAAAATATAGCTAAACAGG			CGAAA		
<input type="checkbox"/> [8]	-2.46						[8]	GGTTATTGACCATTTGCGAAA			
<input type="checkbox"/> [9]	-2.46						[9]	GGTTATTGACCATTTGCGAAA			
<input type="checkbox"/> [10]	-1.11						[10]	AGGTTATTGACCATTTGCG			
<input type="checkbox"/> [11]	-1.11						[11]	AGGTTATTGACCATTTGCG			
<input type="checkbox"/> [12]	-2.46						[12]	GGTTATTGACCATTTGCGAAA			
<input type="checkbox"/> [13]	-2.46						[13]	GGTTATTGACCATTTGCGAAA			
<input type="checkbox"/> [14]	-2.46						[14]	GGTTATTGACCATTTGCGAAA			
<input type="checkbox"/> [15]							[15]	GGTTATTGACCATTTGCGAAA			
<input type="checkbox"/> [16]							[16]		CGAAA		
<input type="checkbox"/> [17]											
<input type="checkbox"/> [18]											
<input type="checkbox"/> [19]	-2.32										

5' 末端から 3' 末端方向へ 170 セットのプライマーセットが設計され、171 セット目からは再び 5' 末端から 3' 末端へ設計されている

図 2.2 結果の一覧表示画面

<参考>
 なお、GC rich 配列の場合にも、同様に、自動的に GC rich 配列用のパラメータセットが選択され、プライマーが Target 配列全域にわたって設計されます。

3 設計条件(パラメータ)の変更(プライマー設計の注意点)

3.1 生成されるプライマーセット数が多い場合

a) プライマーの GC 含量を調節する。

プライマーの GC 含量が 50~60%の場合、実験的に良好な増幅成績が得られています。そこで GC 含量がこれらの値に出来るだけ近くなるように条件を変更します。GC 含量の範囲を狭めることにより候補数は減少し絞ることが出来ます。

b) プライマー領域の T_m 値の差(F2 と F1c 領域、B2 と B1c 領域等)を約 5°Cにします。

LAMP 法の反応過程では、F1(B1)と F1c(B1c)が自己アニールすることでループ構造が形成され、それが増幅の起点となります。このループを形成しやすくするために、F1c(B1c)は他のプライマーより T_m 値が 5°C程度高めに設定します。緩い条件(各領域の T_m 値の幅を広くした場合)でプライマーを設計した場合、様々な T_m 値をもつプライマー領域が組み合わさったプライマーセットが生成されます。そのため各領域間の T_m 値の差が 3°C以下になっている場合もあります。また、F2 と B2 領域、F1c と B1c 領域、F3 と B3 領域の T_m 値は合せた方が良い結果が得られます。

3.2 生成されるプライマーセット数が少ない場合

GC rich や AT rich 配列で生成されるプライマーセット候補数が少ない場合は、ターゲット配列に対して設計条件が厳しいことが考えられます。PrimerExplorer Ver.4 では GC rich や AT rich 配列用の設計条件を自動選択できますが、配列によってはこの条件でもプライマーセットが少しか生成されない場合があります。その際にはプライマーの長さの範囲、または T_m 値範囲を調節します。

a) AT rich 配列の場合

AT rich 配列では同一の長さの通常配列に比べ T_m 値が低く計算されます。そのため、デフォルトのプライマーLength から計算される T_m 値が、デフォルトの T_m 値の下限より低くなるため、プライマーセットが設計不能になります。そこでプライマーの Length を長く and/ or T_m 値をさらに低く設定します。

b) GC rich 配列の場合

逆に、GC rich 配列では同一の長さの通常配列に比べ T_m 値が高く計算されます。そのため、デフォルト条件で計算される T_m 値がデフォルトの T_m 値の上限より高く計算されてしまい、プライマーが生成されなくなります。そこで、プライマーの Length を短くし and/ or T_m 値をさらに高く設定します。どの程度長さや T_m 値を調節するかはターゲット配列によりケースバイケースで、各プライマー領域の長さを 1 塩基ずつ、または T_m 値を 1°Cずつ変化させ多くのプライマーが生成されたところで調節を止め、プライマーを選択します。

3.3 設計条件の変更と保存

ユーザ自身が設計条件を変更し、設計を行うことができます。また、その変更した設計条件を保存し、再設計することも可能です。例(図3. 1)では Length、Tm 値、GC 含量 (%)を変更しています。この設計条件を保存するためには、「Save Parameters」ボタンをクリックします。続いて図3. 2のように条件の保存方法を訊ねてきますので、保存場所とファイル名を指定して設計条件を保存します。

The screenshot shows the 'Parameter Condition' section of a primer design software. It includes a progress bar at the top, a '1. Select Range' section with radio buttons for 'Ignore range', 'Within F2-B2', and 'Between F1c-B1c'. Below this is a '2. Generate' section with a 'Generate' button and a '3. Display' section with a 'Display' button. A green message says 'If you can move to "Basic Designing", please click below.' with a 'Basic Designing' button. The 'Parameter Condition' section has a dropdown for 'AT rich' and 'Save Parameter' and 'Reset Parameter' buttons. The 'Length' section has input fields for F1c/B1c (19), F2/B2 (17), and F3/B3 (17). The 'Tm' section has input fields for F1c/B1c (63), F2/B2 (58), and F3/B3 (58). The 'GC rate(%)' section has input fields for 50 and 60. A yellow callout box points to the 'Save Parameter' button with the text '「Save Parameters」ボタンをクリックする'. A white callout box points to the input fields for Length, Tm, and GC rate with the text 'Length、Tm 値、GC rate (%)の赤枠'.

Parameter	Value	Unit
Length F1c/B1c	19	
Length F2/B2	17	
Length F3/B3	17	
Tm F1c/B1c	63	
Tm F2/B2	58	
Tm F3/B3	58	
GC rate(%)	50 - 60	

図3. 1 設計条件の変更(プライマー設計画面)

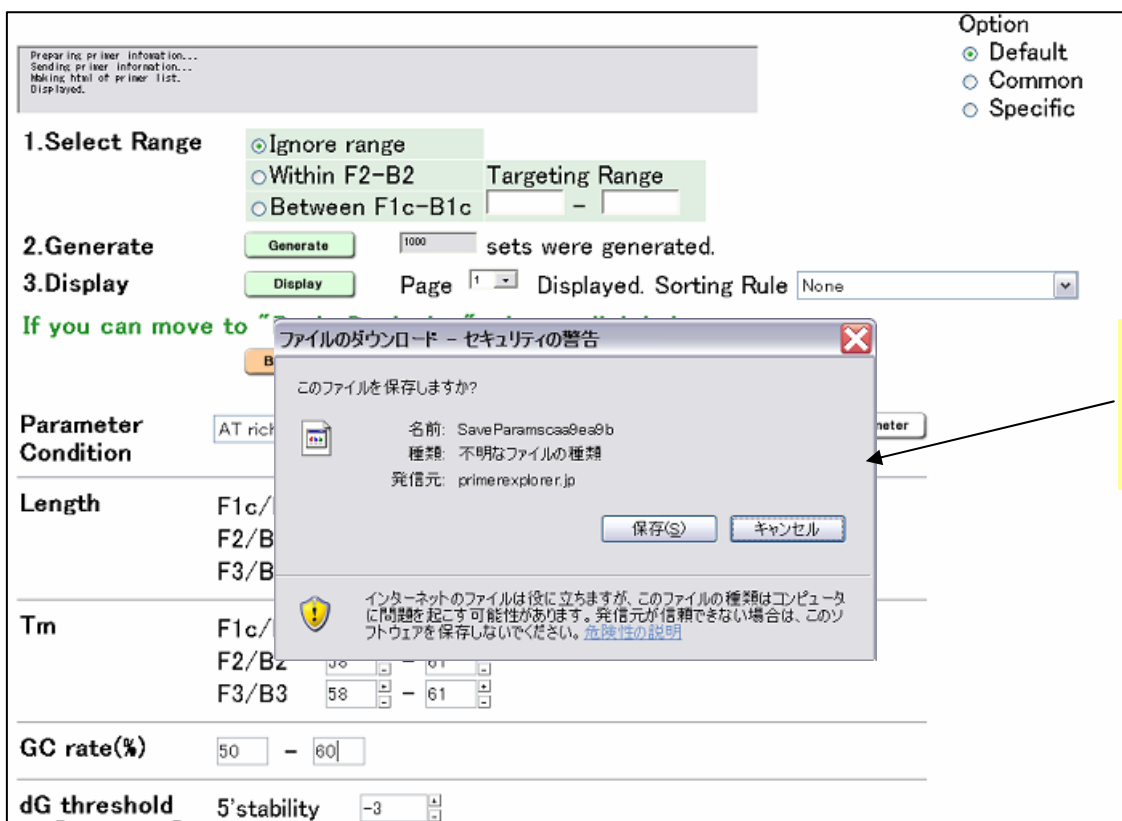


図3. 2 設計条件の保存

3.4 保存した設計条件でのプライマー設計

PrimerExplorer Ver.4 の初期画面(図3.3)で、Target配列を入力します。次にパラメータセット欄でユーザ指定をチェックし、参照ボタンをクリックして保存してある設計条件パラメータファイルを選択します。

つぎに「プライマー設計」ボタンをクリックします。

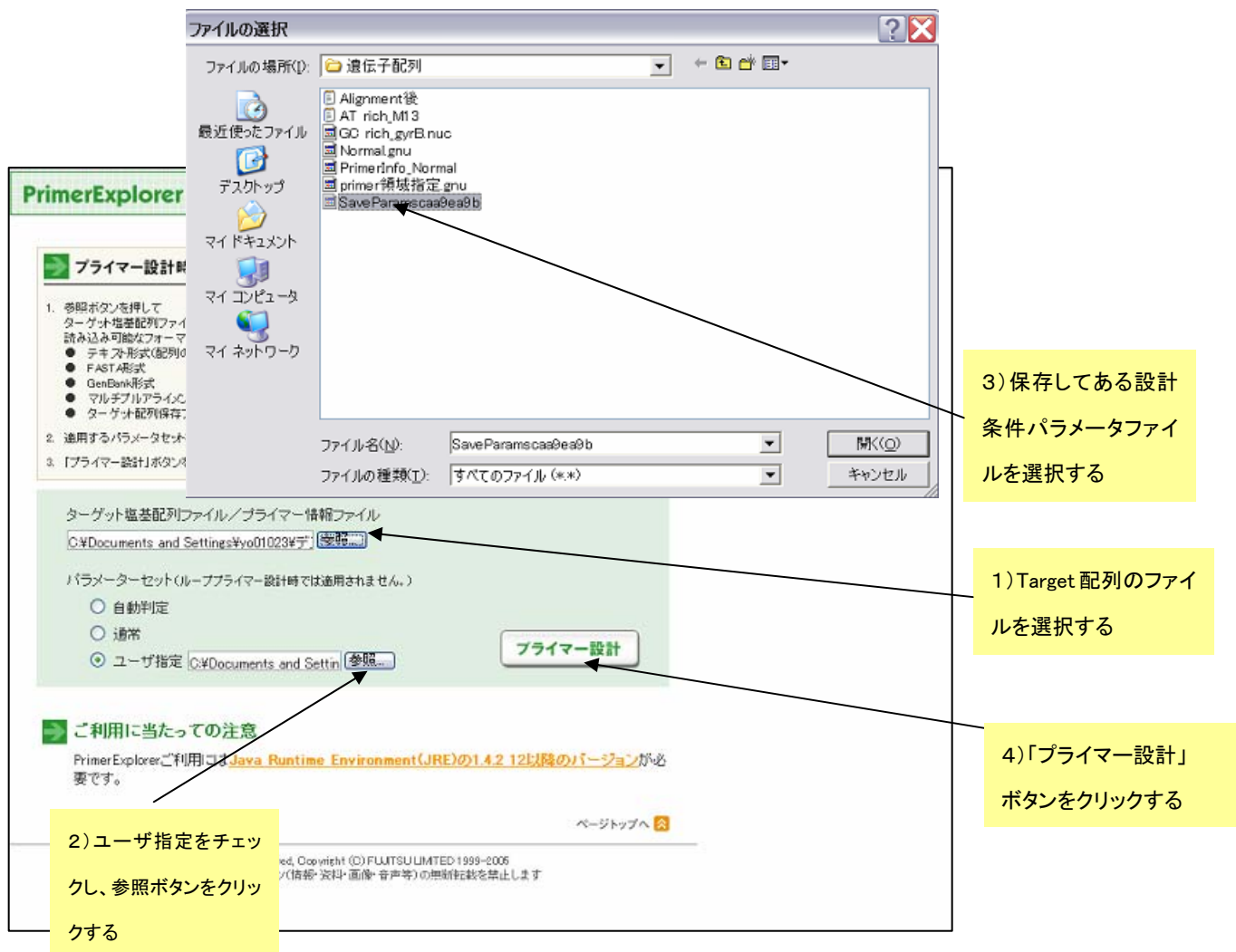


図3.3 PrimerExplorer Ver.4 の初期画面

表示されたプライマー設計画面(図3.4)では、先程保存した(図3.2)設計条件が示されます。このとき、「Parameter Set」は「Custom」と表示されています。

続いて「Generate」ボタンをクリックしてプライマーの設計を行います。第1章と同様の方法(p18~23 参照)でプライマーを設計、選択します。

Option
 Default
 Common
 Specific

1. Select Range Ignore range
 Within F2-B2 Targeting Range
 Between F1c-B1c [] - []

2. Generate [] sets were generated.

3. Display Page 1 Displayed. Sorting Rule None

If you can move to "Basic Designing", please click below.

Parameter Condition Custom

Length	F1c/B1c	19	-	25
	F2/B2	17	-	25
	F3/B3	17	-	25
Tm	F1c/B1c	63	-	66
	F2/B2	58	-	61
	F3/B3	58	-	61
GC rate(%)		50	-	60

「Parameter Set」は「Custom」と表示されている

先程保存した設計条件が表示される

図3. 4 プライマー設計画面

なお、最初にユーザ指定で「Custom」のパラメータを選択した場合でも、他の設計条件(Normal、AT rich、GC rich)に変更することが可能です。その場合は、「Parameter Set 欄」からプルダウンにより他の設計条件を選択してプライマーの設計を行います。(図3. 5参照)

1. Select Range Ignore range
 Within F2-B2 Targeting Range
 Between F1c-B1c [] - []

2. Generate [] sets were generated.

3. Display Page 1 Displayed. Sorting Rule None

If you can move to "Basic Designing", please click below.

Parameter Condition Custom

プルダウンにより他の設計条件を選択する

Length	F1c/B1c	19	-	25
	F2/B2	17	-	25
	F3/B3	17	-	25
Tm	F1c/B1c	63	-	66
	F2/B2	58	-	61
	F3/B3	58	-	61
GC rate(%)		50	-	60

図3. 5 パラメータの変更

4 プライマー領域を指定した設計

4.1 Target 配列上でプライマー領域を指定する

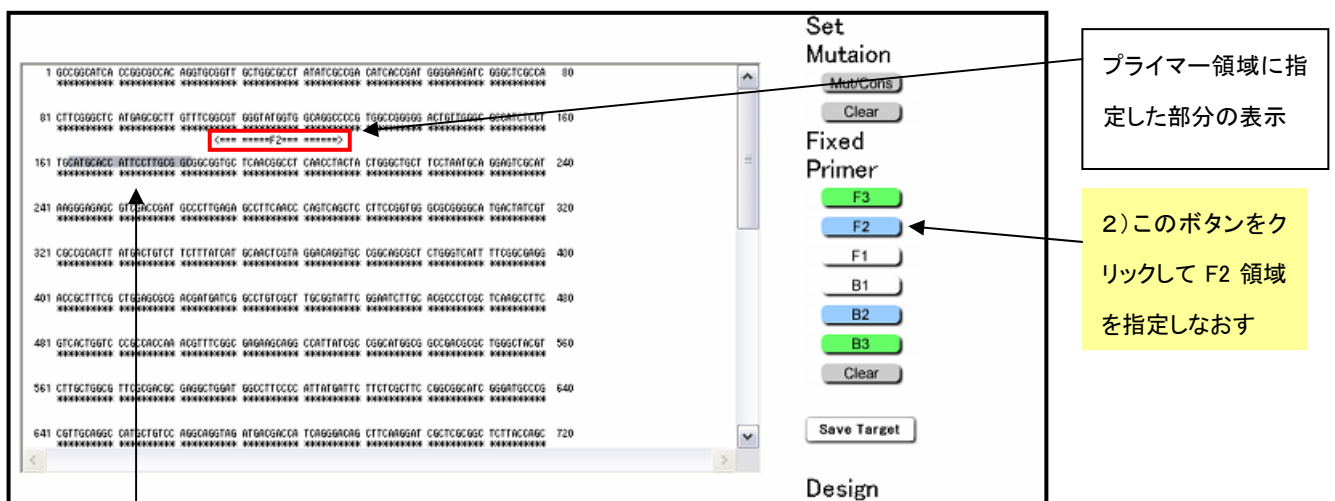
PCR 等で増幅しやすい領域がわかっており、増幅する領域があらかじめ決まっている場合や、PCR で使用したプライマーあるいはプライマー領域を活用したい場合に、プライマー領域を指定した設計を行います。

図4. 1のようにプライマー領域を指定してから「プライマー領域」のボタンをクリックします。図では「F3」ボタンをクリックしていますので、F3 領域として指定された部分が図4. 2のように表示されます。

図4. 1 プライマー設計画面



図4. 2 プライマー領域指定後の画面



1) 変更する場合は、新たなF3領域を指定する

もしも F3 領域を違う場所に変更する場合は、図4. 2のように新たな場所を指定して再度「F3」ボタンをクリックします。そうすると図4. 3のように新たな場所が F3 指定領域として表示されます。

このようにして領域の変更も可能です。また、このプライマー領域の情報をすべて消したい場合は「Clear」ボタンをクリックして消去します。



図4. 3 プライマー領域を再指定した後の画面

4. 2 プライマー領域を指定して設計する

それでは、実際にプライマー領域を指定してプライマー設計を行います。図4. 4のように F3 領域を指定してプライマーを設計します。プライマー領域を指定してから「F3」ボタンをクリックし、指定された領域の表示がされたら「Generate」ボタンをクリックしてプライマーを設計します。プライマーが設計されたら、「Display」ボタンをクリックして結果の一覧表示画面を表示させます。図4. 5 の一覧表示画面で緑の大文字で示されている部分が F3 領域ですが、先程指定した部分と一致しています。F3 領域を指定したプライマーセットが設計できました。このようにして設計したものの中から、第1章と同様の方法(p18~23 参照)でプライマーセットを選択します。

図 4.4 プライマー設計画面

指定した領域を F3 領域とするプライマーが設計された

Confirm Save List DesignId 070607120018

Primer set: sorting rule [None]

Target DNA TCATCCCTCGGCACCGTCACCCCTGGATGCTGTAGGCATAGGCTTGGTTATGCCGGTACTGCCGGCCCTCTTCCGGGATATCGT
 (Complement) agtaggagccctggcagtggtggacctacgacatccgatatccgaaccaatacggccatgacggccccggagaacgccctatagca
 CONSENSUS(*)

Fixed Primer	Primer IDdG(dimer)	111	121	131	141	151	161	171	181	191
<input type="checkbox"/> [1]	-2.23	[1]	ACCCTGGATGCTGTAGG	ACCCTGGATGCTGTAGG	ACCCTGGATGCTGTAGG	GCTTGGTTATGCCGGTACTG	GCTTGGTTATGCCGGTACTG	GCTTGGTTATGCCGGTACTG	GCTTGGTTATGCCGGTACTG	GCTTGGTTATGCCGGTACTG
<input type="checkbox"/> [2]	-2.49	[2]	ACCCTGGATGCTGTAGG	ACCCTGGATGCTGTAGG	ACCCTGGATGCTGTAGG	CTTGGTTATGCCGGTACTGC	CTTGGTTATGCCGGTACTGC	CTTGGTTATGCCGGTACTGC	CTTGGTTATGCCGGTACTGC	CTTGGTTATGCCGGTACTGC
<input type="checkbox"/> [3]	-2.49	[3]	ACCCTGGATGCTGTAGG	ACCCTGGATGCTGTAGG	ACCCTGGATGCTGTAGG	TTGGTTATGCCGGTACTGC	TTGGTTATGCCGGTACTGC	TTGGTTATGCCGGTACTGC	TTGGTTATGCCGGTACTGC	TTGGTTATGCCGGTACTGC
<input type="checkbox"/> [4]	-2.16	[4]	ACCCTGGATGCTGTAGG	ACCCTGGATGCTGTAGG	ACCCTGGATGCTGTAGG	GGTTATGCCGGTACTGCC	GGTTATGCCGGTACTGCC	GGTTATGCCGGTACTGCC	GGTTATGCCGGTACTGCC	GGTTATGCCGGTACTGCC
<input type="checkbox"/> [5]	-2.23	[5]	ACCCTGGATGCTGTAGG	ACCCTGGATGCTGTAGG	ACCCTGGATGCTGTAGG	GCTTGGTTATGCCGGTACTG	GCTTGGTTATGCCGGTACTG	GCTTGGTTATGCCGGTACTG	GCTTGGTTATGCCGGTACTG	GCTTGGTTATGCCGGTACTG
<input type="checkbox"/> [6]	-2.49	[6]	ACCCTGGATGCTGTAGG	ACCCTGGATGCTGTAGG	ACCCTGGATGCTGTAGG	CTTGGTTATGCCGGTACTGC	CTTGGTTATGCCGGTACTGC	CTTGGTTATGCCGGTACTGC	CTTGGTTATGCCGGTACTGC	CTTGGTTATGCCGGTACTGC
<input type="checkbox"/> [7]	-2.49	[7]	ACCCTGGATGCTGTAGG	ACCCTGGATGCTGTAGG	ACCCTGGATGCTGTAGG	TTGGTTATGCCGGTACTGC	TTGGTTATGCCGGTACTGC	TTGGTTATGCCGGTACTGC	TTGGTTATGCCGGTACTGC	TTGGTTATGCCGGTACTGC
<input type="checkbox"/> [8]	-2.16	[8]	ACCCTGGATGCTGTAGG	ACCCTGGATGCTGTAGG	ACCCTGGATGCTGTAGG	GGTTATGCCGGTACTGCC	GGTTATGCCGGTACTGCC	GGTTATGCCGGTACTGCC	GGTTATGCCGGTACTGCC	GGTTATGCCGGTACTGCC
<input type="checkbox"/> [9]	-2.23	[9]	ACCCTGGATGCTGTAGG	ACCCTGGATGCTGTAGG	ACCCTGGATGCTGTAGG	GCTTGGTTATGCCGGTACTG	GCTTGGTTATGCCGGTACTG	GCTTGGTTATGCCGGTACTG	GCTTGGTTATGCCGGTACTG	GCTTGGTTATGCCGGTACTG
<input type="checkbox"/> [10]	-2.49	[10]	ACCCTGGATGCTGTAGG	ACCCTGGATGCTGTAGG	ACCCTGGATGCTGTAGG	CTTGGTTATGCCGGTACTGC	CTTGGTTATGCCGGTACTGC	CTTGGTTATGCCGGTACTGC	CTTGGTTATGCCGGTACTGC	CTTGGTTATGCCGGTACTGC
<input type="checkbox"/> [11]	-2.49	[11]	ACCCTGGATGCTGTAGG	ACCCTGGATGCTGTAGG	ACCCTGGATGCTGTAGG	TTGGTTATGCCGGTACTGC	TTGGTTATGCCGGTACTGC	TTGGTTATGCCGGTACTGC	TTGGTTATGCCGGTACTGC	TTGGTTATGCCGGTACTGC
<input type="checkbox"/> [12]	-2.16	[12]	ACCCTGGATGCTGTAGG	ACCCTGGATGCTGTAGG	ACCCTGGATGCTGTAGG	GGTTATGCCGGTACTGCC	GGTTATGCCGGTACTGCC	GGTTATGCCGGTACTGCC	GGTTATGCCGGTACTGCC	GGTTATGCCGGTACTGCC

[outputs: 12 sets] Displayed 1 - 12. DesignId 070607120018

図 4.5 結果の一覧画面表示

ループプライマーの設計

5.1 プライマー情報ファイルのアップロード

PrimerExplorer Ver.4 の初期画面に戻って、以前保存しておいた「プライマー情報ファイル」を読み込みます。「参照」ボタンをクリックしファイルを選択してから「プライマー設計」ボタンをクリックしてください。(図5.1参照)

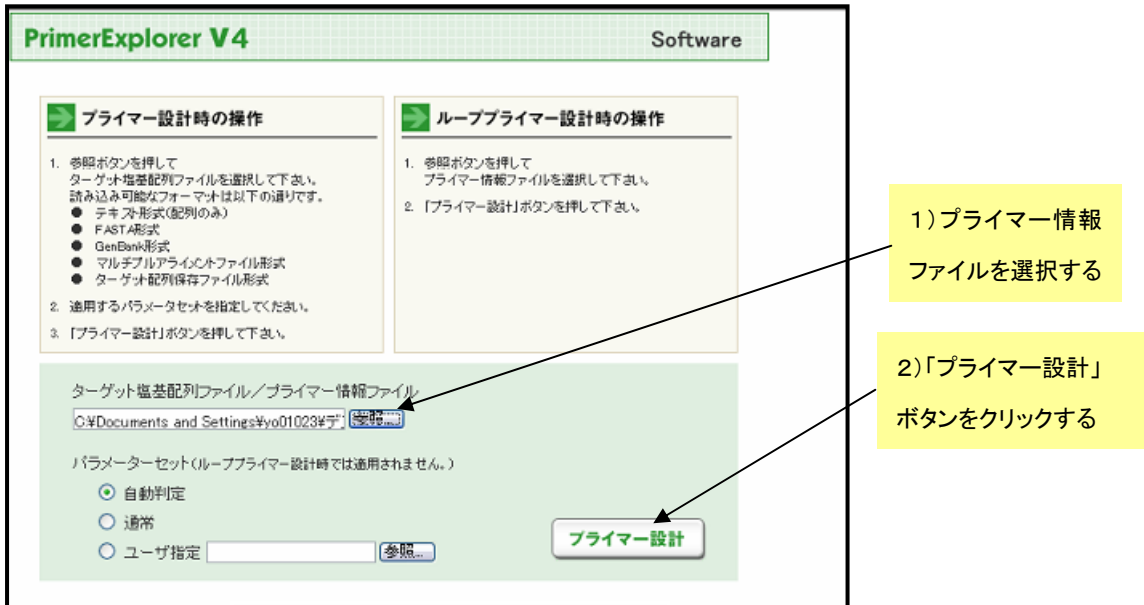


図 5.1 PrimerExplorer の初期画面

5.2 ループプライマーを設計する

プライマー情報ファイルを読み込ませると次ページの図5.2のようなループプライマー設計画面が表示されるので、パラメータをデフォルトのままの状態にして「Generate」ボタンをクリックします。

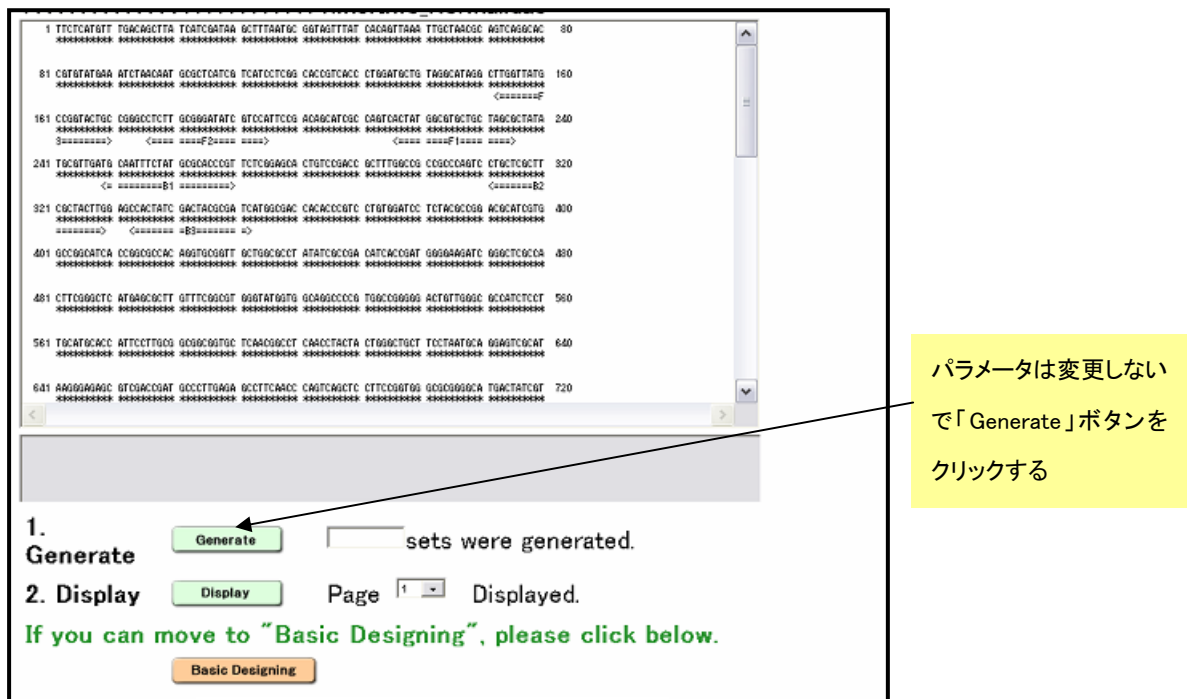


図 5.2 ループプライマー設計画面

全部で6セットのプライマーが生成されますので、続いて「Display」ボタンをクリックして結果を一覧表示させます
 (図5.3参照)

The screenshot displays a primer design interface. At the top, a 'Details' button is highlighted with a yellow box and the instruction '2) 「Details」 ボタンをクリック'. Below it, a table lists primer sets. A yellow box on the left with the instruction '1) すべてのボックスをチェックする' points to the checkboxes in the first column of the primer set table. The table shows 'Primer ID(dimer)', 'Primer ID', 'Position', 'GC Content', and 'Primer Sequence'. The primer sequences for sets 1-6 are highlighted with a red box. Annotations include 'Forward 側のループプライマー' pointing to the top primer sequence and 'Backward 側のループプライマー' pointing to the bottom primer sequence. A box at the top right indicates the '保存しておいたプライマー情報の領域' (Saved primer information area).

Primer set	Primer ID(dimer)	Primer ID	Position	GC Content	Primer Sequence								
[1]	-2.18	1301	1311	1321	1331	1341	1351	1361	1371	1381	1391	1401	gaca gaaagc gac act ccc
[2]	-2.18												gaca gaaagc gac act ccc
[3]	-2.18												gaca gaaagc gac act ccc
[4]	-1.98												aca gaaagc gac act ccc
[5]	-1.98												aca gaaagc gac act ccc
[6]	-1.98												aca gaaagc gac act ccc

図5.3 ループプライマー設計画面(設計後)

図5.3に結果が一覧表示されています。一番上に保存しておいたプライマー情報の領域が示され、その下に Target 配列、一番下にループプライマーが表示されています。この中からループプライマーのセットを選択するためにさらに詳しい情報を見ます。すべてのプライマーセットの左端にあるボックスをチェックしてから「Details」ボタンをクリックし、プライマー詳細表示画面を開きます。

5.3 ループプライマーセットの候補を絞り込む

プライマー詳細表示画面(図5.4)に、先程選択した6つのループプライマーセットの詳細情報が表示されています。

ID	dimer(minimum)dG	LF 5'pos	LF 3'pos	LF len	LF Tm	LF 5'dG	LF 3'dG	LF GCrate	LF Sequence	LB 5'pos	LB 3'pos	LB len	LB Tm	LB 5'dG	LB 3'dG	LB GCrate	LB Sequence
<input checked="" type="checkbox"/> ID:1	-2.18	1357	1376	20	62.54	-5.70	-4.74	0.60	CCCTCAGCAGCGAAAGACAG	1445	1463	19	60.07	-7.38	-4.46	0.53	GGGCGATGGTTGTTGTCAT
<input type="checkbox"/> ID:2	-2.18	1357	1376	20	62.54	-5.70	-4.74	0.60	CCCTCAGCAGCGAAAGACAG	1445	1464	20	60.75	-7.38	-4.06	0.50	GGGCGATGGTTGTTGTCATT
<input type="checkbox"/> ID:3	-2.18	1357	1376	20	62.54	-5.70	-4.74	0.60	CCCTCAGCAGCGAAAGACAG	1445	1465	21	61.91	-7.38	-4.07	0.52	GGGCGATGGTTGTTGTCATTG
<input type="checkbox"/> ID:4	-1.98	1358	1376	19	61.63	-5.70	-4.41	0.58	CCCTCAGCAGCGAAAGACA	1445	1463	19	60.07	-7.38	-4.46	0.53	GGGCGATGGTTGTTGTCAT
<input type="checkbox"/> ID:5	-1.98	1358	1376	19	61.63	-5.70	-4.41	0.58	CCCTCAGCAGCGAAAGACA	1445	1464	20	60.75	-7.38	-4.06	0.50	GGGCGATGGTTGTTGTCATT
<input type="checkbox"/> ID:6	-1.98	1358	1376	19	61.63	-5.70	-4.41	0.58	CCCTCAGCAGCGAAAGACA	1445	1465	21	61.91	-7.38	-4.07	0.52	GGGCGATGGTTGTTGTCATTG

図5.4 プライマー詳細画面表示

まず、Forward側のループプライマーについて詳しく見てみると、ID Number1、2、3が同じもの、ID Number4、5、6が同じものになっています。前半(1から3)の代表としてID Number1のループプライマーの3'末端の安定性を見てみると、-4.74となっています。後半(4から6)の代表としてID Number4のループプライマーの3'末端の安定性は-4.41となっていますので、前半の3つの方がより安定性が良いことがわかります。そこで前半の3つの中からさらに絞り込みを行います。

ID Number1、2、3についてBackward側の3'末端の安定性を見ます。ID Number1が-4.46、ID Number2が-4.06、ID Number3が-4.07で、ID Number1のループプライマーセットが最も安定です。この6つのループプライマーセットからID Number1のセットを選択します。

ID Number1のプライマーのところのボックスをチェックしてから「Confirm」ボタンをクリックします。続いて、表示されたプライマー詳細情報を確認した後にOrder画面に進んで注文をします。