

プライマ - 設計の応用例

6 野生株と変異株に対するプライマー設計

PrimerExplorer Ver.4 ではターゲット配列に変異を導入してプライマーを設計することが可能です。しかしながら変異が多すぎると設計条件が厳しくなるため、プライマーが生成されないか、バラエティーに欠けることがあります。その場合、変異の導入箇所数を減らす、或は変異を導入せずにマニュアルで設計し、ターゲット配列の変異の位置がプライマー領域のどこに相当するかを確認しながら、最適なプライマーセットを選択します。

6.1 野生株と変異株を共通プライマーで増幅検出する場合

一般的にプライマー領域には変異を含まないようにしますが、変異が非常に多い場合にはそのようなプライマーを設計できないことがあります。そのため、変異箇所を許容した(含んだ)プライマーを設計し、その際にできるだけ変異の影響を受けないようにプライマーを設計します。

LAMP 反応の原理で、FIP の F2 領域(または BIP の B2 領域)がターゲット遺伝子にアニーリングして遺伝子合成がスタートすることから、F2 (B2)領域の 3' 末端に変異が含まれると DNA ポリメラーゼがプライマーとターゲット遺伝子からなる二重鎖を認識しにくくなるため、遺伝子の増幅が阻害を受けることになります。同様に F1c (B1c)領域の 5' 末端、F3 (B3)領域の 3' 末端についても同様です。そのため、これらの領域には変異が含まれないプライマーを選択します。

逆に、F2 (B2)領域の 3' 末端、F1c (B1c)領域の 5' 末端、F3 (B3)領域の 3' 末端以外の領域に変異を含むプライマーを選択すれば、比較的に変異の影響を受けにくくなり、野生株と変異株を共通のプライマーで検出できる可能性が高くなります。

すなわち、以下の領域に変異部位を許容したプライマーを選択することになります(表 6-1)。

- a) F1c と B1c の 3' 末端及び中間領域
- b) F2 と B2 の 5' 末端及び中間領域
- c) F3 と B3 の 5' 末端及び中間領域

ここで M13 とその変異株を検出する共通のプライマーを設計してみます。図 6-1 に野生株と変異株のアライメントを示します。全長 510bp で変異は 7 箇所存在します。この変異を含む領域を増幅のターゲット領域とします。

図 6-2 にプライマー選択の例を示します。野生株をターゲットとしてデフォルトでプライマーを設計しました。ここでは、その内、変異部位を含む 25 のプライマーセット候補に注目し共通プライマーを選択します。変異部位を星印で示し、設計されたプライマーの対応する変異部位を点線で囲みました。これにより、対応する変異部位がプライマーのどこに位置するかを確認します。表 2-2 にその結果を示します。各プライマーセットのプライマー領域(F3、F2、F1、B1、B2、B3)のどの位置(5' 末端、中間領域、3' 末端)に変異が対応しているのかを黒丸印で示してあります。No1~5、No9~13、No25 が増幅時に変異の影響を受けにくいプライマーであると判断されます。これらを上記の領域に変異を許容したプライマーリストから選択し、Detail 情報を参照してプライマーセットを最終的に選択します。

6.2 特異性の高いプライマー(野生株と変異株を区別する特異的プライマー)

逆に変異株と野生株を区別したい場合には、前述とは逆の方法で行います。すなわち、下記の領域に変異があるプライマーを選択することにより特異性の高いプライマーを選択できる可能性が高くなります。プライマーがこの領域に変異を含むと、変異株は通常に増幅されるが、野生株の増幅が遅れるため変異株に対する特異性が向上することになります。

- a) F1c と B1c の 5' 末端
- b) F2 と B2 の 3' 末端

c) F3 と B3 の 3' 末端

(1)と同様に、デフォルトで設計したプライマーリストから上記のa)、b)、c)に対応するプライマーセットを選択します。表 2-2 のうち、No6~8、No14~24 が変異株に特異的なプライマーセットと判断されます。あとはこれらのプライマーセットの Detail 情報を参照してプライマーセットを最終的に選択します(表 6.2)。

表6-1 共通プライマーと特異的プライマー

	F3 領域			F2 領域			F1c 領域			B1c 領域			B2 領域			B3 領域		
	5' ¹⁾	中 ²⁾	3' ³⁾	5'	中	3'	5'	中	3'	5'	中	3'	5'	中	3'	5'	中	3'
共通プライマー ⁴⁾	●	●		●	●			●	●		●	●	●	●		●	●	
特異的プライマー ⁵⁾			●			●	●			●					●			●

1) 5'; 5'末端領域

2) 中; 中間領域

3) 3'; 3'末端領域

4) 共通プライマー; 野生株と変異株を共通のプライマーで増幅する場合に許容される変異箇所

5) 特異的プライマー; 野生株と変異株を区別する場合に変異が対応する箇所

M13_3.nuc	1:	G C A G G C A T G C A A G C T T G G C A C T G G C C G T C G T T T T A	*	C A A C G T C G T G A C T G G G A A	*	A A C C C T G	60
M13_3M1.nuc	1:	G C A G G C A T G C A A G C T T G G C A C T G G C C G T C G T T T T G		C A A C G T C G T G A C T G G G A T		A A C C C T G	60
M13_3.nuc	61:	G C G T T A C C C A A C T T A A T C G C	*	C T T G C A G C A C A T C C C C	*	C T T T C G C C A G C T G G C G T A A T A G C G	120
M13_3M1.nuc	61:	G C G T T A C C C A A C T T A A T C G A C T T G C A G C A C A T C C C G		C T T T C G C C A G C T G G C G T A A T A G C G			120
M13_3.nuc	121:	A A G A G T C C C G C A C C G A T C G C C C T T C C C A A C A G	*	T T G C G C A G C C T G A A T G G C G A A T G G C G C T			180
M13_3M1.nuc	121:	A A G A G T C C C G C A C C G A T C G C C C T T C C C A A C A C T T G C G C A G C C T G A A T G G C G A A T G G C G C T					180
M13_3.nuc	181:	T T G C C T G G T T T C C G G C A C C A G A A G C G G T G C	*	C G G A A A G C T G G C T G G A G T G C G A T C T T C C T G			240
M13_3M1.nuc	181:	T T G C C T G G T T T C C G G C A C C A G A A G C G G T G C A G G A A A G C T G G C T G G A G T G C G A T C T T C C T G					240
M13_3.nuc	241:	A G G C C G A T A C G G T C G T C G T C C C C T C A A A C T G G C A G A T G C A C G G T T A C G A T G C G C C C A T C T					300
M13_3M1.nuc	241:	A G G C C G A T A C G G T C G T C G T C C C C T C A A A C T G G C A G A T G C A C G G T T A C G A T G C G C C C A T C T					300
M13_3.nuc	301:	A C A C C A A C G T A A C C T A T C C C A T T A C G G T C A A T C C G C C G T T T G T T C C C A C G G A G A A T C C G A					360
M13_3M1.nuc	301:	A C A C C A A C G T A A C C T A T C C C A T T A C G G T C A A T C C G C C G T T T G T T C C C A C G G A G A A T C C G A					360
M13_3.nuc	361:	C G G G T T G T T A C T C G T C A C A T T T A A T G T T G A T G A A A G C T G G C T A C A G G A A G C C A G A C G C					420
M13_3M1.nuc	361:	C G G G T T G T T A C T C G T C A C A T T T A A T G T T G A T G A A A G C T G G C T A C A G G A A G C C A G A C G C					420
M13_3.nuc	421:	G A A T T A T T T T T G A T G G C G T T C C T A T T G G T T A A A A A A T G A G C T G A T T T A A C A A A A A T T T A A					480
M13_3M1.nuc	421:	G A A T T A T T T T T G A T G G C G T T C C T A T T G G T T A A A A A A T G A G C T G A T T T A A C A A A A A T T T A A					480
M13_3.nuc	481:	C G C G A A T T T T A A C A A A A T A T T A A C G T T T A C					510
M13_3M1.nuc	481:	C G C G A A T T T T A A C A A A A T A T T A A C G T T T A C					510

図 6.1 野生株と変異株のアライメント

PrimerSet List - Primer set: sorting rule [None] - Microsoft Internet Explorer

アドレス: https://biobd.net/laboratory.com/lamp3.0.0/list/300808121022.html

Primer set: sorting rule [None]

Target DNA GCAGGCATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTCAACCTGCTGACTGGGAAACCCCTGGGTTACCCAACTTAATGCTTGCAGCACATCCCCCTTTGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTCC

(Complement) cgtccgtacgttogaacogtgaocggagcaaaatgttgcagactgacocctttggggacggcaatgsgttgaattagcgaactcctstassessaaaacgctcgaaccattatcccttctccggcgtgctcascgssaae

CONSENSUS(*) *****

Primer ID d(dimer) 1 11 21 31 41 51 61 71 81 91 101 111 121 131 141

[1] -1.99 ATGCAAGCTTGGCACTGG CGTCGTTTCAACCTGCTGACTGGG sssttgaattagcgaactcgt GCCGTAATAGCGAAGAGGCC

[2] -1.99 ATGCAAGCTTGGCACTGG TTTCAACCTGCTGACTGGG gaactcctstassessaaa GCCGTAATAGCGAAGAGGCC

[3] -1.99 ATGCAAGCTTGGCACTGG TTTCAACCTGCTGACTGGG gaactcctstassessaaa GCCGTAATAGCGAAGAGGCC

[4] -1.99 ATGCAAGCTTGGCACTGG TTTCAACCTGCTGACTGGG gaactcctstassessaaa GCCGTAATAGCGAAGAGGCC

[5] -1.99 ATGCAAGCTTGGCACTGG TTTCAACCTGCTGACTGGG gaactcctstassessaaa GCCGTAATAGCGAAGAGGCC

[6] -2.27 [6] CGTCGTTTCAACCTGCTG GAAACCCCTGGGTTACCC ACTTAATGCTTGCAGCAC aagcgtcgaaccattatcg CACCGATCGCCCTCC

[7] -2.27 [7] CGTCGTTTCAACCTGCTG GAAACCCCTGGGTTACCC ACTTAATGCTTGCAGCAC aaacggtcgaaccattatcg CACCGATCGCCCTCC

[8] -2.27 [8] CGTCGTTTCAACCTGCTG GAAACCCCTGGGTTACCC ACTTAATGCTTGCAGCAC aaacggtcgaaccattatcg CACCGATCGCCCTCC

[9] -2.27 [9] TCGTGACTGGGAAACCC T ACCCACTTAATGCTTGCAGCAC cgaccscattatcgcttctcg CACCGATCGCCCTCC

[10] -2.27 [10] GAAACCCCTGGGTTACCC ACTTAATGCTTGCAGCAC gcattatcgcttctccggc ACCGATCGCCCTCC

[11] -2.27 [11] GAAACCCCTGGGTTACCC ACTTAATGCTTGCAGCAC cattatcgcttctccggc ACCGATCGCCCTCC

[12] -2.13 [12] GAAACCCCTGGGTTACCC AACTTAATGCTTGCAGCAC attatcgcttctccggcgtg

[13] -2.13 [13] GAAACCCCTGGGTTACCC AACTTAATGCTTGCAGCAC attatcgcttctccggcgtg

[14] -2.13 [14] GAAACCCCTGGGTTACCC AACTTAATGCTTGCAGCAC ttatcgcttctccggcgtg

[15] -2.13 [15] GAAACCCCTGGGTTACCC AACTTAATGCTTGCAGCAC ttatcgcttctccggcgtg

[16] -2.35 [16] TCGTGACTGGGAAACCC AATGCTTGCAGCACAT tgcctacgssaae

[17] -2.35 [17] TCGTGACTGGGAAACCC AATGCTTGCAGCACAT tgcctacgssaae

[18] -2.35 [18] TCGTGACTGGGAAACCC AATGCTTGCAGCACAT tgcctacgssaae

[19] -2.37 [19] GAAACCCCTGGGTTACCC AAGCAGCACATCCCCCTTTC GCAGCACATCCCCCTTTC tgcctacgssaae

[20] -2.37 [20] GAAACCCCTGGGTTACCC AAGCAGCACATCCCCCTTTC GCAGCACATCCCCCTTTC tgcctacgssaae

[21] -2.37 [21] ATGCTTGCAGCACATC CCAGCTGGCGTAATAGCG aase

[22] -2.37 [22] ATGCTTGCAGCACATC CAGCACATCCCCCTTTC CAGCTGGCGTAATAGCGAA

[23] -2.46 [23] ATGCTTGCAGCACATC AGCTGGCGTAATAGCGAAGA

[24] -2.46 [24] ATGCTTGCAGCACATC GCTGGCGTAATAGCGAAGA

[25] -2.37 [25] ATGCTTGCAGCACATC GCTGGCGTAATAGCGAAG

Target DNA GCAGGCATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTCAACCTGCTGACTGGGAAACCCCTGGGTTACCCAACTTAATGCTTGCAGCACATCCCCCTTTGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTCC

Primer ID d(dimer) 1 11 21 31 41 51 61 71 81 91 101 111 121 131 141

Target DNA GCAGGCATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTCAACCTGCTGACTGGGAAACCCCTGGGTTACCCAACTTAATGCTTGCAGCACATCCCCCTTTGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTCC

(Complement) cgtccgtacgttogaacogtgaocggagcaaaatgttgcagactgacocctttggggacggcaatgsgttgaattagcgaactcctstassessaaaacgctcgaaccattatcccttctccggcgtgctcascgssaae

CONSENSUS(*) *****

Primer ID d(dimer) 1 11 21 31 41 51 61 71 81 91 101 111 121 131

[1] -1.99 GCATGCAAGCTTGGCACT CGTCGTTTCAACCTGCTGACTGGG sssttgaattagcgaactcgt TTTGCCAGCTGGCGTAATAGC

[2] -1.99 ATGCAAGCTTGGCACTGG TTTCAACCTGCTGACTGGG attagcgaactcgttagg GCCGTAATAGCGAAGAGGCC

[3] -1.99 ATGCAAGCTTGGCACTGG TTTCAACCTGCTGACTGGG attagcgaactcgttagg GCCGTAATAGCGAAGAGGCC

[4] -1.99 ATGCAAGCTTGGCACTGG TTTCAACCTGCTGACTGGG attagcgaactcgttagg GCCGTAATAGCGAAGAGGCC

[5] -1.99 ATGCAAGCTTGGCACTGG TTTCAACCTGCTGACTGGG ttagcgaactcgttagg GCCGTAATAGCGAAGAGGCC

[6] -1.99 ATGCAAGCTTGGCACTGG TTTCAACCTGCTGACTGGG tagcgaactcgttagg GCCGTAATAGCGAAGAGGCC

[7] -1.99 ATGCAAGCTTGGCACTGG TTTCAACCTGCTGACTGGG tagcgaactcgttagg GCCGTAATAGCGAAGAGGCC

[8] -1.99 ATGCAAGCTTGGCACTGG TTTCAACCTGCTGACTGGG tagcgaactcgttagg GCCGTAATAGCGAAGAGGCC

[9] -2.27 [9] CGTCGTTTCAACCTGCTG GAAACCCCTGGGTTACCC aagcgtcgaaccattatcg CACCGATC

[10] -2.27 [10] CGTCGTTTCAACCTGCTG GAAACCCCTGGGTTACCC aagcgtcgaaccattatcg CACCGATC

[11] -2.27 [11] CGTCGTTTCAACCTGCTG GAAACCCCTGGGTTACCC aagcgtcgaaccattatcg CACCGATC

[12] -2.27 [12] CGTCGTTTCAACCTGCTG GAAACCCCTGGGTTACCC aagcgtcgaaccattatcg CACCGATC

[13] -2.27 [13] CGTCGTTTCAACCTGCTG GAAACCCCTGGGTTACCC aagcgtcgaaccattatcg CACCGATC

[14] -2.27 [14] TCGTGACTGGGAAACCC T ACCCACTTAATGCTTGCAGCAC cgaccscattatcgcttctcg CACCGATC

[15] -2.27 [15] GAAACCCCTGGGTTACCC ACTTAATGCTTGCAGCAC gcattatcgcttctccggc ACCGATC

[16] -2.27 [16] GAAACCCCTGGGTTACCC ACTTAATGCTTGCAGCAC cattatcgcttctccggcgtg ACCGATC

[17] -2.13 [17] GAAACCCCTGGGTTACCC AACTTAATGCTTGCAGCAC attatcgcttctccggcgtg

[18] -2.13 [18] GAAACCCCTGGGTTACCC AACTTAATGCTTGCAGCAC attatcgcttctccggcgtg

[19] -2.13 [19] GAAACCCCTGGGTTACCC AACTTAATGCTTGCAGCAC ttatcgcttctccggcgtg

[20] -2.13 [20] GAAACCCCTGGGTTACCC AACTTAATGCTTGCAGCAC ttatcgcttctccggcgtg

[21] -1.98 [21] GTCGTGACTGGGAAACCC AATGCTTGCAGCACAT fsgotag

[22] -1.98 [22] GTCGTGACTGGGAAACCC AATGCTTGCAGCACAT fsgotag

[23] -1.98 [23] GTCGTGACTGGGAAACCC AATGCTTGCAGCACAT fsgotag

[24] -2.37 [24] GAAACCCCTGGGTTACCC AAGCAGCACATCCCCCTTTC fsgotag

[25] -2.37 [25] GAAACCCCTGGGTTACCC AAGCAGCACATCCCCCTTTC fsgotag

Target DNA GCAGGCATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTCAACCTGCTGACTGGGAAACCCCTGGGTTACCCAACTTAATGCTTGCAGCACATCCCCCTTTGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTCC

Primer ID d(dimer) 1 11 21 31 41 51 61 71 81 91 101 111 121 131

図 6.2 プライマーセットと変異部位

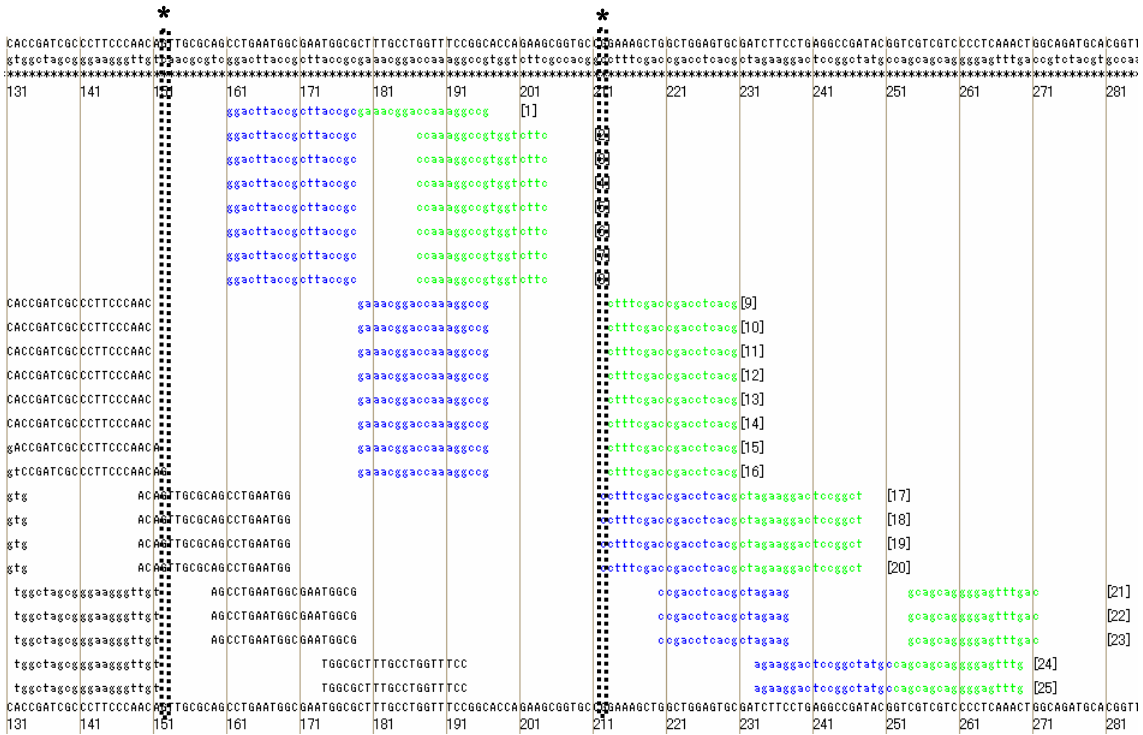


図 6.2 続き

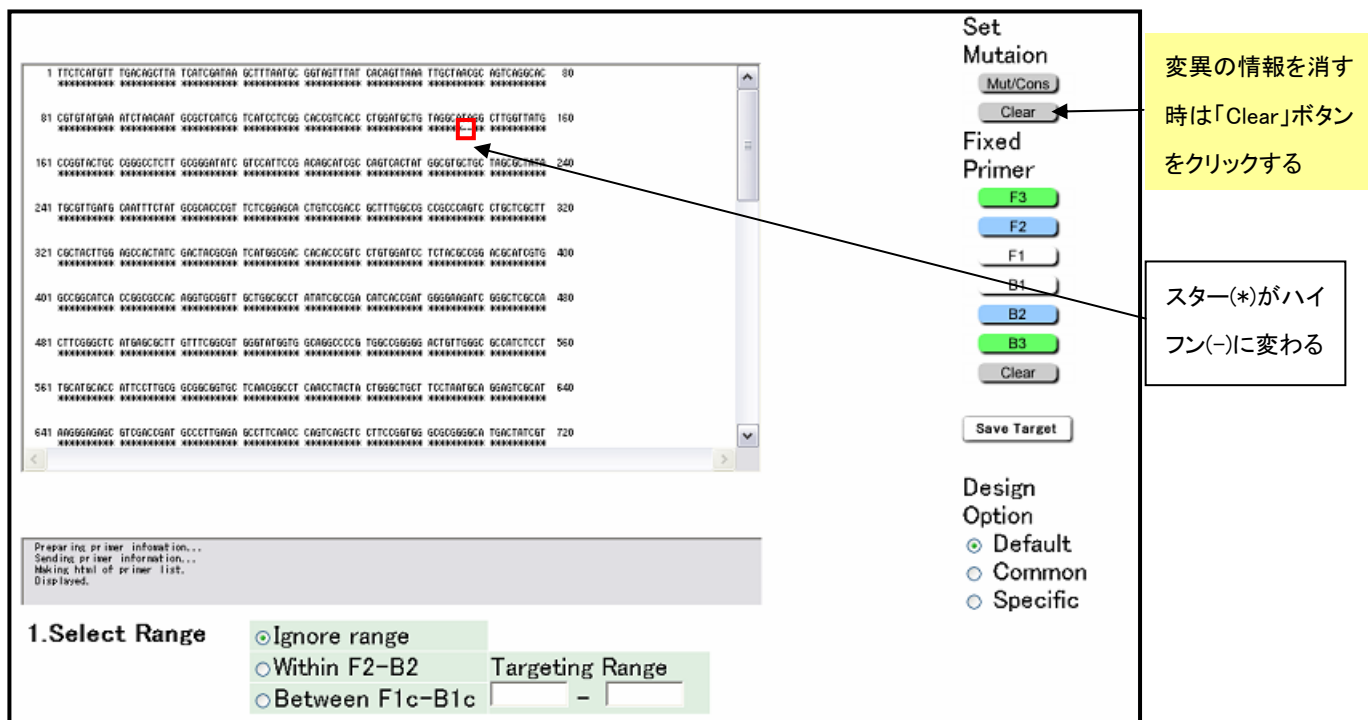
表 6.2 プライマーセットの変異部位対応する位置

No	F3領域			F2領域			F1領域			E1領域			E2領域			E3領域			判定
	5'末端	中間	3'末端	5'末端	中間	3'末端	5'末端	中間	3'末端	5'末端	中間	3'末端	5'末端	中間	3'末端	5'末端	中間	3'末端	
1																			共通*
2				●		●													共通
3				●															共通
4				●															共通
5				●															共通
6						●		●											特異的**
7						●		●											特異的
8						●		●											特異的
9			●		●														共通
10			●		●														共通
11			●		●														共通
12			●		●														共通
13			●		●														共通
14						●		●											特異的
15	●				●			●											特異的
16					●														特異的
17					●														特異的
18					●														特異的
19					●														特異的
20					●														特異的
21					●														特異的
22					●														特異的
23					●														特異的
24	●					●													特異的
25	●				●														共通

*共通; 野生株と変異株を共通のプライマーで増幅するプライマーセット候補

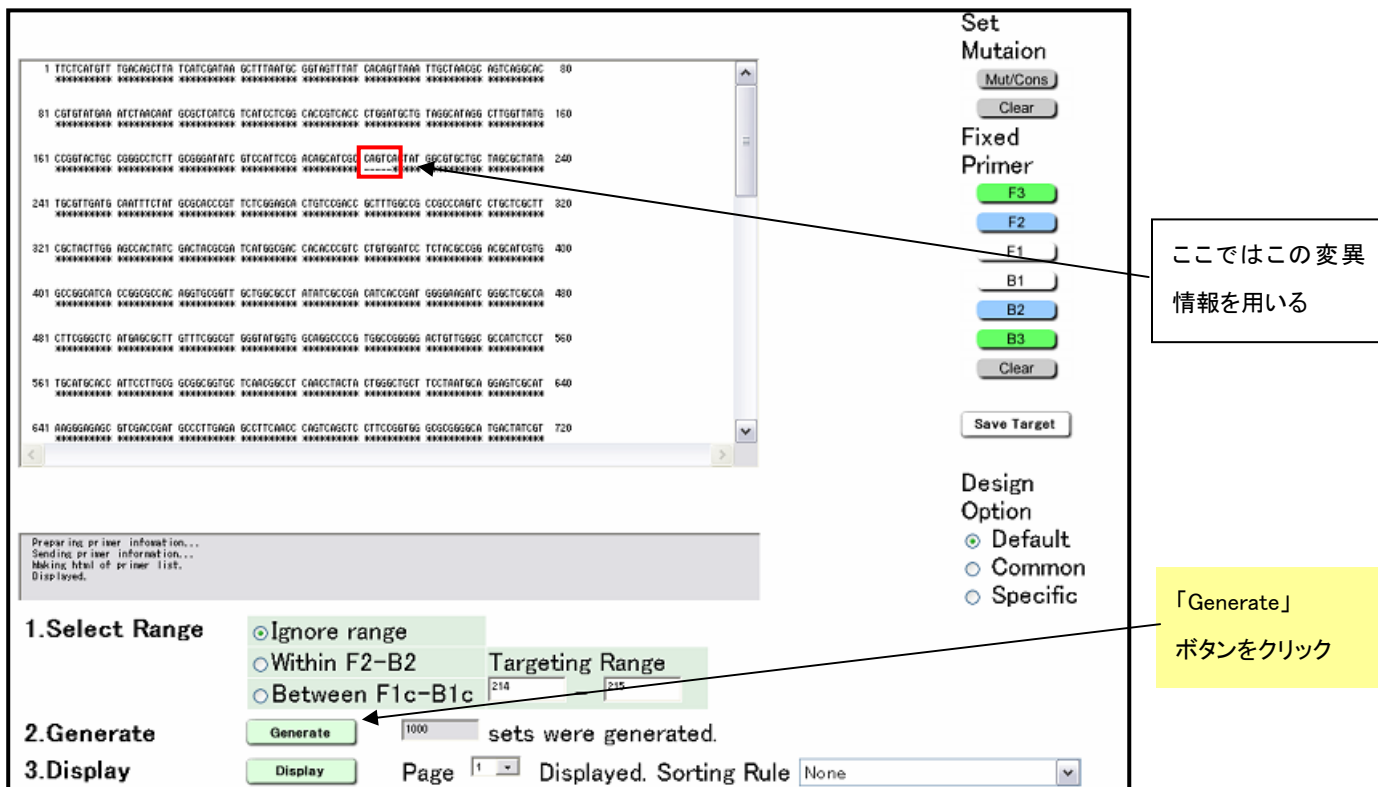
**特異的; 変異株を野生株から区別するプライマーセット候補

図 7.2 変異部位を入力した後の画面



続いてもう一度(今度は別の)変異部位を指定します。ここでは変異部位を再入力した変異情報(図 7.3 参照)をもとにプライマー設計を行います。これにより、変異を避けるようにプライマーセットが設計されます(図 7.3、7.4)。

図 7.3 再度変異部位を入力した後の画面



全部で 1000 セットのプライマーが設計されました。

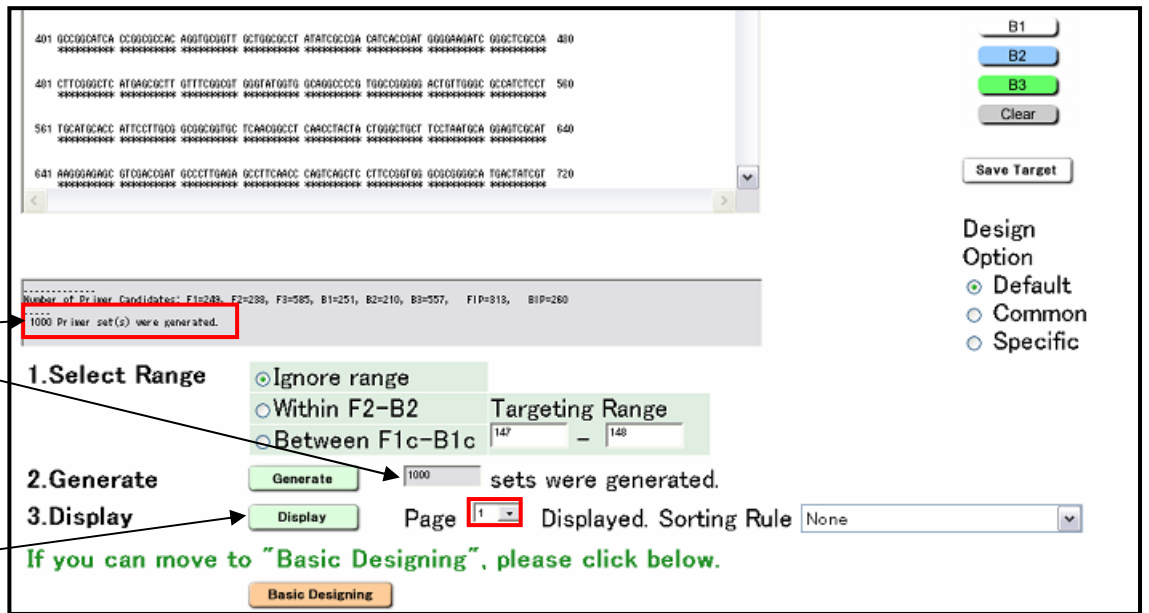


図 7. 4 設計後の画面

次に「Display」ボタンをクリックして結果を表示させます。図 7. 5に示すように、プライマー領域に変異が全く含まれないプライマーが設計されます。ちなみに図 7. 6は変異を導入せずにプライマー設計した場合の結果です。

<参考>
 変異を導入した場合のプライマー設計の順序は、まず初めに F1、F2、F3、B1、B2、B3 の各プライマー領域を設計した後で、変異が含まれる領域を含むプライマー領域候補を除き、残ったプライマー領域を組み合わせることでプライマーセットを設計しています。

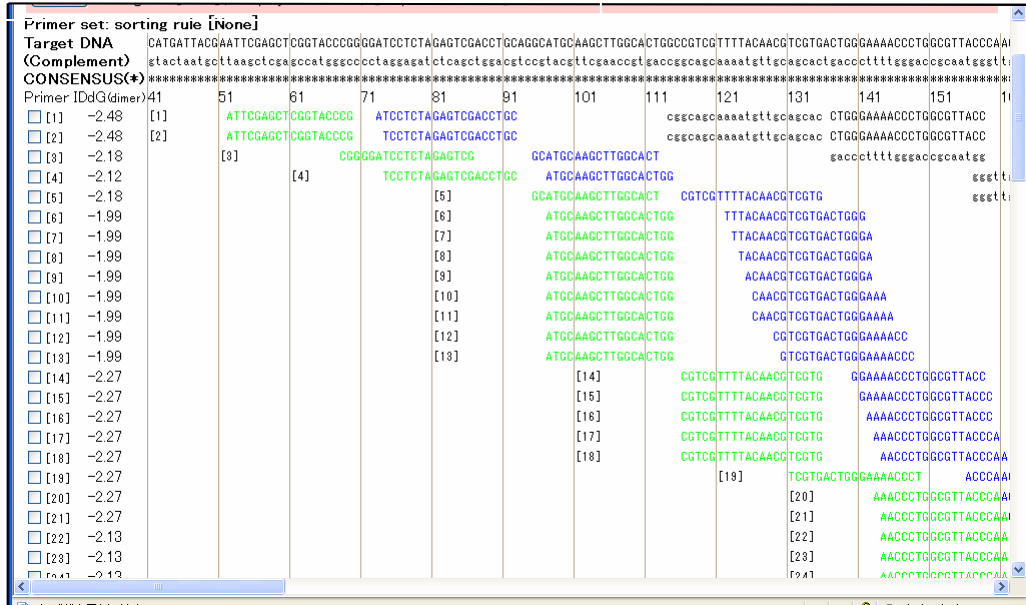
図 7. 5 結果の一覧表示画面(1 ページ目)

Primer ID	dG(dimer)	Primer Sequence
[1]	-2.36	ATTTCGAGCTCGGTACCCG
[2]	-2.36	ATTTCGAGCTCGGTACCCG
[3]	-2.12	ATCCTCTAGAGTCGACCTGC
[4]	-2.18	TCCTCTAGAGTCGACCTGC
[5]	-2.27	ATGCAAGCTTGGCACTGG
[6]	-2.37	CGTCGTTTTACAACGTCGTG
[7]	-2.37	CGTCGTTTTACAACGTCGTG
[8]	-2.46	CGTCGTTTTACAACGTCGTG
[9]	-2.46	CGTCGTTTTACAACGTCGTG
[10]	-2.37	CGTCGTTTTACAACGTCGTG
[11]	-2.46	CGTCGTTTTACAACGTCGTG
[12]	-2.24	CGTCGTTTTACAACGTCGTG
[13]	-2.24	CGTCGTTTTACAACGTCGTG
[14]	-2.24	CGTCGTTTTACAACGTCGTG
[15]	-2.04	CGTCGTTTTACAACGTCGTG
[16]	-2.34	CGTCGTTTTACAACGTCGTG
[17]	-1.91	CGTCGTTTTACAACGTCGTG
[18]	-1.67	CGTCGTTTTACAACGTCGTG
[19]	-1.67	CGTCGTTTTACAACGTCGTG
[20]	-2.46	CGTCGTTTTACAACGTCGTG

この部分に変異がある

この部分 avoid するようにしてプライマーセットが生成される

図 7. 6 変異を導入しない場合の設計プライマーセット



7. 3 各プライマー領域の 5' 末端、3' 末端部位に変異を含むプライマー設計をする

ここでは、各プライマー領域の 5' 末端、3' 末端部位に変異を含むプライマーを設計します。

例えば、前節のようにTarget配列の 141bp 付近に変異を導入した場合、この領域を含んで遺伝子を増幅するプライマーセットの候補数が極端に減ります。変異を含んだ領域を増幅する場合、変異部位はできればプライマー領域に含まれない方が良いのですが、そのような厳しい条件では生成プライマーが極端に少なく、あるいは全くプライマーセットができない場合があります。一方、変異を導入しない場合には、図 7. 6に示したように変異点に対応する部位を含んだ領域をもつたくさんのプライマーセット候補が設計されます。そこでプライマー領域に変異を含むことを許容することにより設計条件を緩めてバラエティーに富む多くのプライマー候補を生成させます。そして、出来るだけ変異が増幅に影響を及ぼさないプライマーを選びます。

PrimerExplorer Ver.4 では変異が含まれる領域を選択することができます。選択できる領域は F3、B3、F2、B2、F1c、B1c 領域の 5' 末端、3' 末端及びその中間領域です。F3、B3、F2、B2 領域の 5' 末端や F1c、B1c 領域の 3' 末端あるいはこれらの領域の 5' 末端と 3' 末端の中間領域は、増幅の起点にならないため変異の影響を比較的受けません。どうしてもプライマーが設計できない場合にはこれらの位置に変異が含まれることを許容してプライマーの設計を行います。

まず、変異部位がプライマー領域の 5' 末端に含まれるような設計をします。図 7. 7のように、プライマー設計画面で F3 領域 5' 末端のボックスをチェックしてから「Generate」ボタンをクリックすると、5' 末端に変異が含まれるようなプライマーが設計されます。

図 7.7 プライマー設計画面

図 7.3 と同じ変異情報を用いる

2) 「Generate」ボタンをクリック

3) プライマーが設計された後「Display」ボタンをクリックする

1) 「F3 5' term」のボックスをチェックする

Set Mutation
Mut/Cons
Clear

Fixed Primer
F3
F2
F1
B1
B2
B3
Clear
Save Target

Design Option
Default
Common
Specific

1. Select Range
 Ignore range
 Within F2-B2
 Between F1c-B1c
 Targeting Range 107 - 143

2. Generate
Generate 5000 sets were generated.

3. Display
Display Page 1 Displayed. Sorting Rule None

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

Parameter Condition
Normal Save Parameter Reset Parameter

Length
 F1c/B1c 20 - 22
 F2/B2 18 - 20
 F3/B3 18 - 20

Tm
 F1c/B1c 64 - 66
 F2/B2 59 - 61
 F3/B3 59 - 61

GC rate(%) 40 - 65

dG threshold [Kcal/mol]
 5' stability -3
 3' stability -4
 dimer check -2.5

Distances
 (F2-B2) 120 - 180
 Loop(F1c-F2) 40 - 60
 F2-F3 0 - 20
 F1c-B1c 0 - 100

Limitations
 F1c/B1c 3
 F2/B2 10
 F3/B3 3
 Sets 1000

Mutation/Consensus Peculiarity Permission
 high level
 F1c 5'term B1c 5'term
 F2 3'term B2 3'term
 F3 3'term B3 3'term
 F1c inner B1c inner
 F2 inner B2 inner
 F3 inner B3 inner
 F1c 3'term B1c 3'term
 F2 5'term B2 5'term
 F3 5'term B3 5'term
 low level

Reset Parameter

プライマーが設計されたら、続いて「Display」ボタンをクリックして結果を表示させます。

図 7. 8 の一覧表示画面を見ると、プライマー内に変異を含む部分が赤く表示されています。F3 プライマー領域の 5' 末端に変異を含むような設定をしましたので、今回は F3 領域の 5' 末端に変異が含まれるような設計がされます。

<参考>

変異を含む領域を指定した場合の設計順序は、変異が含まれる指定した領域(例えば F3 5' 末端)を含むプライマー領域はフィルターで除かれず、残った領域とともに組み合されてプライマーセットが設計されます。

図 7. 8 結果の一覧表示画面(1 ページ目)

mer set: sorting rule [None]
rget DNA CATGATTACGAATTCCGAGCTCCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGAAAACCCCTGGCGTTACCCAACTTAA
omplement) ctactaatgcttaagctcagcagccatgsgccctaggaagatctcagctggagctcagctacgttcgaaccgtgaccgscagcaaaatgttcagcagcactgacctttt gggaccsccaatgsgttgaatt
NSSENSUS(*) *****
mer ID(dimer) 41 51 61 71 81 91 101 111 121 131 141 151 161
[1] -2.36 [1] ATTCGAGCTCCGGTACCCG ATCCTCTAGAGTCGACCTGC cggcagcaaaatgttcagcagc gsgttgaatt
[2] -2.36 [2] ATTCGAGCTCCGGTACCCG TCCTCTAGAGTCGACCTGC cggcagcaaaatgttcagcagc gsgttgaatt
[3] -2.12 [3] TCCTCTAGAGTCGACCTGC ATGCAAGCTTGGCACTGG gsgttgaatt
[4] -2.18 [4] GCATGCAAGCTTGGCACT CGTCGTTTTACAACGTCGTG gsgttgaatt
[5] -2.27 [5] CGTCGTTTTACAACGTCGTG ACCCAACTTAA
[6] -2.27 [6] ACCCTGGCGTTACCCAACTTAA
[7] -2.27 [7] ACCCTGGCGTTACCCAACTTAA
[8] -2.13 [8] ACCCTGGCGTTACCCAA TTA
[9] -2.13 [9] ACCCTGGCGTTACCCAA TTA
[10] -2.13 [10] ACCCTGGCGTTACCCAA TA
[11] -1.56 [11] ACCCTGGCGTTACCCAA TA
[12] -2.21 [12] ACCCTGGCGTTACCCA AA
[13] -2.21 [13] ACCCTGGCGTTACCCA AA
[14] -2.21 [14] ACCCTGGCGTTACCCA A
[15] -2.37 [15] ACCCTGGCGTTACCCA
[16] -2.46 [16] ACCCTGGCGTTACCCA
[17] -2.37 [17] A
[18] -2.37 [18] A
[19] -2.46 [19] A
[20] -2.46 [20] A
[21] -2.37 [21] A
[22] -2.46 [22] A
[23] -2.24 [23] A
[24] -2.24 [24] A

F3 領域の 5' 側に変異を含んだプライマーが設計される

変異を含む部分を赤く表示している

また、変異が含まれる領域を複数同時に選択することも可能です。ここでは F3 領域と F2 領域の 5' 末端に変異を許容します。

図 7. 9 のようにプライマー設計画面で F3 5' 末端及び F2 5' 末端のボックスをチェックしてから「Generate」ボタンをクリックします。そして、プライマーが設計された後に「Display」ボタンをクリックして結果を表示させます。

F3 5' 末端または F2 5' 末端に変異があるプライマーが設計されます。(図 7. 10 参照)

図 7.9 プライマー設計画面

Distances	(F2-B2)	120	-	180	
	Loop(F1c-F2)	40	-	60	
	F2-F3	0	-	20	
	F1c-B1c	0	-	100	
Limitations	F1c/B1c	3			
	F2/B2	10			
	F3/B3	3			
	Sets	1000			
Mutation/Consensus	Peculiarity	high level	Permission		
		↑	F1c 5'term	<input type="checkbox"/>	B1c 5'term
		F2 3'term	<input type="checkbox"/>	B2 3'term	<input type="checkbox"/>
		F3 3'term	<input type="checkbox"/>	B3 3'term	<input type="checkbox"/>
		F1c inner	<input type="checkbox"/>	B1c inner	<input type="checkbox"/>
		F2 inner	<input type="checkbox"/>	B2 inner	<input type="checkbox"/>
		F3 inner	<input type="checkbox"/>	B3 inner	<input type="checkbox"/>
		F1c 3'term	<input type="checkbox"/>	B1c 3'term	<input type="checkbox"/>
		F2 5'term	<input checked="" type="checkbox"/>	B2 5'term	<input type="checkbox"/>
		low level	F3 5'term	<input checked="" type="checkbox"/>	B3 5'term
				<input type="checkbox"/>	

Reset Parameter

1)「F2 5'term」のボックスをチェックする

2)「F3 5'term」のボックスをチェックする

図 7.10 結果の一覧表示画面(1ページ目)

Target DNA	CATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGC	AAGCTTGGCACTGGCCCTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGAAAAACCCCTGCCGTTACCCA	ACT										
(Complement)	gtactaatgccttaagctcgagccatggccocctaggagatctcagotgzaicgtcgtacgt	togaacogtgaccggcagcaaaatgttcagcactgacccttttggacgcgaatgsgt	tga										
CONSENSUS(*)	*****												
Primer ID(dimer)	41	51	61	71	81	91	101	111	121	131	141	151	161
[1]	-2.36	[1]	ATTCGAGCTCGGTACCCG	ATCCTCTAGAGTCGACCTGC					cggcagcaaaatgttcagc				
[2]	-2.36	[2]	ATTCGAGCTCGGTACCCG	TCCTCTAGAGTCGACCTGC					cggcagcaaaatgttcagc				
[3]	-2.12			TCCTCTAGAGTCGACCTGC			ATGCAAGCTTGGCACTGG					gssstga	
[4]	-2.18						GCATGCAAGCTTGGCACT	CGTCGTTTTACAACGTCGTG				gssstga	
[5]	-2.27							CGTCGTTTTACAACGTCGTG			ACCCTGGCGTTACCC		
[6]	-2.27							CGTCGTTTTACAACGTCGTG			ACCCTGGCGTTACCC		
[7]	-2.27							CGTCGTTTTACAACGTCGTG			ACCCTGGCGTTACCC		
[8]	-2.27							CGTCGTTTTACAACGTCGTG			ACCCTGGCGTTACCCA		
[9]	-2.27							CGTCGTTTTACAACGTCGTG			ACCCTGGCGTTACCCAA		
[10]	-2.27											ACCCA	ACT
[11]	-2.27											ACCCTGGCGTTACCCA	ACT
[12]	-2.27											ACCCTGGCGTTACCCA	ACT
[13]	-2.13											ACCCTGGCGTTACCCAA	T
[14]	-2.13											ACCCTGGCGTTACCCAA	T
[15]	-2.13											ACCCTGGCGTTACCCAA	
[16]	-1.56											ACCCTGGCGTTACCCAA	
[17]	-2.21											ACCCTGGCGTTACCCAA	
[18]	-2.21											ACCCTGGCGTTACCCAA	
[19]	-2.21											ACCCTGGCGTTACCCAA	
[20]	-2.37											ACCCTGGCGTTACCCAA	
[21]	-2.46											ACCCTGGCGTTACCCAA	
[22]	-2.37											ACCCTGGCGTTACCCAA	
[23]	-2.27											ACCCTGGCGTTACCCAA	

F3領域またはF2領域の5'側に変異を含んだプライマーが設計される

つぎに、プライマー領域の 3' 末端に変異部位が含まれるような設計を行います。図 7. 11 のようにプライマー設計画面で 3' 末端のところのボックスをチェックしてから「Generate」ボタンをクリックします。そして、プライマーが設計された後に「Display」ボタンをクリックして結果を表示させます。

F2、F3、B2、B3 領域の 3' 末端あるいは F1c と B1c 領域の 5' 末端に変異が導入されるとプライマーの野生株に対する特異性は低くなり、相対的に変異株に対する特異性が高くなります。これらの領域はアニーリング時に遺伝子の増幅起点として働くため、領域に変異をもった遺伝子が特異的に増幅されることとなります。この性質を利用して特異性の高いプライマーを選択することも可能です。

図 7. 11 プライマー設計画面

Distances	(F2-B2)	120	-	100		
	Loop(F1c-F2)	40	-	60		
	F2-F3	0	-	20		
	F1c-B1c	0	-	100		
Limitations	F1c/B1c	3				
	F2/B2	10				
	F3/B3	3				
	Sets	1000				
Mutation/Consensus	Peculiarity	Permission				
		high level	F1c 5'term	<input type="checkbox"/>	B1c 5'term	<input type="checkbox"/>
			F2 3'term	<input checked="" type="checkbox"/>	B2 3'term	<input type="checkbox"/>
			F3 3'term	<input type="checkbox"/>	B3 3'term	<input type="checkbox"/>
			F1c inner	<input type="checkbox"/>	B1c inner	<input type="checkbox"/>
			F2 inner	<input type="checkbox"/>	B2 inner	<input type="checkbox"/>
			F3 inner	<input type="checkbox"/>	B3 inner	<input type="checkbox"/>
			F1c 3'term	<input type="checkbox"/>	B1c 3'term	<input type="checkbox"/>
			F2 5'term	<input type="checkbox"/>	B2 5'term	<input type="checkbox"/>
			F3 5'term	<input type="checkbox"/>	B3 5'term	<input type="checkbox"/>
			low level			
		Reset Parameter				

1) 「F2 3'term」の
ボックスをチェックする

プライマー領域の 3' 末端に変異が含まれるような設定をしましたので、今回は F2 領域の 3' 末端に変異が含まれるような設計がされています。(図 7. 12 参照)

図 7.12 結果の一覧表示画面(1 ページ目)

F2 領域の 3' 側に
変異が含まれる

Primer ID	G(dimer)	41	51	61	71	81	91	101	111	121	131	141	151	161
[1]	-2.36	[1]	ATTCGAGCT	CGGTACCCG	ATCCTCTA	GAGTCGACCT	GCAGGCATGC	AAGCTTGGCA	CTGGCCGTCG	TTTTACAACG	TCGTGACTG			
[2]	-2.36	[2]	ATTCGAGCT	CGGTACCCG	TCCTCTA	GAGTCGACCTGC				CGGCAGCAAAATGTC	AGCAGCAC			
[3]	-2.12			[3]	TCCTCTA	GAGTCGACCTGC								
[4]	-2.18					[4]		GCATGCAAGCTTGGCACTGG	CGTCG	TTTTACAACG	TCGTG			
[5]	-1.99					[5]		ATGCAAGCTTGGCACTGG		TTTACAACG	TCGTGACTGG			
[6]	-1.99					[6]		ATGCAAGCTTGGCACTGG		TTACAACG	TCGTGACTGG			
[7]	-1.99					[7]		ATGCAAGCTTGGCACTGG		TACAACG	TCGTGACTGG			
[8]	-1.99					[8]		ATGCAAGCTTGGCACTGG		ACAACG	TCGTGACTGG			
[8]	-1.99					[8]		ATGCAAGCTTGGCACTGG		CAACG	TCGTGACTGG			
[10]	-1.99					[10]		ATGCAAGCTTGGCACTGG		CAACG	TCGTGACTGG			
[11]	-2.27						[11]		CGTCG	TTTTACAACG	TCGTG			
[12]	-2.37												[12]	ACCCAA
[13]	-2.37													
[14]	-2.46												[14]	
[15]	-2.46												[15]	
[16]	-2.37												[16]	
[17]	-2.46												[17]	
[18]	-2.24													

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(p.11~13 参照)でプライマーセットを選択します。

8. マルチアライメント結果を使った共通プライマーの設計

8.1 マルチアライメント結果の読み込み

通常の遺伝子配列のとときと同様の方法でアライメント結果をインプットすると、最上段遺伝子を基準にして共通配列と変異箇所が表示されます。アライメントは、Genetyx や Clustral W 等のソフトで行ってください。ここでは、SeqA、B、C の3つの遺伝子を使用した例で説明します。図 8.1 は Genetyx を使用して、SeqA、B、C のアライメントをとった例です。この結果ファイルを PrimerExplorer Ver.4 で読み取り、プライマー設計ボタンを押します。すると、下図に示すように SeqA をもとにして、共通配列(*)と変異箇所(—)とが表示されます。この結果を使ってプライマーを設計します(図 8.2)。

```

SeqA      AATGCTACTACTATTAGTAGAATTGATGCCACCTTTTCAGCTCGCGCCCCAAATGAAAAT 60
SeqB      -----AATTGATGCCACCTTTTCAGCTTCGCGTCCAAATGAACAT 40
SeqC      -----CTCGCGCCCCACTTGAAAAT 20
          ** **** ** *
SeqA      ATAGCTAAACAGGTTATTGACCATTGCGAAATGTATCTAATGGTCAAACCTAACTACT 120
SeqB      ATAGCTACACAGCTTATTGACCATTGCGAAATGTATCTAATGGTCAAACCTAACTACT 100
SeqC      ATCGCTAAACAGGTCGTTGACCATATGCGAAGTGTATCTAATGGTCAAACCTAACTACT 80
          ** **** ** * ***** ** *
SeqA      CGTTGCGAGAATTGGGAATCAACTGTTACATGGAATGAACTCCAGACCGGTACTTTA 180
SeqB      CGATGCGAGAATCGGAAATCAACTGTTACATGGAATGAACTCCAGACCGGTACTTTA 160
SeqC      CGTTGGAAGAATTGGCAATCAACTGTAACATGAACTGCGACACCGGTACTTTA 140
          ** ** * ***** ** *
SeqA      GTTGCATATTTAAACATGTTGAGCTACAGCACCAGATTCAGCAATTAAGCTCTAAGCCA 240
SeqB      GTTGCATATGTAACCATGTTGAGCTACAGCAGAGTTTCAGCAATTAAGCTCTAAGCCA 220
SeqC      GTTGCATATTTAAATCATGTTGAGCTACAGCAACAGATTCAGCAGTAAGCTCTAAGCCA 200
          ** **** ** * ***** ** *
SeqA      TCGCAAAAATGACCTCTTATCAAAAGGAGCAATTAAGGTACTCTCTAATCCTGACCTG 300
SeqB      TCGCAAAAATGACCTCTTATCAAAAGGAGCAATTAAGGTACTCTCTAATCCTGACCTG 280
SeqC      TCGCAAACTGTGACCTCTTAAACAAAAGGAGCAATTAAGGTACTCTCTAATCCTGACATG 260
          ***** ** *
SeqA      TTGGAGTTTGCTTCGGTCTGGTTCGCTTTGAAGCTCGAATTAACACGCGATATTTGAAG 360
SeqB      TTGGAGTTTGCTTCGGTCTGGTTCGCTTTGAAGCTCGAATTAACACGCGATATTTGAAG 340
SeqC      TCGGAGTTAGCTTCGGTCTGGTTCGCTTTGAAGCTCGAATTAACACGCGATAGTTGATG 320
          * ***** ** *
SeqA      TCTTCGGGCTTCTCTTAATCTTTTGTGCAATCCGCTTTGCTTCTGACTATAATAGT 420
SeqB      TCTTCGGGCTTCTCTTAATCTTTTGTGCAATCCGCTTTGCTTCTGACTATAATAGT 400
SeqC      CCTTTCAGGCTTCTCTGAATCTTTTGTGCAATCCGCTTTGCTTCTGACTATAATAGT 380
          ***** ** *
SeqA      CAGGGTAAAGACCTGATTTTGTATTTATGGTCATTCTCGTTTTCTGAAGTGTAAAGCA 480
SeqB      CAGGGTAAAGACCTGATTTTGTATTTATGGTCATTCTCGTTTTCTGAAGTGTAAAGCA 460
SeqC      CACGGTAAAGACCTGATTTATGATTTATGGTCATTCTCGTTTTCTGAAGTGTAAAGCA 440
          ** ***** ** *
SeqA      TTTGAGGGGATTCA 495
SeqB      TTTGAGGC----- 468
SeqC      TTAGAGGG----- 448
          ** ****
    
```

図 8.1 マルチアライメント

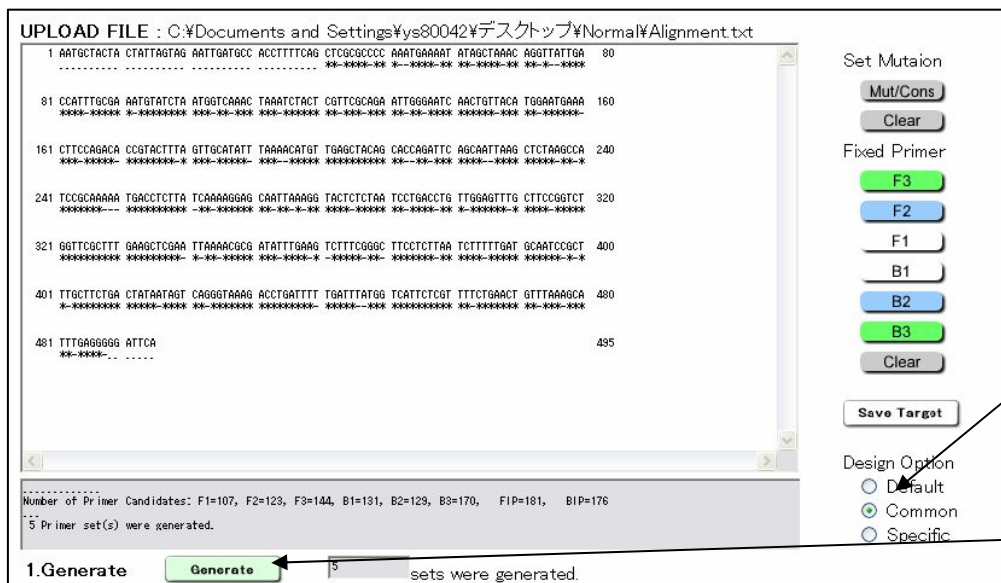


図 8.2 マルチアライメント読み込み画面

8.2 共通プライマーの設計

“Common” ボタンをチェックして、“Generate” ボタンを押します。すると通常は 5 つの表通プライマーが設計されます。これらは、図 8.3 に示すように F3、F2、B3、B2 の 5' 末端や中間領域、または F1c や B1c の 3' 末端や中間領域に変異が含まれることを許容してプライマーセットが生成されます。これらのプライマーは増幅の開始基点以外に変異が認識されるので、比較的変異の影響を受けにくいと予想されます。図 8.4 にプライマーセットの詳細情報を示します。

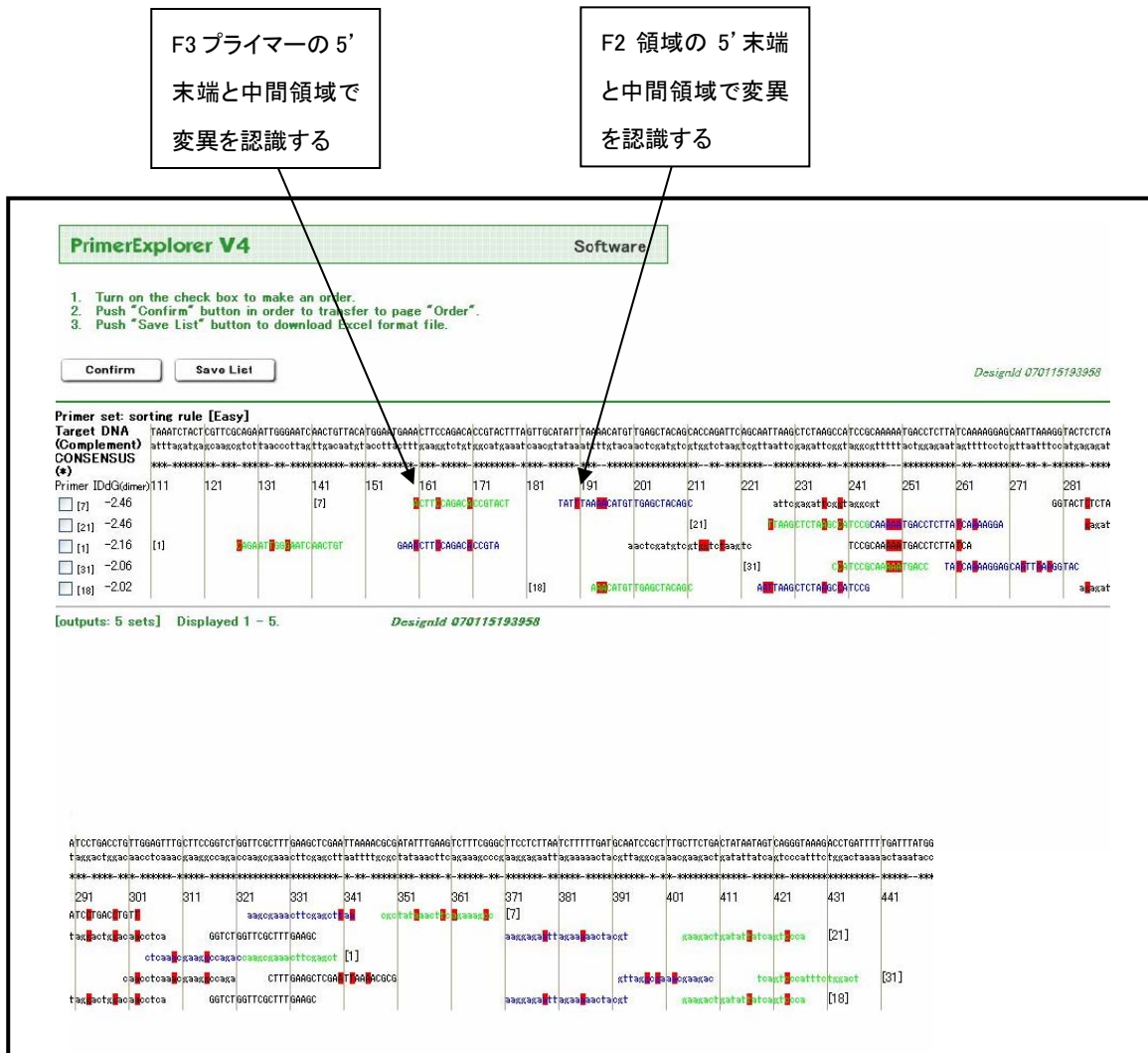


図 8.3 設計結果一覧画面

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.

Order
DesignId 070115193958

Primer Information

1 ID:7 dimer(minimum)dG=-2.46

label	5'pos	3'pos	len	Tm	5'dG	3'dG	GCrate	Sequence
F3	160	177	18	56.40	-4.85	-4.90	0.50	CTTTCAGACCCTGACT
B3	348	368	21	56.71	-5.30	-5.16	0.43	CGAAGGCTTCAAATATCGC
FIP			45					TGCGGATTCCTAGAGCTTA-TATTAACATGTTGAGCTACAGC

Primer Information

2 ID:21 dimer(minimum)dG=-2.46

label	5'pos	3'pos	len	Tm	5'dG	3'dG	GCrate	Sequence
F3	226	244	19	55.93	-4.09	-5.68	0.47	TAGGCTCTATGCTCCG
B3	404	426	23	56.19	-5.84	-4.35	0.39	ACCTGACTATATAGTCAGAAG
FIP			48					ACTCCACAATCAATTAGAA-CAAATGACCTCTTACAAGGA
BIP			43					GGTCTGGTTCGCTTTGAGC-TGCATCAAAGATTAGAGGAA
F2	245	269	25	57.71	-3.44	-4.36	0.32	CAATGACCTCTTACAAGGA
F1c	285	307	23	61.09	-5.25	-3.43	0.48	ACTCCACAATCAATTAGAA
B2	371	393	23	56.24	-5.31	-4.71	0.30	TGCATCAAAGATTAGAGGAA
B1c	316	335	20	61.20	-5.35	-5.26	0.55	GGTCTGGTTCGCTTTGAGC

Primer Information

3 ID:1 dimer(minimum)dG=-2.16

label	5'pos	3'pos	len	Tm	5'dG	3'dG	GCrate	Sequence
F3	127	146	20	55.09	-3.90	-4.55	0.40	CGAATGGATCACTGT

Primer Information

4 ID:31 dimer(minimum)dG=-2.06

label	5'pos	3'pos	len	Tm	5'dG	3'dG	GCrate	Sequence
F3	238	255	18	55.83	-5.35	-4.90	0.50	ATCCGCAATGACC
B3	418	436	19	56.41	-5.25	-4.74	0.47	TCAGGCTTTACCCTGACT
FIP			46					AGACCAGGCRACTCCAC-TAACAAGGAGCAATTGAGTAC
BIP			42					CTTTGAGGCTCGAATTAACGCGC-CAGAAGCAATGATTG
F2	259	283	25	57.29	-3.15	-4.57	0.32	TACAAGGAGCAATTGAGTAC
F1c	300	320	21	62.52	-6.02	-5.02	0.52	AGACCAGGCRACTCCAC
B2	392	409	18	55.79	-4.35	-4.51	0.50	CAGAAGCAATGATTG
B1c	327	350	24	61.21	-4.02	-7.01	0.42	CTTTGAGGCTCGAATTAACGCGC

Primer Information

5 ID:18 dimer(minimum)dG=-2.02

label	5'pos	3'pos	len	Tm	5'dG	3'dG	GCrate	Sequence
F3	193	211	19	55.05	-3.71	-4.98	0.42	ATGTTGAGCTACAGC
B3	404	426	23	56.19	-5.84	-4.35	0.39	ACCTGACTATATAGTCAGAAG
FIP			45					ACTCCACAATCAATTAGAA-AATGACCTCTTACAATCCG
BIP			43					GGTCTGGTTCGCTTTGAGC-TGCATCAAAGATTAGAGGAA
F2	224	244	21	57.44	-2.40	-5.68	0.43	ATGAGCTCTATGCTCCG
F1c	284	307	24	62.53	-5.25	-3.68	0.46	ACTCCACAATCAATTAGAA
B2	371	393	23	56.24	-5.31	-4.71	0.30	TGCATCAAAGATTAGAGGAA
B1c	316	335	20	61.20	-5.35	-5.26	0.55	GGTCTGGTTCGCTTTGAGC

図 8.4 プライマー詳細情報画面

52

9. 特異的プライマーの設計

9.1 イージーモードでの設計

図 9.1 で画面右下の”Specific”というボタンをチェックして、”Generate”ボタンを押します。自動的に特異的プライマーセットが設計されます。

1. Generate 5 sets were generated.

2. Display

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

Design Option

Default

Common

Specific

1) 「Specific」ボタンをクリック

2) 「Generate」ボタンをクリック

図 9.1 プライマー設計画面

PrimerExplorer V4 Software

1. Turn on the check box to make an order.
2. Push "Confirm" button in order to transfer to page "Order".
3. Push "Save List" button to download Excel format file.

DesignId: 070116123343

Primer set sorting rule [Easy]

Target DNA
(Complement)
CONSENSUS

Primer ID(Owner) 101 111 121 131 141 151 161 171 181 191 201 211 221 231 241 251 261 271

167) -2.46

1131) -1.62

187) -2.16

185) -2.05

1107) -2.18

[outputs: 5 sets] Displayed 1 - 5. DesignId: 070116123343

図 9.2 設計結果一覧画面

図 9.2 のプライマー設計結果画面に表示されているように、F3/B3 や F2/ B2 の 3' 末端、あるいは F1c/ B1c の 5' 末端で変異部位を認識するプライマーセットが生成されます。図 9.3 のプライマー情報詳細画面を示します。

PrimerExplorer V4
Software

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

DesignId: 070116123343

Order

Primer Information

1 ID:67 dimer(minimum)dG=-2.46
label 5'pos 3'pos len Tm 5'dG 3'dG GCratesequence

F3	168	186	19	55.94	-6.33	-5.57	0.42	ACCGTACTTTGGTTCCA
B3	348	368	21	56.71	-5.30	-5.16	0.43	CGAAGGCTCAATATCCG
FIP	45 TGCGGATGCTTAGAGCTTA-TATTAATGTTGAGCTACAGC							
BIP	43 TTAGGACTTCTAATCTGACCTTAGAGCTTCRAAGCGAA							
F2	187	211	25	57.98	-1.98	-4.98	0.32	TATTAATGTTGAGCTACAGC
F1c	227	246	20	60.67	-6.94	-4.32	0.50	TGCGGATGCTTAGAGCTTA
B2	323	340	18	56.33	-5.04	-5.93	0.44	CTAGACTTCRAAGCGAA
B1c	275	299	25	60.01	-3.69	-5.25	0.40	TTAGGACTTCTAATCTGACCTTAGAGCTTCRAAGCGAA

Primer Information

2 ID:131 dimer(minimum)dG=-1.62
label 5'pos 3'pos len Tm 5'dG 3'dG GCratesequence

F3	261	281	21	55.33	-3.69	-4.50	0.33	CGAAGGCACTTGGT
B3	446	466	21	55.17	-4.02	-4.13	0.38	CGAAGGCACTTGGT
FIP	45 GCCTTTCTAGAGCTTCRAAGC-CTTCTAATCTGACCTTGTG							
BIP	46 AAGCTTTCTAGAGCTTCRAAGC-CTTCTAATCTGACCTTGTG							
F2	283	303	21	56.73	-4.43	-4.66	0.48	CTTCTAATCTGACCTTGTG
F1c	226	246	20	61.49	-5.84	-5.01	0.47	GCCTTTCTAGAGCTTCRAAGC
B2	422	442	21	55.38	-3.44	-4.92	0.38	CGAAGGCACTTGGT
B1c	358	382	25	62.64	-4.24	-2.75	0.44	AAGCTTTCTAGAGCTTCRAAGC

Primer Information

3 ID:37 dimer(minimum)dG=-2.16
label 5'pos 3'pos len Tm 5'dG 3'dG GCratesequence

F3	113	131	19	55.44	-2.98	-5.26	0.42	ATTACTCTGCGAGAA
B3	304	321	18	57.09	-5.35	-4.01	0.56	CAGACCCAGAGCACTC
FIP	46 TGTCTGAGCTCAAGCTGTTTAAAGGATCACTGTTCATGAG							
BIP	46 TGTCTGAGCTCAAGCTGTTTAAAGGATCACTGTTCATGAG							
F2	134	154	21	57.29	-4.85	-4.91	0.43	GGATCAACTGTTCATGAG
F1c	189	213	25	60.35	-5.90	-2.09	0.36	TGTCTGAGCTCAAGCTGTTTAA
B2	277	297	21	55.25	-5.35	-4.08	0.43	GTCAATGAGGATGATACCT
B1c	214	238	25	60.09	-3.90	-4.42	0.40	TGTCTGAGCTCAAGCTGTTTAA

Primer Information

4 ID:95 dimer(minimum)dG=-2.05
label 5'pos 3'pos len Tm 5'dG 3'dG GCratesequence

F3	226	244	19	55.93	-4.09	-5.68	0.47	TAGACTCTGCGATCCG
B3	399	422	24	55.82	-3.99	-5.01	0.33	TGACTATATAGTCAGAGGAA
FIP	48 ACTCCGCACTCAATATTAGGACCAATGACCTCTTACAGAGGA							
BIP	40 CTTCAGTCTGATGCTTTAGGATTCAGAGGAACTCAG							
F2	245	269	25	57.71	-3.44	-4.36	0.32	CAGGACCTCTTACAGAGGA
F1c	285	307	23	61.09	-5.25	-3.43	0.48	ACTCCGCACTCAATATTAGG
B2	365	384	20	57.78	-3.40	-7.38	0.45	AGGATTCAGAGGAACTCAG
B1c	311	330	20	62.22	-5.63	-5.68	0.55	CTTCAGTCTGATGCTTTAGG

Primer Information

5 ID:107 dimer(minimum)dG=-2.18
label 5'pos 3'pos len Tm 5'dG 3'dG GCratesequence

F3	238	255	18	55.83	-5.35	-4.90	0.50	CATCCGCACTCAATATTAGG
B3	401	423	23	55.03	-4.74	-4.91	0.35	TGACTATATAGTCAGAGGAA
FIP	45 ACTCCGCACTCAATATTAGGACCAATGACCTCTTACAGAGGA							
BIP	45 CTTCAGTCTGATGCTTTAGGATTCAGAGGAACTCAG							
F2	259	283	25	57.29	-3.15	-4.57	0.32	TATTAATGTTGAGCTACAGC
F1c	299	318	20	61.92	-6.53	-5.17	0.50	ACTCCGCACTCAATATTAGG
B2	372	396	25	57.80	-4.91	-4.94	0.32	GATTCGATCAAGGATTCAGAGGA
B1c	319	338	20	61.15	-5.00	-6.26	0.55	CTTCAGTCTGATGCTTTAGG

図 9.3 プライマー情報詳細画面

54

9.2 エキスパートモードでの設計

UPLOAD FILE : C:\Documents and Settings\vs8004\Desktop\Normal\Alignment.txt

```

1 AATGCTACTA CTATTAGTAG AATTGATGCC ACCITTTTCAG CTCGGCCDC AATGAAAT ATAGTAAAC AGTATTATGA 80
.....
81 CCATTTGCGA AATGATCTA ATGCTCAGC TAAATCTACT CGTTCGCGA ATTGGGAATC AACTGTTACA TGGAAAGAAA 160
*****
161 CTCCTCAGCA CCGTACTTTA GTTGCATATT TAAACATGT TGAAGTACAG CACCAATTC AGCAATTAG CTCTAGCCA 240
*****
241 TCCGCAAAA TGACCTCTTA TCAAAAGAG CAATTAAAGG TACTCTCTAA TCCGACCTG TTGGAGTTTG CTTCGGCTCT 320
*****
321 GGTTCGCTTT GAAGCTGAA TTAACACGCG ATATTTGAG TCITTCGAGC TTCTCTTAA TCITTTTAT GCATCCGCT 400
*****
401 TTGCTTCTGA CTATAATGT CAGGATAGG ACCTGATTTT TGATTTATGA TGATTTCTGT TTCTGAGCT GTTTAAGCA 480
*****
481 TTTGAGGGGG ATTCA ..... 495

```

Number of Primer Candidates: F1=292, F2=549, F3=429, B1=318, B2=316, B3=395, FIP=652, BIP=593
982 Primer set(s) were generated.

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

2. Generate
 982 sets were generated.

3. Display
 Page 1 Displayed. Sorting Rule: None

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

Parameter Condition: 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
 dimer check: -2.5

Distances
 (F2-B2): 120 - 180
 Loop(F1c-F2): 40 - 60
 F2-F3: 0 - 20
 F1c-B1c: 0 - 100

Limitations
 F1c/B1c: 3
 F2/B2: 10
 F3/B3: 3
 Sets: 1000

Mutation/Consensus

Pecularity	Permission	
high level ↑	F1c 5'term	B1c 5'term
	F2 3'term	B2 3'term
	F3 3'term	B3 3'term
	F1c inner	B1c inner
	F2 inner	B2 inner
	F3 inner	B3 inner
	F1c 3'term	B1c 3'term
	F2 5'term	B2 5'term
low level ↓	F3 5'term	B3 5'term

「Generate」
ボタンをクリック

F1c/B1c の 5' 末端と F2/B2 の 3' 末端に変異を許容

図 9.4 プライマー設計画面

エキスパートモードでは、図 9.4 に示したように、各プライマーの末端に変異が含まれることを許容して設計を行います。

エキスパートモードでの結果を図 9.5 に示します。F3/B3 や F2/ B2 の 3' 末端、あるいは F1c/ B1c の 5' 末端で変異部位を認識するプライマーセットが生成されます。標的遺伝子の 5' 末端から 3' 末端に向けて特異的プライマーが生成されます。領域ごとにプライマーが設計されています。非常に多くのプライマーが生成された場合には、設計の条件をさらに厳しくして、生成されるプライマー数を絞ります。これは第一章 p18-23 に示された要領でその中から希望のプライマーを選択します。

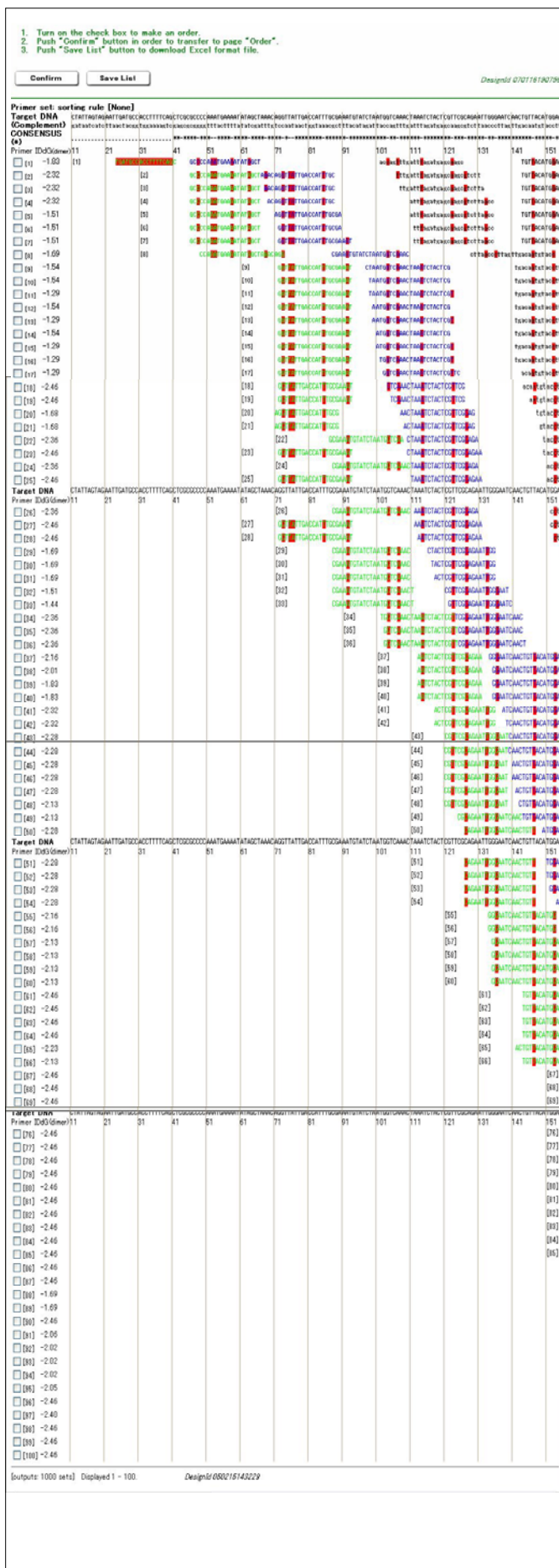


図 9.5 設計結果一覧表示画面