

LAMP 法プライマ - 設計の手引き

(PrimerExplorer Ver. 4)

栄研化学株式会社
研究開発統括部

目 次

LAMP 法プライマー設計支援ソフトによる LAMP 法プライマー設計のポイント及び PrimerExplorer Ver.4 のご紹介

1. LAMP 法プライマ -	3
2. LAMP 法プライマ - 設計のポイント	3
3. プライマ - 設計の手順	4
4. PrimerExplorer の機能	5

PrimerExplorer Ver.4 の画面ボタン説明

1. 通常プライマー設計画面説明(イージーモード)	9
2. 詳細設計画面 (エキスパートモード)	10
3. ループプライマー設計画面説明(イージーモード)	11
4. 詳細設計画面(エキスパートモード)	12

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 - の設計	13
1.1 Target 配列のアップロード	13
1.2 プライマ - の設計(イージーモード)	14
1.3 プライマーの設計(エキスパートモード)	17
1.4 結果の表示	18
1.5 プライマ - セットの選択	22
2. AT rich 配列でのプライマ - 設計	24
3. 設計条件(パラメータ)の変更(プライマー設計の注意点)	26
3.1 生成されるプライマーセット数が多い場合	26
3.2 生成されるプライマ - セット数が少ない場合	26
3.3 設計条件の変更と保存	27
3.4 保存した設計条件でのプライマー設計	29
4. プライマー領域を指定した設計	31
4.1 Target 配列上でプライマー領域を指定する	31
4.2 プライマー領域を指定して設計する	32
5. ル - プライマ - の設計	34
5.1 プライマー情報ファイルのアップロード	34
5.2 ループプライマーを設計する	34
5.3 ループプライマーセットの候補を絞り込む	36

プライマー設計の応用例

6. 野生株と変異株に対するプライマー設計	37
-----------------------	----

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	37
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)	37
7. 変異部位を考慮したプライマー設計	41
7.1 Target 配列のアップロード	41
7.2 Target 配列上に変異部位を入力して変異を含まないプライマーを設計する	41
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を設計する。	44
8. マルチプルアライメント結果を使った共通プライマーの設計	50
9. 特異的プライマーの設計	53
9.1 イージーモードでの設計	53
9.2 エキスパートモードでの設計	55

研究の進め方とテクニック

LAMP 法実施上の注意点 - コンタミネーションを防ぐために -	57
実験条件	57
LAMP 産物の確認 1	58
LAMP 産物の確認 2	58
試薬の取り扱い	58

用語集	59
-----	----

LAMP 法プライマ - 設計支援ソフトによる

LAMP 法プライマ - 設計のポイント 及び

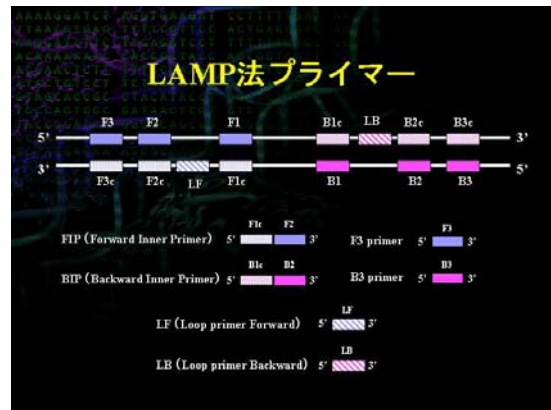
PrimerExplorer Ver. 4 のご紹介

1. LAMP 法プライマー

右図の通り、LAMP 法プライマーの設計は Target 配列の 5' 側から、F3 領域、F2 領域、F1 領域、B1 領域、B2 領域、B3 領域という 6 つの領域を利用して実施します。

基本的な LAMP 法では 4 種類 (Inner primer 2 種類と Outer primer 2 種類) のプライマーを使います。Inner primer は、F1c と F2、B1c と B2 を連結します。

さらに F1 領域と F2 領域の間の領域に対する相補鎖に Forward 側のループプライマーを設定し、B1 領域と B2 領域の間の領域の相補鎖に Backward 側のループプライマーを設定します。



2. LAMP 法プライマー設計のポイント

LAMP 法プライマー設計のポイントは、 T_m 値、各プライマー領域の末端安定性、GC 含量、二次構造の 4 つです。

2. 1. T_m 値

T_m の推算式は Nearest-Neighbor 法が基本になります。この方法は現在最も実測値に近い近似法と言われています。

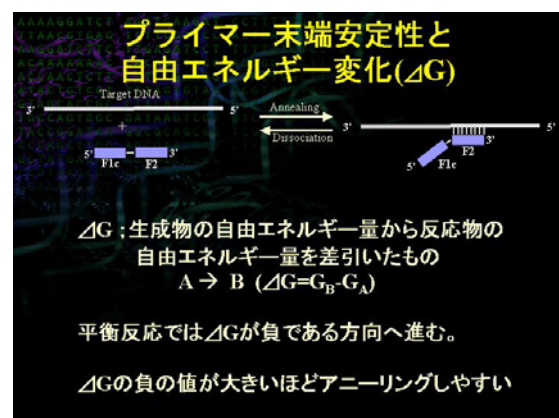
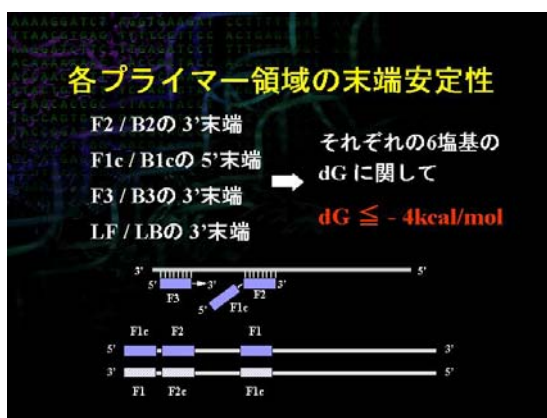
T_m 値計算実験条件としては、塩濃度やオリゴ濃度の影響を受けやすいため、一定条件での算出が望ましいとされています (オリゴ濃度を $0.1 \mu\text{M}$ 、ナトリウムイオン濃度を 50mM 、マグネシウムイオン濃度を 4mM)。

なお、各領域の T_m 値は、F1c および B1c 領域で 65°C 前後 ($64\sim 66^\circ\text{C}$)、F2 領域、B2 領域、F3 領域、B3 領域ので 60°C 前後 ($59\sim 61^\circ\text{C}$)、ループプライマーは 65°C 前後 ($64\sim 66^\circ\text{C}$) に設定します。

2. 2. 各プライマー領域の末端安定性

各プライマー領域の末端は DNA 合成の起点となるため安定性が要求されます。F2 / B2、F3 / B3、LF / LB の 3' 末端及び F1c / B1c の 5' 末端の自由エネルギーが -4kcal/mol 以下になるように設定します。F1c の 5' 末端は複製後に F1 領域の 3' 末端に相当するため安定性が重要になります。(左下図参照)。

なお、自由エネルギー変化 (ΔG) は、生成物の自由エネルギーから反応物の自由エネルギーを差引いたものです。反応は、自由エネルギー変化 (ΔG) が負である方向へ進みます。プライマーとターゲット遺伝子のアニーリングは平衡反応であり、 ΔG が小さければ小さいほどアニーリング反応が進行します (右下図参照)。



2.3 GC 含量

プライマーの GC 含量は 40 から 65%程度になるように設計します。
50 から 60%の間に設計できれば比較的良好なプライマーが得られる傾向にあります。

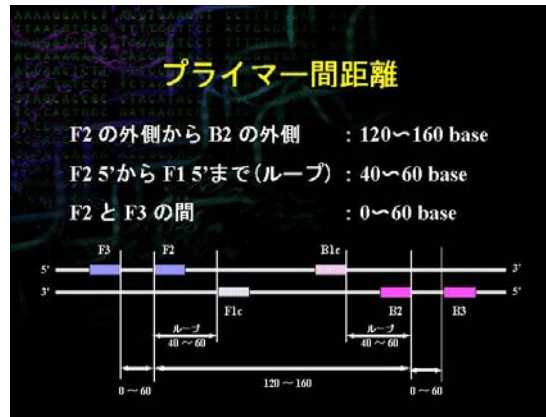
2.4 二次構造

特に Inner primer に関しては、極端に二次構造をとらないように設計します。
また、プライマーダイマーの生成を防ぐためにも、3' 末端が相補的にならないように注意が必要です。

2.5 プライマー間の距離

F2 領域の外側から B2 領域の外側まで(LAMP 法の増幅領域)が 120 から 160 base になるように設計します。

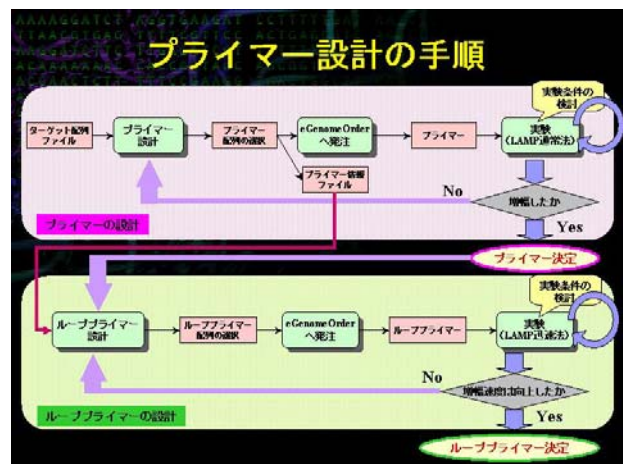
F2 領域の 5' 末端から F1 領域の 5' 末端まで(ループを形成する部分)は 40 から 60 base になるように設計します。F2 領域と F3 領域の間の距離は 0 から 60 base になるように設計します。



3. LAMP 法プライマー設計の手順

右図の通り、プライマー設計の手順は、はじめに基本となる LAMP 法プライマー(FIP、BIP、F3、B3)を設計し、実際に増幅してみます。増幅が起こりその結果に満足できたならば LAMP 法プライマーとして決定します。もし増幅しなかったり、満足のいく結果が得られないならば再度設計をやり直します。

つぎにループプライマーを設計したい場合には、決定した LAMP 法プライマーの情報ファイルを用いてループプライマーを設計します。実際に反応を行い、増幅速度が向上したならばループプライマーとして決定します。もし満足のいく結果が得られないならば再度設計をやり直します。なおループプライマーは LAMP にとって必要不可欠なものではありません。



4. PrimerExplorer の機能

現在の Primer Explorer は 2 種類のバージョンがあり、各バージョンの機能の比較を以下に示します。

機能 \ バージョン	Primer Explorer Ver.3	Primer Explorer Ver.4
イージーモードとエキスパートモード切換え	×	○
プライマーセット候補の自動絞込みと優先順位付け	×	○
通常設計法	○	○
設計条件の自動判定	○	○
変異部位を考慮した設計	○	○
プライマー領域を指定した設計	○	○
ループプライマーの設計	○	○
ターゲット全域にわたるプライマー設計	○	○
共通プライマーの自動設計	×	○
特異プライマーの自動設計	×	○
マルチプルアライメント結果のインプット	×	○
プライマーセットリスト画面保存機能	×	○
ターゲット配列情報の保存・アップロード	×	○
末端のチェック	○	○

次に、個々の機能について、ご紹介します。

4.1 イージーモードとエキスパートモード

イージーモードでは、ユーザーはパラメーターを自分で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込みと優先順位付けが行われます。エキスパートモードはプライマーセットをカスタマイズするためのもので、ユーザー自身がパラメーターを変更することが可能であり、また設計されるプライマーセット数も指定することができます。

4.2 通常法

ユーザー自身がプライマー設計条件を入力してプライマーを設計します。デフォルトとして、通常配列(45%<GC<60%)を対象としたプライマー設計条件があらかじめ入力されています。ターゲット配列が AT rich(GC 含量<45%)または GC rich 配列(GC 含量>60%)の場合には、Tm 値、Length、GC 含量について以下の条件を設定してプライマーを設計します。

	Tm 値(°C)	Length (mer)	GC 含量(%)
AT rich	>55	18-25	<45
GC rich	<68	15-22	>60

4.3 自動判定

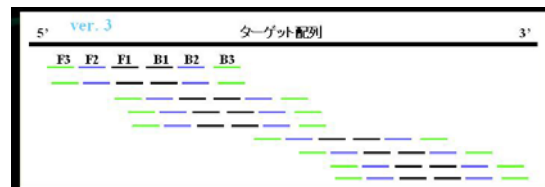
自動判定の簡単な流れを右図に示します。

ターゲット配列を入力すると、PrimerExplorerがターゲット配列のGC含量を自動計算します。その結果に基づいて、入力配列を AT rich (GC%<45)、通常配列(45<GC%<60)、GC rich 配列(GC%>60)に分類して、プライマーの設計諸条件を自動選択します。それぞれの設計条件は、T_m 値、Length、GC rate(含量)が、あらかじめそれらの配列条件に適した条件がセットされており、ユーザー自身がそれらの値を入力する必要がなくなりました。



4.4 ターゲット領域全域にわたるプライマー設計

ターゲット領域全域にわたってプライマーが設計されることが可能になりました。まず設計の際に、ターゲット領域全域から FIP-BIP 及び F3、B3 領域が設計されます。次に各々の FIP-BIP 領域に対して、それぞれ一組の F3、B3 領域が選択、組み合わせられプライマーセットが設計されます。FIP-BIP と F3、B3 領域の組み合わせは 5' 末端から始まり 3' 末端まで続きます。その後、再び 5' 末端から始まり 3' 末端へと設計が進み、一つの FIP-BIP に対して最高で 3 種類の F3-B3 が組合わされます。このため、同じ FIP-BIP 領域をもつプライマーセット数の減り、様々なプライマーセットがターゲット領域全域にわたって設計されることになります。



4.5 プライマー領域を指定した設計

LAMP 法の各プライマー領域(F3、F2、F1、B1、B2、B3)を指定して、プライマーを設計します。あらかじめ増幅する領域が決まっている場合や、良好なプライマー領域が分かっている場合にこの機能を使用します。

4.6 ループプライマーの設計

LAMP 法の基本的なプライマーセット(FIP、BIP、F3、B3)が決まった後に、さらに増幅時間の短縮と特異性の向上のためにループプライマーを設計します。基本的なプライマーセットを設計する際に示されるプライマーセットの情報ファイルを基にして、ループプライマーを設計します。

4.7 変異部位を考慮した設計

変異株を対象にしてプライマーを設計する場合に、デフォルト状態でプライマー設計を行うとランダムにプライマーがつくられ、変異部位を含んだプライマーが設計されることがあります。一般的に、野生株と変異株を共通のプライマーで増幅・検出するためには、変異部位を含まないプライマーセットを選択します。

このような時に、変異部位を含まないプライマーの設計機能を使用します。もしこの機能を使用してプライマーが全く設計されない場合は、5'末端または 3'末端に変異が含まれることを許容することで、条件を緩めてプライマー設計を行います。変異を許容するプライマー領域及びその領域内での位置(5'末端、中間、3'末端)を指定できます。

4. 8 マルチプルアライメント対応 (Ver.4 対応)

異なる変異をもつ複数の遺伝子をワンセットで検出するプライマー(共通プライマー)及び複数の変異株のなかから特定の遺伝子のみを増幅させるプライマー(特異的プライマー)を設計することができます。その際に、複数の遺伝子のマルチプルアライメント結果をそのままインプットすることができます。アライメントの最上段の遺伝子を基準にして変異箇所を認識し、そのままプライマーを設計することができます。

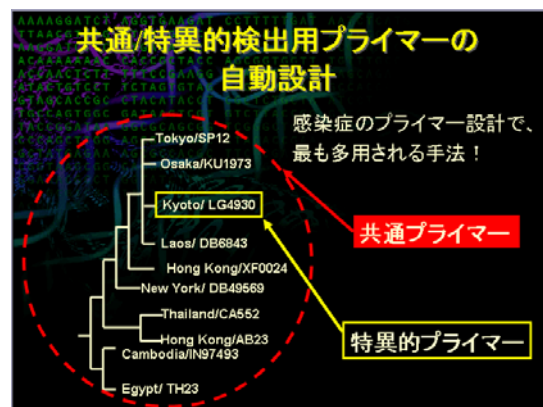


4. 9 共通プライマーの自動設計 (Ver.4 対応)

ターゲット配列に変異を指定、またはマルチプルアライメントの結果をアップロードすれば、増幅に対して変異部位の影響が少ないプライマー(共通プライマー)を自動的に設計できるようになりました。

4. 10 特異的プライマーの自動設計 (Ver.4 対応)

ターゲット配列に変異を指定、またはマルチプルアライメントの結果をアップロードすると、プライマーの末端領域で変異部位が認識する特異的プライマーを自動的に設計できるようになりました。



4. 11 プライマーセット設計結果画面の保存機能 (Ver.4 対応)

Ver. 4 ではプライマーの設計結果を Excel 形式でファイルにダウンロードできます。ターゲット配列を基準として、設計したプライマーの位置が表示されます。

4. 12 遺伝子配列情報の保存 (Ver.4 対応)

Ver. 4 では、導入した変異情報、指定した Fixed Primer の情報を遺伝子配列情報とともに保存することができます。また保存した配列を再びアップロードし、プライマー設計を再開することができます。

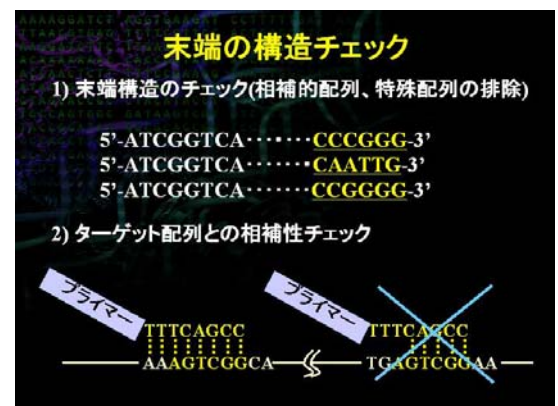
4. 13 設計条件の保存

この Ver. 4 では、設計条件の保存及び再読み込みが可能です。また、以前の配列情報を入力し、その時使用した設計条件の再読み込みをすることにより、迅速に以前のデータを提示できるようになりました。

4. 14 末端のチェック

自動的に末端のチェックを行い、相補的な配列、特殊配列を含んだプライマーセットを自動的に排除します。相補的配列とはシメトリックな配列(例えば CCGGGG や GAATTC)や、特殊配列(例えば、CCGGGG や AATTTT など同じ塩基を末端に含む配列)を意味し、プライマーダイマーの原因になるため、これらは設計の段階で排除されます。

また、ターゲット配列の相補性のチェックを行います。設計されたプライマー候補の末端とターゲット遺伝子配列を比較して、プライマー候補の末端配列が、ターゲット配列の増幅領域以外にも存在した場合、そのプライマーセットは排除されます。これにより非特異的な増



幅を起こすプライマーセットが除かれます。

PrimerExplorer Ver.4 の画面ボタン説明

通常プライマー設計画面説明

簡易設計画面

The screenshot shows the LAMP PRIMER DESIGN TOOL interface. The main window displays a DNA sequence with annotations. The interface includes several key components:

- Target Sequence Display Area (ターゲット配列表示エリア):** Target sequence display, mutation sites, and primer position specification.
- Message Display Area (メッセージ表示エリア):** Messages from the LAMP primer design support software.
- Buttons:**
 - Generate:** Generate primer sets (existing function).
 - Display:** Display primer list (existing function).
 - Detail Settings:** Move to the simplified design screen (new function).
 - Generate sets:** Generate primer sets (existing function).
 - Set Mutation:** Specify mutation sites (new function).
 - Fixed Primer:** Specify primer positions (new function).
 - Design Option:** Specify common or special primer conditions (new function).
 - Save Target:** Save the content of the target sequence display area (new function).

	: 既存の機能
	: 新規機能

詳細設計画面

https://primerexplorer.jp - LAMP PRIMER DESIGN TOOL - Microsoft Internet Explorer

UPLOAD FILE : C:\Documents and Settings\Naoki\Desktop\WORK\塩基配列\Hu_shh_FASTA.txt

```

1 ATGCTGCTGC TGGTGGCCAG ATGTTTCTG GATGCTCTG CTCTCTGCT GCTGGTGGC CCAGGGCTGG CCTGTGGCC 80
*****
81 CGGACGGGGG TTGGAAGA GCGGACCC CAARAAGCTG ACCCTTTAG CCTACAGCA GTTTATCCC AACGTAGCG 160
*****
161 AGAA
****
241 TACA
****
321 AAAT
****
401 ATCATTGGG GGGTTLTTR LALTRGGGG GTGGGAGG GGGGTCGRL GGGTLLGRL GGGGTCGRL GGGGTCGRL 480
*****
481 ATGCTGGCTC GCGTGGCTGT GAAGCGGGT TTCGACTGG TCTACTATGA ATCCAGAGCT CAGATCCACT GTTCTGTGA 560
*****
561 AGCAGAGAAC TCGTGGCG GCAATCCGG CGGCTTTTC CGGGGATCG CCACCGTGA CCTGGAGAG GGCAGACCA 640
*****
641 AGCTGTGAA GAGACTAGT CCCGAGACC GGTGCTGGG GGTGGAGAC CAGGGCCGGG TCGTGTACAG CGACTTCCTC 720
*****
    
```

ターゲット配列表示エリア:
ターゲット配列の表示、突然変異部位、プライマー位置の指定

メッセージ表示エリア:
LAMP法プライマー設計支援ソフトからのメッセージ

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

2. Generate

3. Display

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

Parameter Condition: GC rich

Length: F1c/B1c 15 - 22, F2/B2 15 - 20, F3/B3 15 - 20

Tm: F1c/B1c 64 - 68, F2/B2 59 - 63, F3/B3 59 - 63

GC rate (%): 40 - 70

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 high level, low level

Save Target: F3, F2, F1, B1, B2, B3, Clear, Save Target

Design Option: Default, Common, Specific

Sorting Rule: Easy

Save Parameters: Save Parameter, Reset Parameter

Reset Parameters: パラメタのリセット

Set Mutation:
突然変異部位の指定

Fixed Primer:
プライマーの位置指定

Save Target:
ターゲット配列表示エリア
内容を保存

Design Option:
共通プライマー/特異プライマー
条件を指定

Sorting Rule:
プライマーセットの出力順序を指定
簡易設計の追加に伴い、"Easy"
(デフォルト)を追加

Save Parameters:
設定パラメタを保存

Reset Parameters:
パラメタのリセット

Select Range:
増幅領域を指定

Generate:
プライマーセット生成

Display:
プライマー一覧を表示

Basic Designing:
簡易設計画面に遷移

Parameter Conditions:
パラメタセットの変更

Generate sets:
プライマー生成数

Show Page:
表示する頁を指定

Length: 各プライマーの長さの最短、最長を指定

Tm: 各プライマーのTmの最低、最高を指定

GC rate: 各プライマーのGC含量の許容範囲を指定

dG threshold:
5'又は3'末端安定性、ダイマー形成能判定
のためのdG閾値を指定

Distance: 各プライマー間距離について指定

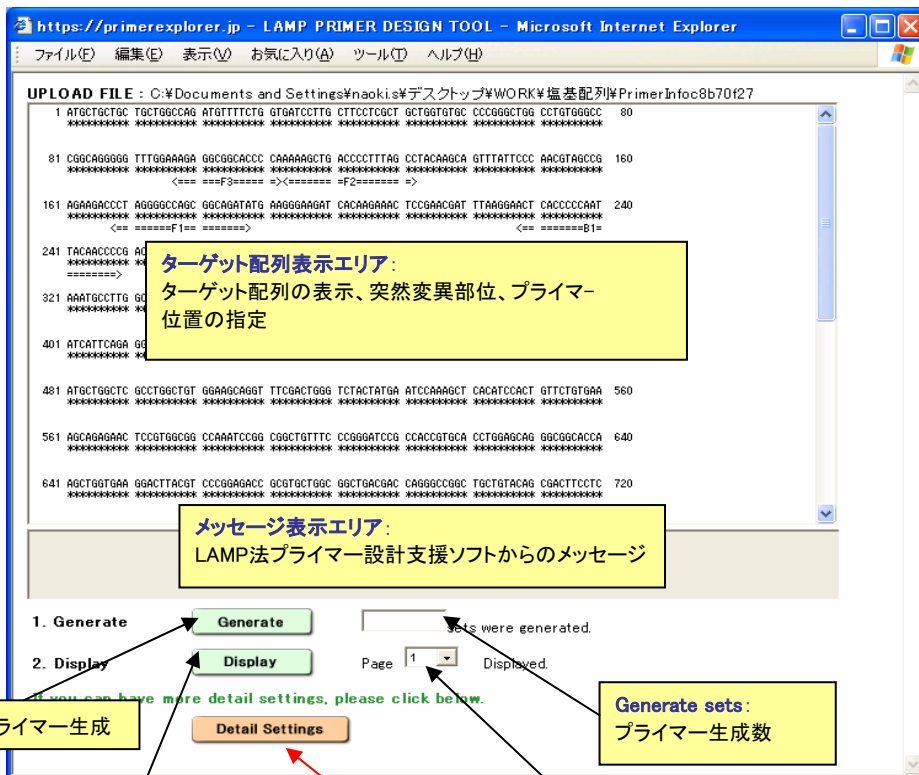
Limitations:
プライマーセットを生成する際の組み合わせ
数、生成上限数を指定

Mutation/Consensus:
変異部位の扱い(上から順に特異性が高い)
各PrimerPieceの5'、3'、中間のそれぞれの
部位に対して変異許容を指定可能

Reset Parameters:
パラメタのリセット

ループプライマー設計画面説明

簡易設計画面



- : 既存の機能
- : 新規機

詳細設計画

The screenshot shows the LAMP PRIMER DESIGN TOOL interface in a Microsoft Internet Explorer browser window. The main content area displays a DNA sequence with annotations. Below the sequence are control buttons for 'Generate', 'Display', and 'Basic Designing'. A 'Parameter Condition' section contains input fields for 'Length', 'Tm', 'GC rate (%)', 'dG threshold', and 'Limitations'. A 'Regular primer' section is also visible at the bottom.

ターゲット配列表示エリア:
 ターゲット配列の表示、突然変異部位、プライマー位置の指定

メッセージ表示エリア:
 LAMP法プライマー設計支援ソフトからのメッセージ

Generate:
 プライマーセット生成

Display:
 プライマー一覧を表示

Basic Designing:
 簡易設計画面に遷移

Generate sets:
 プライマー生成数

Reset Parameters:
 パラメタのリセット

Show Page:
 表示する頁を指定

Length: 各プライマーの長さの最短、最長を指定

Tm: 各プライマーのTmの最低、最高を指定

GC rate: 各プライマーのGC含量の許容範囲を指定

dG threshold:
 5'又は3'末端安定性、ダイマー形成能判定のためのdG閾値を指定

Limitations:
 プライマーセットを生成する際の組合せ数、生成上限数を指定

Distance: 各プライマー間距離について指定

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。

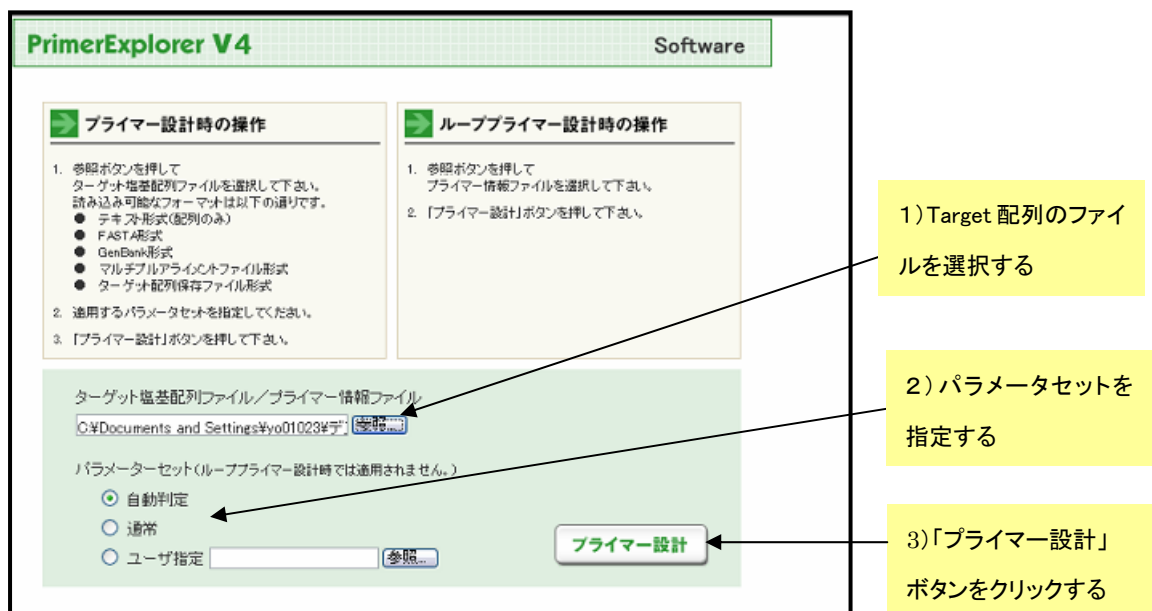


図 1.1 PrimerExplorer の初期画面

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)。

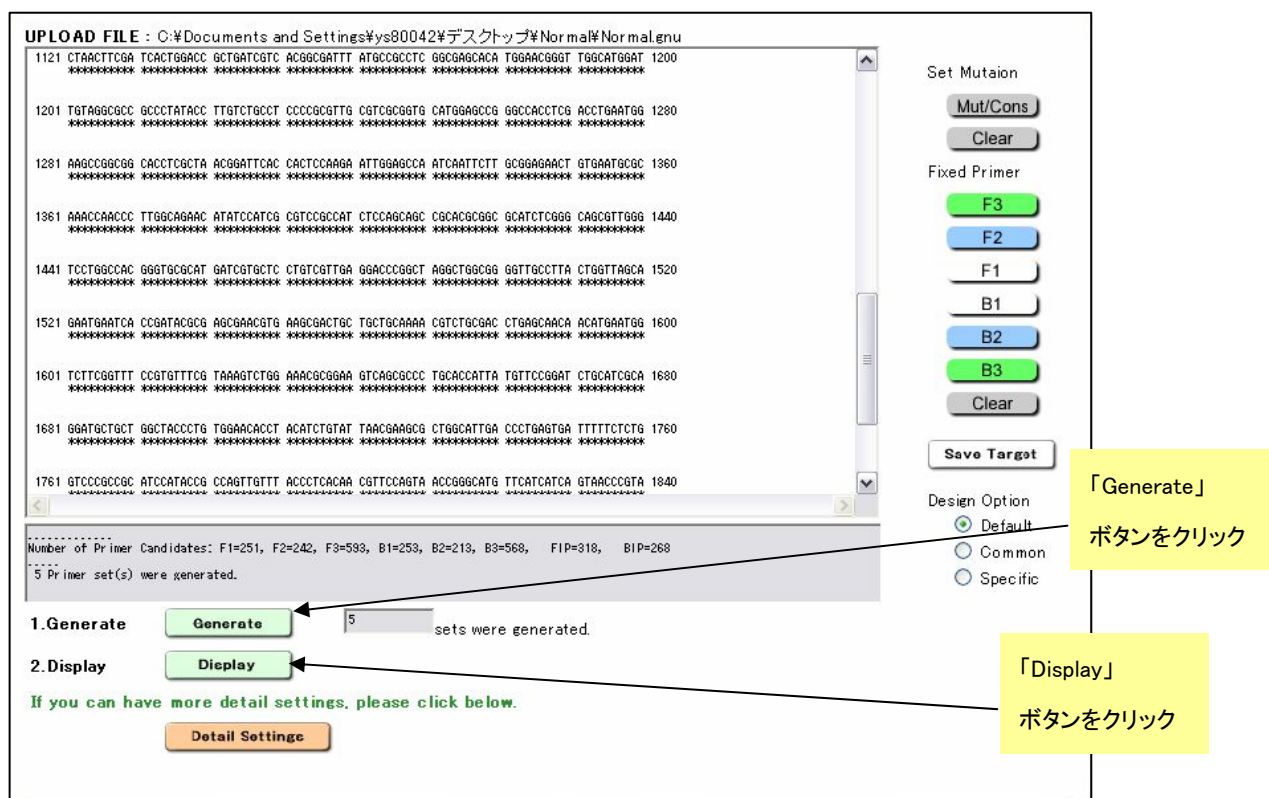


図 1.2 イージーモードでのプライマー設計画面

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。

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: 07011614882

Primer set name	Primer ID	Sequence	Position	Orientation	GC Content (%)	Melting Temp (°C)	Secondary Structure
Primer set: sorting rule [asc]	1	AGCTTGAAGCTTGCTAGTCAAGCTG	131	+	1.61	1.71	0.00
	2	CGTCTGATGCTGCTGCTGCTGCTGCT	131	+	1.61	1.71	0.00
	3	CGTCTGATGCTGCTGCTGCTGCTGCT	131	+	1.61	1.71	0.00
	4	CGTCTGATGCTGCTGCTGCTGCTGCT	131	+	1.61	1.71	0.00
Primer set: sorting rule [asc]	5	CGTCTGATGCTGCTGCTGCTGCTGCT	131	+	1.61	1.71	0.00
	6	CGTCTGATGCTGCTGCTGCTGCTGCT	131	+	1.61	1.71	0.00
	7	CGTCTGATGCTGCTGCTGCTGCTGCT	131	+	1.61	1.71	0.00
	8	CGTCTGATGCTGCTGCTGCTGCTGCT	131	+	1.61	1.71	0.00

Primer set name	Primer ID	Sequence	Position	Orientation	GC Content (%)	Melting Temp (°C)	Secondary Structure
Primer set: sorting rule [asc]	1	AGCTTGAAGCTTGCTAGTCAAGCTG	131	+	1.61	1.71	0.00
	2	CGTCTGATGCTGCTGCTGCTGCTGCT	131	+	1.61	1.71	0.00
	3	CGTCTGATGCTGCTGCTGCTGCTGCT	131	+	1.61	1.71	0.00
	4	CGTCTGATGCTGCTGCTGCTGCTGCT	131	+	1.61	1.71	0.00
Primer set: sorting rule [asc]	5	CGTCTGATGCTGCTGCTGCTGCTGCT	131	+	1.61	1.71	0.00
	6	CGTCTGATGCTGCTGCTGCTGCTGCT	131	+	1.61	1.71	0.00
	7	CGTCTGATGCTGCTGCTGCTGCTGCT	131	+	1.61	1.71	0.00
	8	CGTCTGATGCTGCTGCTGCTGCTGCT	131	+	1.61	1.71	0.00

Primer set name	Primer ID	Sequence	Position	Orientation	GC Content (%)	Melting Temp (°C)	Secondary Structure
Primer set: sorting rule [asc]	1	AGCTTGAAGCTTGCTAGTCAAGCTG	131	+	1.61	1.71	0.00
	2	CGTCTGATGCTGCTGCTGCTGCTGCT	131	+	1.61	1.71	0.00
	3	CGTCTGATGCTGCTGCTGCTGCTGCT	131	+	1.61	1.71	0.00
	4	CGTCTGATGCTGCTGCTGCTGCTGCT	131	+	1.61	1.71	0.00
Primer set: sorting rule [asc]	5	CGTCTGATGCTGCTGCTGCTGCTGCT	131	+	1.61	1.71	0.00
	6	CGTCTGATGCTGCTGCTGCTGCTGCT	131	+	1.61	1.71	0.00
	7	CGTCTGATGCTGCTGCTGCTGCTGCT	131	+	1.61	1.71	0.00
	8	CGTCTGATGCTGCTGCTGCTGCTGCT	131	+	1.61	1.71	0.00

「Confirm」ボタンをクリックして、プライマーの詳細情報を確認

「SaveList」ボタンをクリックすると、全画面が Excel 形式で保存できる。

図 1.3 プライマーセットの一覧表示

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-GCAGGAGTCGCATAAGCGGA
BIP		40						CATGACTATCGTCGCCGCACT-CACCTGTCTACGAGTTGC
F2	628	646	19	60.88	-6.10	-5.20	0.59	GCAGGAGTCGCATAAGCGGA
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	AACGGCCGATGGATGC
FIP		41						ACATAATGCTGCAGGGGCGCTG-TCAATGGTCTTCGGTTCCG
BIP		40						CCGAGGATGCTGCTGGCTAC-AATCACTCAGGTCATGCC
F2	1594	1613	20	59.76	-4.07	-5.30	0.50	TGAATGGTCTTCGGTTCCG
F1c	1643	1663	21	65.39	-3.29	-7.42	0.57	ACATAATGCTGCAGGGGCGCTG
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	CCGAGGATGCTGCTGGCTAC

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	ACCCCTGGATGCTGTAGGC
B3	317	334	18	59.61	-6.54	-6.03	0.61	GGCTCCAAAGTAGCCAAAGC
FIP		40						GTGACTGGCGATGCTGCGG-GCTTGGTTATGCCGGTACTG
BIP		39						TATGGCGTGTGCTAGGCGTA-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	GTGACTGGCGATGCTGCGG
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	TATGGCGTGTGCTAGGCGTA

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

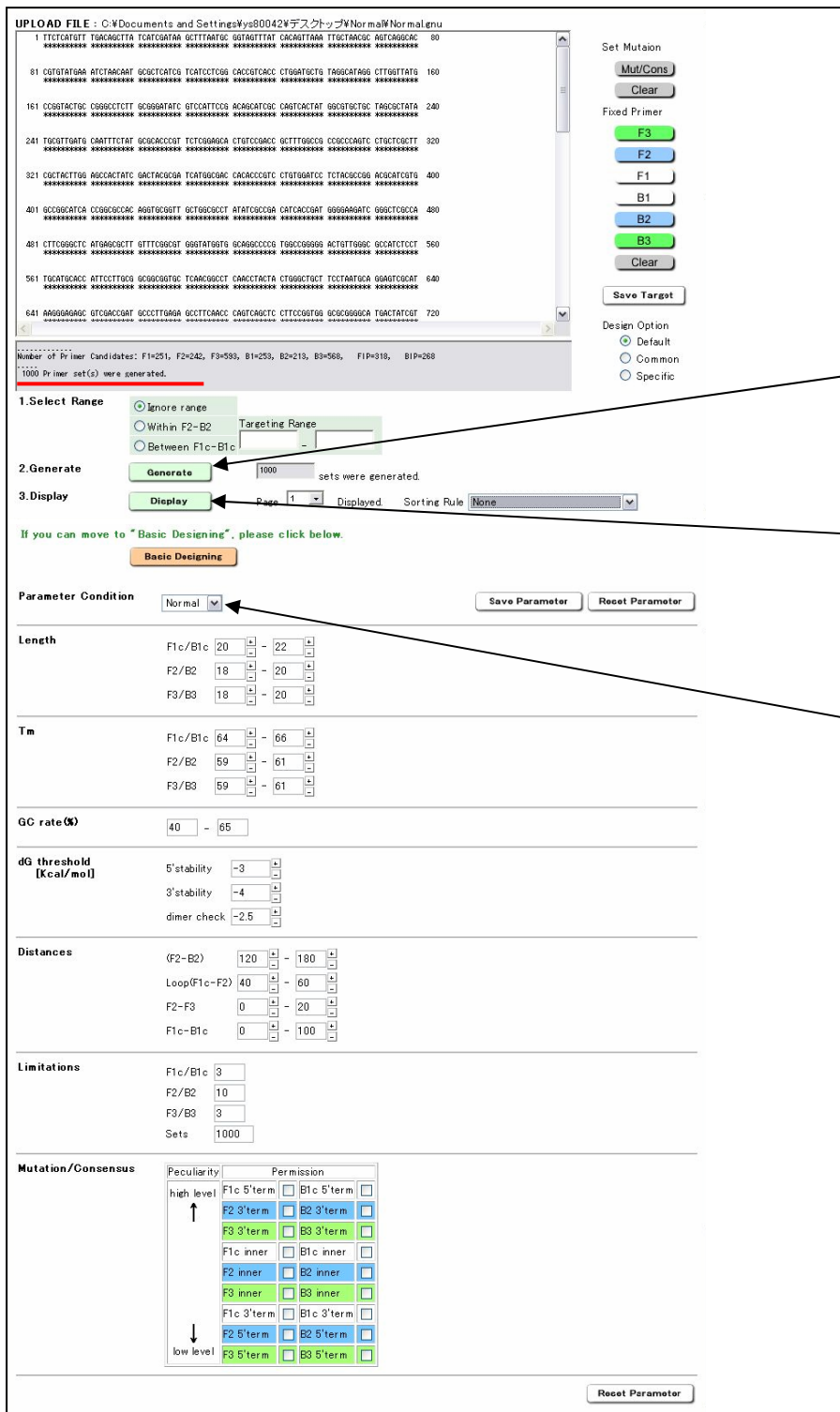
Set Mutation
Mut/Cons
Clear

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

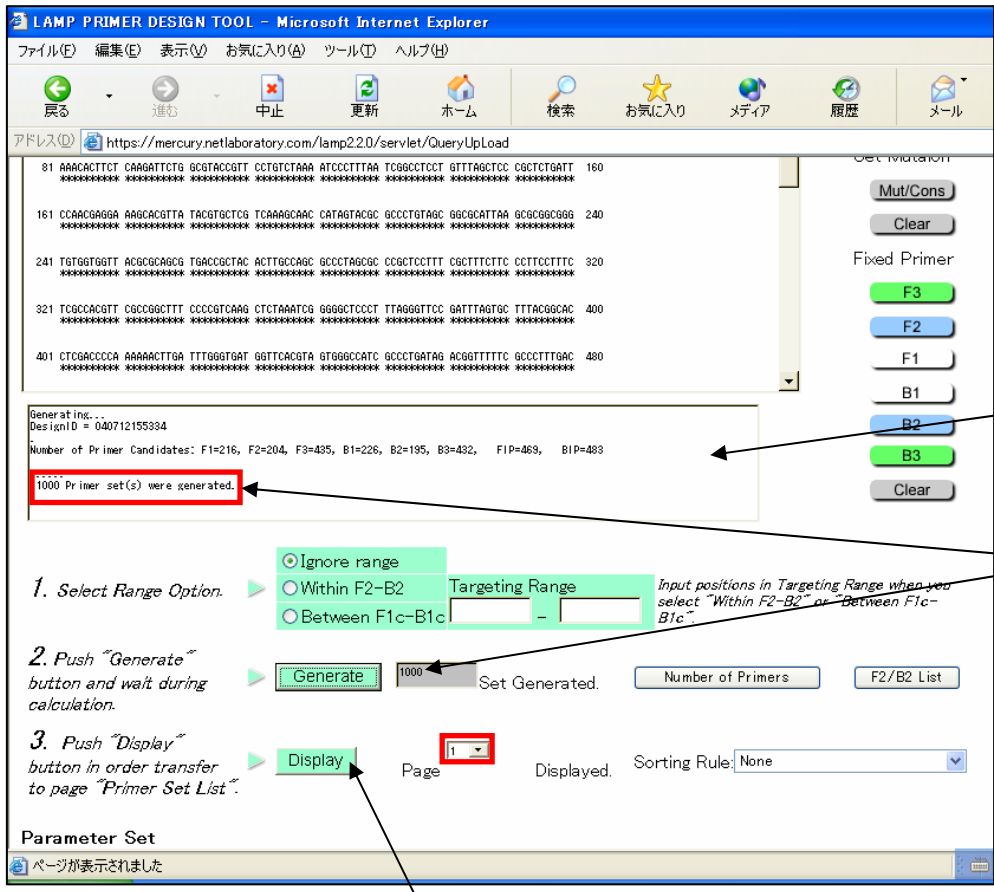


図 1.7 設計画面

「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お他領域(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 CACAGTAAATTGCTAACGGTAGTCAGGCACCGTGTATGAAATCTAACAAATGGCGTCATCGTCATCCTCCGGCACCAGTCACCCCT
 (Complement) gtgtcaatttaacgattgcctcagtcocgtggcacatacttagattgttacccgagtagcagtaggagccgtggcagtgagg
 CONSENSUS(*)

Primer ID	dG(dimer)	Primer
[1]	-2.01	TGCTAACGCAGTCAGGCA
[2]	-2.01	TGCTAACGCAGTCAGGCA
[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

Primer ID	dG(dimer)	Primer	5' 末端位置
[39]		caagsttcctcttagcctgcccaacaatgascgaagt	1331
[40]		caagsttcctcttagcctgcccaacaatgascgaagt	1341
[41]		actactttgacccgatgtctc	1381
[42]		actactttgacccgatgtctc	1391
[43]		actactttgacccgatgtctc	1401
[44]		actactttgacccgatgtctc	1411
[45]		aactaccgcaaggataaaca	1421
[46]		aactaccgcaaggataaaca	1431
[47]		aactaccgcaaggataaaca	1441
[48]		aactaccgcaaggataaaca	1451
[49]		aactaccgcaaggataaaca	1461
[50]		aactaccgcaaggataaaca	1471
[51]		aactaccgcaaggataaaca	1481
[52]		aactaccgcaaggataaaca	1491
[53]		aactaccgcaaggataaaca	1501
[54]		aactaccgcaaggataaaca	1511
[55]		aactaccgcaaggataaaca	1521
[56]		aactaccgcaaggataaaca	1531
[57]		aactaccgcaaggataaaca	1541
[58]		aactaccgcaaggataaaca	1551
[59]		aactaccgcaaggataaaca	1561

B1c 領域 B2 領域 B3 領域 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 screenshot displays a software interface for viewing results. At the top, there is a title bar with the text "結果の一覧表示画面" and a menu bar with buttons for "結果" and "結果表". Below the menu bar, there is a large table with multiple columns and rows. The table contains various data points, some of which are highlighted in green and blue. The table is organized into several sections, with some sections having sub-headers. The overall layout is clean and professional, typical of a data analysis or reporting tool.

図 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。

label	5'pos	3'pos	len	Tm	5'dG	3'dG	GCrate	Sequence
ID:1 dimer(minimum)dG=-2.01								
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
ID:2 dimer(minimum)dG=-2.01								
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

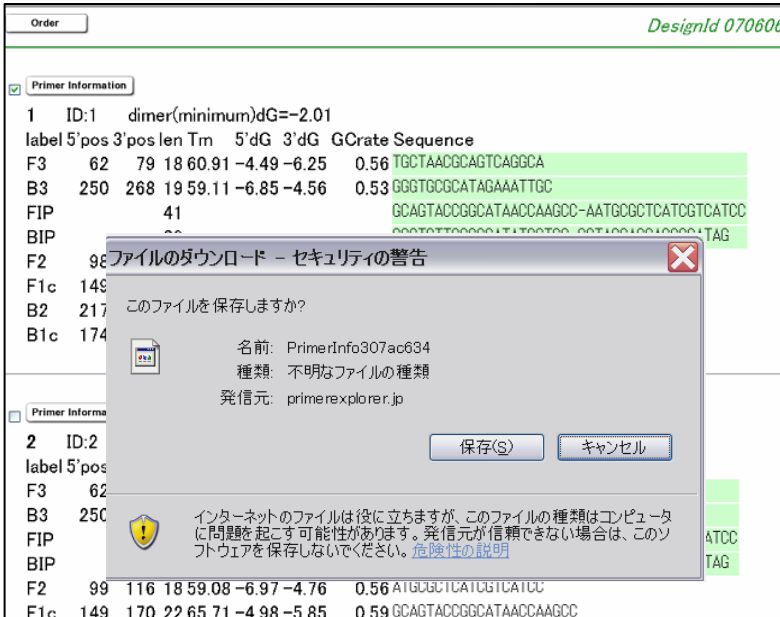


図 1.12 プライマー情報の保存画面



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	Primer Type	Value 1	Value 2
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

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)		gataatcatcttaactacgggtggaaaagtcgagcgcggggtttactttttatcgatttgtccaataactggtaaacgcttt									
CONSENSUS(*)		*****									
Primer ID	dG(dimer)	11	21	31	41	51	61	71	81	91	
<input type="checkbox"/> [1]	-1.83	[1]	TGATGCC	ACCTTTTCAGC		GCCCCAAATGAAAAT	ATAGCT				
<input type="checkbox"/> [2]	-2.32			[2]		GCCCCAAATGAAAAT	ATAGCTAAAC	AGGTTATTGACC	ATTTGCG		
<input type="checkbox"/> [3]	-2.32			[3]		GCCCCAAATGAAAAT	ATAGCTAAC	AGGTTATTGACC	ATTTGCG		
<input type="checkbox"/> [4]	-2.32			[4]		GCCCCAAATGAAAAT	ATAGCTAC	AGGTTATTGACC	ATTTGCG		
<input type="checkbox"/> [5]	-1.51			[5]		GCCCCAAATGAAAAT	ATAGCT	AGGTTATTGACC	ATTTGCGA		
<input type="checkbox"/> [6]	-1.51			[6]		GCCCCAAATGAAAAT	ATAGCT	GGTTATTGACC	ATTTGCGA		
<input type="checkbox"/> [7]	-1.69			[7]		CCAAATGAAAAT	ATAGCTAAAC	AGG		CGAAA	
<input type="checkbox"/> [8]	-2.46							[8]	GGTTATTGACC	ATTTGCGAAA	
<input type="checkbox"/> [9]	-2.46							[9]	GGTTATTGACC	ATTTGCGAAA	
<input type="checkbox"/> [10]	-1.11							[10]	AGGTTATTGACC	ATTTGCG	
<input type="checkbox"/> [11]	-1.11							[11]	AGGTTATTGACC	ATTTGCG	
<input type="checkbox"/> [12]	-2.46							[12]	GGTTATTGACC	ATTTGCGAAA	
<input type="checkbox"/> [13]	-2.46							[13]	GGTTATTGACC	ATTTGCGAAA	
<input type="checkbox"/> [14]	-2.46							[14]	GGTTATTGACC	ATTTGCGAAA	
<input type="checkbox"/> [15]	-2.46							[15]	GGTTATTGACC	ATTTGCGAAA	
<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。

Option
 Default
 Common
 Specific

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

2. Generate
Generate 1000 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 AT rich Save Parameter Reset Parameter

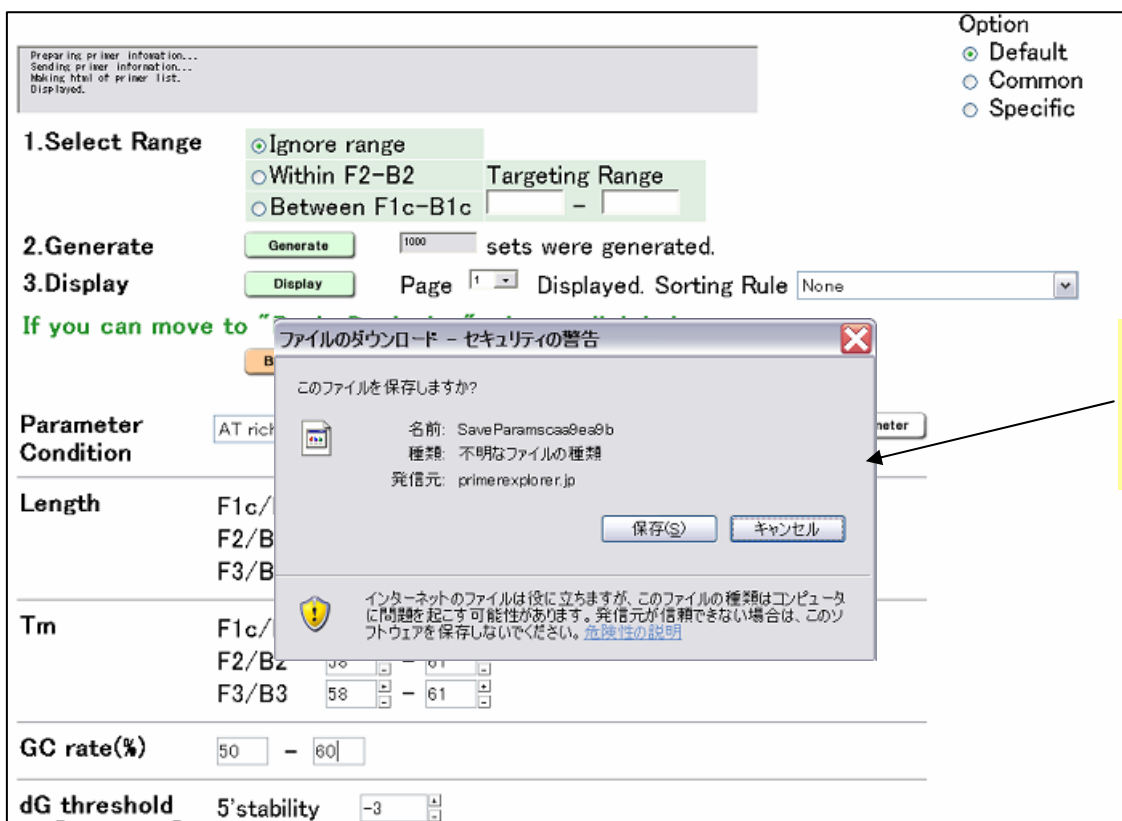
Parameter	F1c/B1c	F2/B2	F3/B3
Length	19	17	17
Tm	63	58	58
GC rate(%)	50	60	

dG threshold 5'stability -3

Length、Tm 値、GC rate (%)の赤枠

「Save Parameters」ボタンをクリックする

図3. 1 設計条件の変更(プライマー設計画面)



保存場所とファイル名を指定して設計条件を保存する

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。

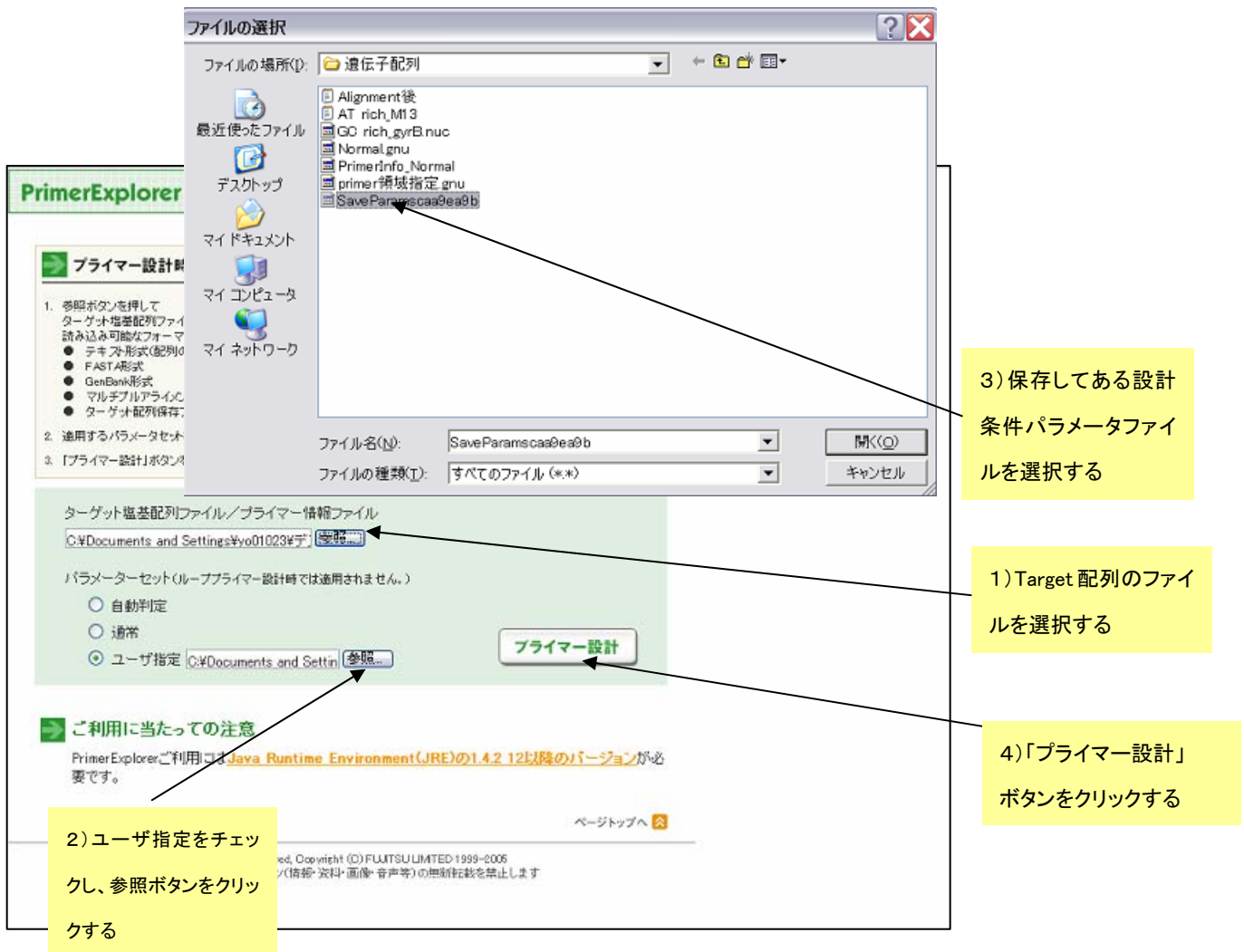


図3. 3 PrimerExplorer Ver.4 の初期画面

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

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

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

プルダウンにより他の設計条件を選択する

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

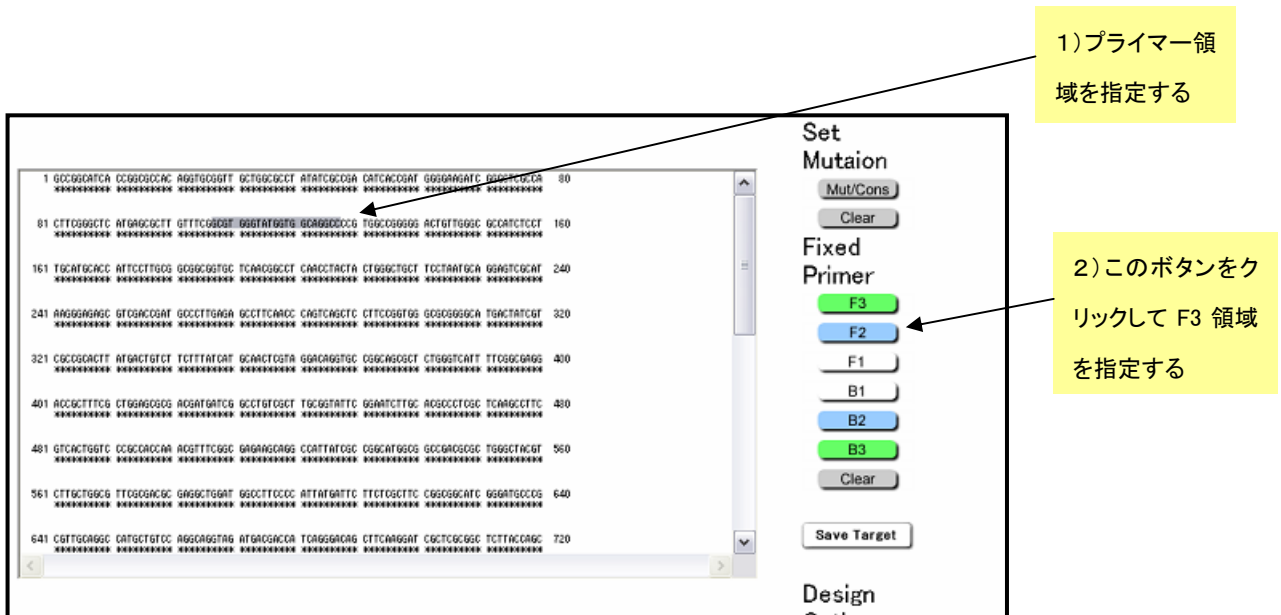
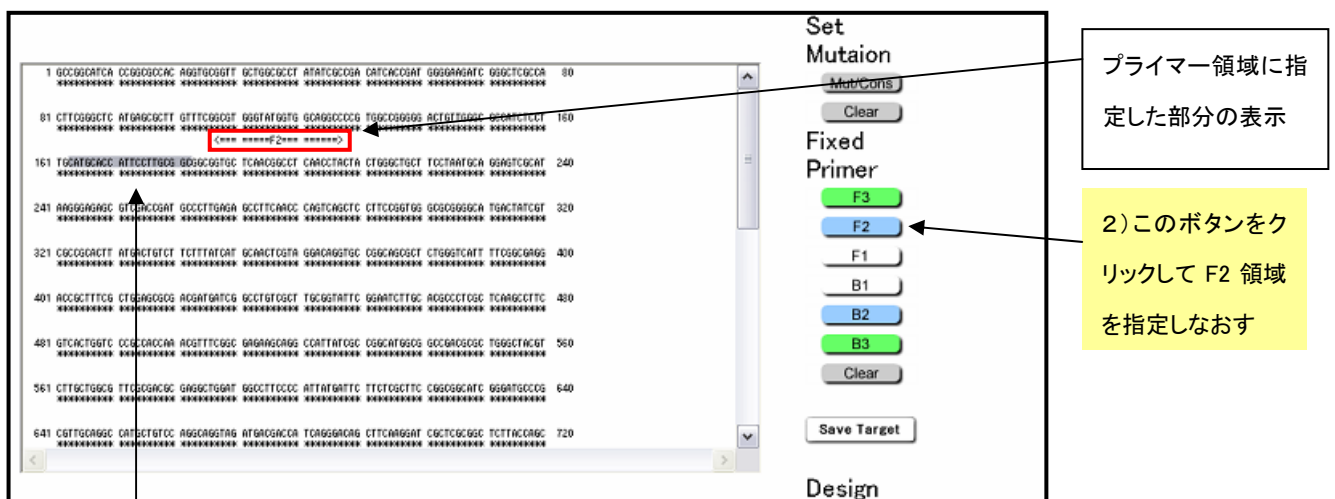


図4.2 プライマー領域指定後の画面



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) agtaggagccctggcagtgaggacctacgacatccgatatccgaaccaatacggccatgacggccccggagaacgccctatagca

CONSENSUS(*)

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

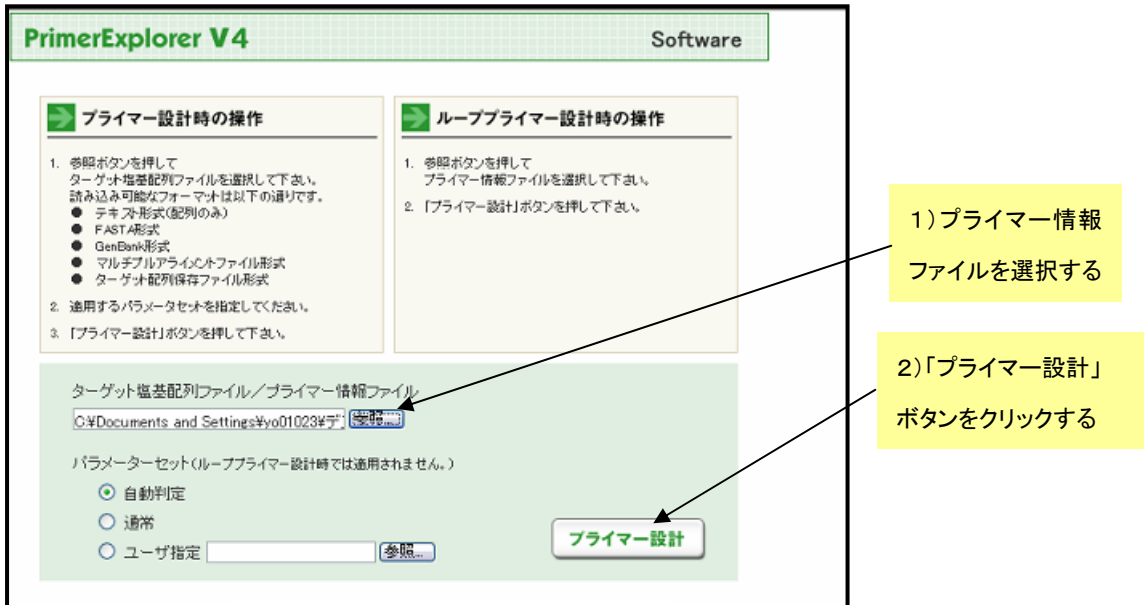


図 5.1 PrimerExplorer の初期画面

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。

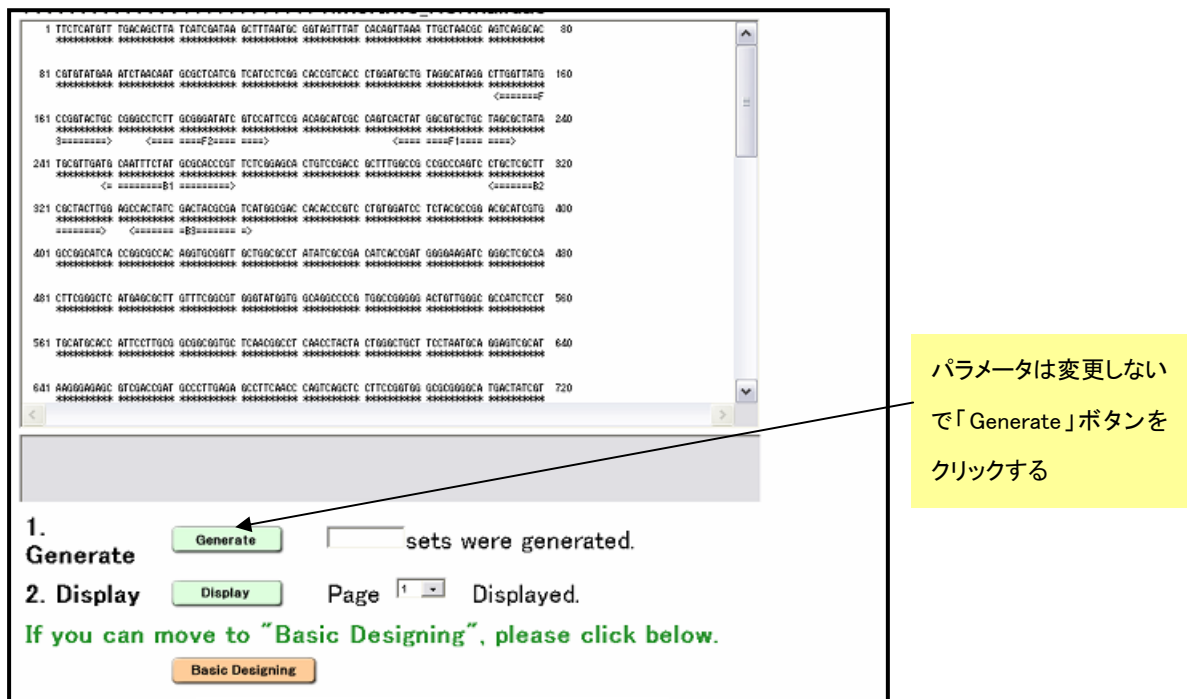


図 5.2 ループプライマー設計画面

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 software interface. At the top, a yellow box labeled '2) 「Details」 ボタンをクリック' points to the 'Details' button. Below it, a table lists primer sets with checkboxes. A yellow box labeled '1) すべてのボックスをチェックする' points to these checkboxes. The table shows target DNA sequences and primer sets (1-6) with their respective IDs and melting temperatures. A red box highlights the primer sequences for sets 1-6. Below the table, a box labeled 'Forward 側のループプライマー' points to a section of the target DNA. Another box labeled 'Backward 側のループプライマー' points to a section of the target DNA. A box labeled '保存しておいたプライマー情報の領域' points to the top section of the interface.

Primer ID	dimer	1301	1311	1321	1331	1341	1351	1361	1371	1381	1391	1401
[1]	-2.18											
[2]	-2.18											
[3]	-2.18											
[4]	-1.98											
[5]	-1.98											
[6]	-1.98											

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。

The screenshot shows a list of 6 primer sets. Each entry includes a checkbox, ID number, dimer minimum dG value, and a table of thermodynamic data. Annotations include a yellow box pointing to ID 1's checkbox and two white boxes pointing to IDs 1, 2, 3 and IDs 4, 5, 6 respectively, both labeled '同じ配列'.

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。

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:	GCAGGCATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTTC	*	CAACGTCGTGACTGGGAA	*	AACCCCTG	60
M13_3M1.nuc	1:	GCAGGCATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTTC		CAACGTCGTGACTGGGAA		AACCCCTG	60
M13_3.nuc	61:	GCGTTACCCAACCTTAATCG	*	CTTGCAGCACATCCC	*	CTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCG	120
M13_3M1.nuc	61:	GCGTTACCCAACCTTAATCG		CTTGCAGCACATCCC		CTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCG	120
M13_3.nuc	121:	AAGAGT	*	CCCGCACCGATCGCCCTTCCAACA	*	CTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCT	180
M13_3M1.nuc	121:	AAGAGT		CCCGCACCGATCGCCCTTCCAACA		CTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCT	180
M13_3.nuc	181:	TTGCCTGGTTTCCGGCACCGAAGCGGTGC			*	CGGAAAGCTGGCTGGAGTGCATCTTCCTG	240
M13_3M1.nuc	181:	TTGCCTGGTTTCCGGCACCGAAGCGGTGC				CGGAAAGCTGGCTGGAGTGCATCTTCCTG	240
M13_3.nuc	241:	AGGCCGATACGGTCGTCGTCCCTCAA		ACTGGCAGATGCACGGTTACGATGCGCCCATCT			300
M13_3M1.nuc	241:	AGGCCGATACGGTCGTCGTCCCTCAA		ACTGGCAGATGCACGGTTACGATGCGCCCATCT			300
M13_3.nuc	301:	ACACCAACGTAACCTATCCCATTACGGTCAATCCGCGTTTGTTC		CCACGGAGAATCCGA			360
M13_3M1.nuc	301:	ACACCAACGTAACCTATCCCATTACGGTCAATCCGCGTTTGTTC		CCACGGAGAATCCGA			360
M13_3.nuc	361:	CGGGTTGTTACTCGCTCACATTTAATGTTGATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCCAGACGC					420
M13_3M1.nuc	361:	CGGGTTGTTACTCGCTCACATTTAATGTTGATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCCAGACGC					420
M13_3.nuc	421:	GAATTATTTTGGATGGCGTTCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAA					480
M13_3M1.nuc	421:	GAATTATTTTGGATGGCGTTCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAA					480
M13_3.nuc	481:	CGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTAC					510
M13_3M1.nuc	481:	CGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTAC					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 GCAGGCATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTCAACCTGCTGACTGGGAAACCCCTGGGTTACCCAACTTAATGCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTCC

(Complement) cgtccgtacgttogaacogtgaocggagcaaaatgttgcagactgacocctttggggacggcaatgsgttgaattagcgaactctctassessaaaacgctcgaaccattatcccttctccggctgctcascgssaae

CONSENSUS(*) *****

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

[1] -1.99 ATGCAAGCTTGGCACTGG CGTCGTTTCAACCTGCTG sssttgaattagcgaactctc GCCGTAATAGCGAAGAGGCC

[2] -1.99 ATGCAAGCTTGGCACTGG TTTCAACCTGCTGACTGGG gaactctctassessaaa GCCGTAATAGCGAAGAGGCC

[3] -1.99 ATGCAAGCTTGGCACTGG TTTCAACCTGCTGACTGGG gaactctctassessaaa GCCGTAATAGCGAAGAGGCC

[4] -1.99 ATGCAAGCTTGGCACTGG TTTCAACCTGCTGACTGGG gaactctctassessaaa GCCGTAATAGCGAAGAGGCC

[5] -1.99 ATGCAAGCTTGGCACTGG TTTCAACCTGCTGACTGGG gaactctctassessaaa GCCGTAATAGCGAAGAGGCC

[6] -2.27 [6] CGTCGTTTCAACCTGCTG GAAACCCCTGGGTTACCC aagcggctgaaccattatcg CACCGATCGCCCTCC

[7] -2.27 [7] CGTCGTTTCAACCTGCTG AAACCCCTGGGTTACCCA aaacggctgaaccattatcg CACCGATCGCCCTCC

[8] -2.27 [8] CGTCGTTTCAACCTGCTG AAACCCCTGGGTTACCCAA aaacggctgaaccattatcg CACCGATCGCCCTCC

[9] -2.27 [9] TCGTGACTGGGAAACCCCT ACCCAACTTAATGCTTGC cgaccscattatcgctctcgc CACCGATCGCCCTCC

[10] -2.27 [10] AAACCCCTGGGTTACCCA ACTTAATGCTTGCAGCAC gcattatcgctctcgcacc ACCGATCGCCCTCC

[11] -2.27 [11] AAACCCCTGGGTTACCCA ACTTAATGCTTGCAGCAC cattatcgctctcgcacc ACCGATCGCCCTCC

[12] -2.13 [12] AAACCCCTGGGTTACCCA TTAATGCTTGCAGCAC attatcgctctcgcaccgctg

[13] -2.13 [13] AAACCCCTGGGTTACCCA TTAATGCTTGCAGCAC attatcgctctcgcaccgctg

[14] -2.13 [14] AAACCCCTGGGTTACCCA TTAATGCTTGCAGCAC attatcgctctcgcaccgctg

[15] -2.13 [15] AAACCCCTGGGTTACCCA TTAATGCTTGCAGCAC attatcgctctcgcaccgctg

[16] -2.35 [16] CGTCGACTGGGAAACCC AATGCTTGCAGCAC tgcctacgssaae

[17] -2.35 [17] CGTCGACTGGGAAACCC AATGCTTGCAGCAC tgcctacgssaae

[18] -2.35 [18] CGTCGACTGGGAAACCC ATGCTTGCAGCAC tgcctacgssaae

[19] -2.37 [19] AAACCCCTGGGTTACCCA GCAGCACATCCCCCTTTC tgcctacgssaae

[20] -2.37 [20] AAACCCCTGGGTTACCCA CAGCACATCCCCCTTTC tgcctacgssaae

[21] -2.37 [21] ATGCTTGCAGCACATC CCAGCTGGCGTAATAGCG aase

[22] -2.37 [22] ATGCTTGCAGCACATC CAGCACATCCCCCTTTC CAGCTGGCGTAATAGCGAA

[23] -2.46 [23] ATGCTTGCAGCACATC AGCTGGCGTAATAGCGAA

[24] -2.46 [24] ATGCTTGCAGCACATC GCTGGCGTAATAGCGAA

[25] -2.37 [25] ATGCTTGCAGCACATC GCTGGCGTAATAGCGAAG

Target DNA GCAGGCATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTCAACCTGCTGACTGGGAAACCCCTGGGTTACCCAACTTAATGCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTCC

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

Target DNA GCAGGCATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTCAACCTGCTGACTGGGAAACCCCTGGGTTACCCAACTTAATGCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTCC

(Complement) cgtccgtacgttogaacogtgaocggagcaaaatgttgcagactgacocctttggggacggcaatgsgttgaattagcgaactctctassessaaaacgctcgaaccattatcccttctccggctgctcascgssaae

CONSENSUS(*) *****

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

[1] -1.99 GCATGCAAGCTTGGCACT CGTCGTTTCAACCTGCTG sssttgaattagcgaactctc TTTCCAGCTGGCGTAATAGC

[2] -1.99 ATGCAAGCTTGGCACTGG TTTCAACCTGCTGACTGGG attagcgaactctctagc GCCGTAATAGCGAAGAGGCC

[3] -1.99 ATGCAAGCTTGGCACTGG TTTCAACCTGCTGACTGGG attagcgaactctctagc GCCGTAATAGCGAAGAGGCC

[4] -1.99 ATGCAAGCTTGGCACTGG TTTCAACCTGCTGACTGGG attagcgaactctctagc GCCGTAATAGCGAAGAGGCC

[5] -1.99 ATGCAAGCTTGGCACTGG TTTCAACCTGCTGACTGGG attagcgaactctctagc GCCGTAATAGCGAAGAGGCC

[6] -1.99 ATGCAAGCTTGGCACTGG TTTCAACCTGCTGACTGGG attagcgaactctctagc GCCGTAATAGCGAAGAGGCC

[7] -1.99 ATGCAAGCTTGGCACTGG TTTCAACCTGCTGACTGGG attagcgaactctctagc GCCGTAATAGCGAAGAGGCC

[8] -1.99 ATGCAAGCTTGGCACTGG TTTCAACCTGCTGACTGGG attagcgaactctctagc GCCGTAATAGCGAAGAGGCC

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

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

[11] -2.27 [11] CGTCGTTTCAACCTGCTG AAACCCCTGGGTTACCC aaacggctgaaccattatcg CACCGATC

[12] -2.27 [12] CGTCGTTTCAACCTGCTG AAACCCCTGGGTTACCCA aaacggctgaaccattatcg CACCGATC

[13] -2.27 [13] CGTCGTTTCAACCTGCTG AAACCCCTGGGTTACCCAA aaacggctgaaccattatcg CACCGATC

[14] -2.27 [14] TCGTGACTGGGAAACCCCT ACCCAACTTAATGCTTGC cgaccscattatcgctctcgc CACCGATC

[15] -2.27 [15] AAACCCCTGGGTTACCCA ACTTAATGCTTGCAGCAC gcattatcgctctcgcacc ACCGATC

[16] -2.27 [16] AAACCCCTGGGTTACCCA ACTTAATGCTTGCAGCAC cattatcgctctcgcaccgctg ACCGATC

[17] -2.13 [17] AAACCCCTGGGTTACCCA TTAATGCTTGCAGCAC attatcgctctcgcaccgctg

[18] -2.13 [18] AAACCCCTGGGTTACCCA TTAATGCTTGCAGCAC attatcgctctcgcaccgctg

[19] -2.13 [19] AAACCCCTGGGTTACCCA TTAATGCTTGCAGCAC attatcgctctcgcaccgctg

[20] -2.13 [20] AAACCCCTGGGTTACCCA TTAATGCTTGCAGCAC attatcgctctcgcaccgctg

[21] -1.98 [21] GTCGACTGGGAAACCC AATGCTTGCAGCAC fsgotag

[22] -1.98 [22] GTCGACTGGGAAACCC AATGCTTGCAGCAC fsgotag

[23] -1.98 [23] GTCGACTGGGAAACCC ATGCTTGCAGCAC fsgotag

[24] -2.37 [24] AAACCCCTGGGTTACCCA GCAGCACATCCCCCTTTC fsgotag

[25] -2.37 [25] AAACCCCTGGGTTACCCA CAGCACATCCCCCTTTC fsgotag

Target DNA GCAGGCATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTCAACCTGCTGACTGGGAAACCCCTGGGTTACCCAACTTAATGCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTCC

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

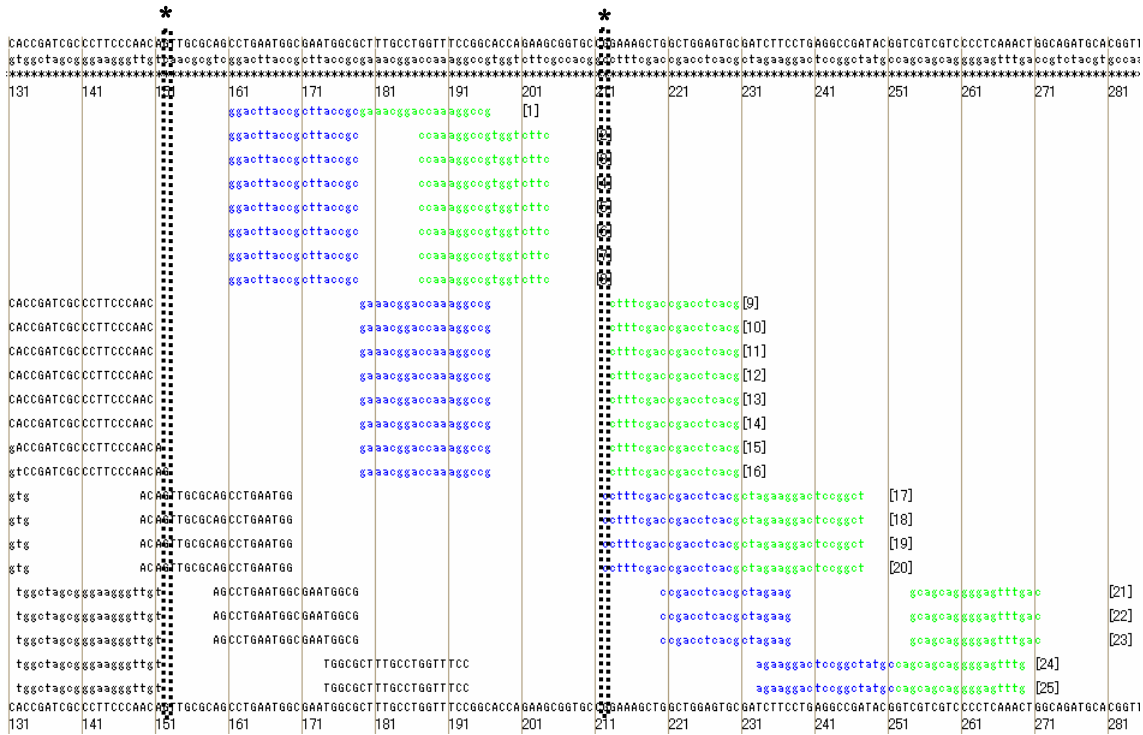


図 6.2 続き

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

7 変異部位を考慮したプライマー設計

7.1 Target 配列のアップロード

本章では、野生株と変異株を共通のプライマーで増幅する、あるいは変異株のみを優先的に増幅検出する場合のプライマー設計方法について説明します。

PrimerExplorer Ver.4 の初期画面を開いて、第1章で説明したのと同様の手順(p.18-23)で Target 配列ファイルを選択し、続いて「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)

7.2 Target 配列上に変異部位を入力して変異を含まないプライマーを設計する

変異部位を含まないプライマーの設計について説明します。プライマー設計画面(図 7. 1)で Target 配列上の変異部位を指定した後に「Mutation」ボタンをクリックします。そうすると図 7. 2のように変異の指定をした位置のスター(*)がハイフン(-)に変わります。この状態で入力が入力完了したことになります。また、もしもこの変異の情報を消去したい場合は「Clear」ボタンをクリックします。

図 7. 1 プライマー設計画面

The screenshot displays the PrimerExplorer software interface. On the left, a target DNA sequence is shown with a mutation highlighted in red. The mutation is located at position 152, where the sequence is 'CTGGATATG' and the mutation is 'CTGGATATG' with a red box around it. On the right, there are several control panels. The 'Set Mutation' panel includes a 'Mut/Cons' button and a 'Clear' button. The 'Fixed Primer' panel includes buttons for 'F3', 'F2', 'F1', 'B1', 'B2', 'B3', and 'Clear'. The 'Design Option' panel includes radio buttons for 'Default', 'Common', and 'Specific'. At the bottom, there is a '1. Select Range' section with radio buttons for 'Ignore range', 'Within F2-B2', and 'Between F1c-B1c', and a 'Targeting Range' input field. Annotations with arrows point to the 'Mutation' button and the mutation site.

2) 「Mutation」ボタンをクリック

1) 変異部位の配列を指定する

図 7.2 変異部位を入力した後の画面

変異の情報を消す時は「Clear」ボタンをクリックする

スター(*)がハイフン(-)に変わる

1. Select Range

- Ignore range
- Within F2-B2
- Between F1c-B1c

Targeting Range

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

ここではこの変異情報を用いる

「Generate」ボタンをクリック

1. Select Range

- Ignore range
- Within F2-B2
- Between F1c-B1c

Targeting Range

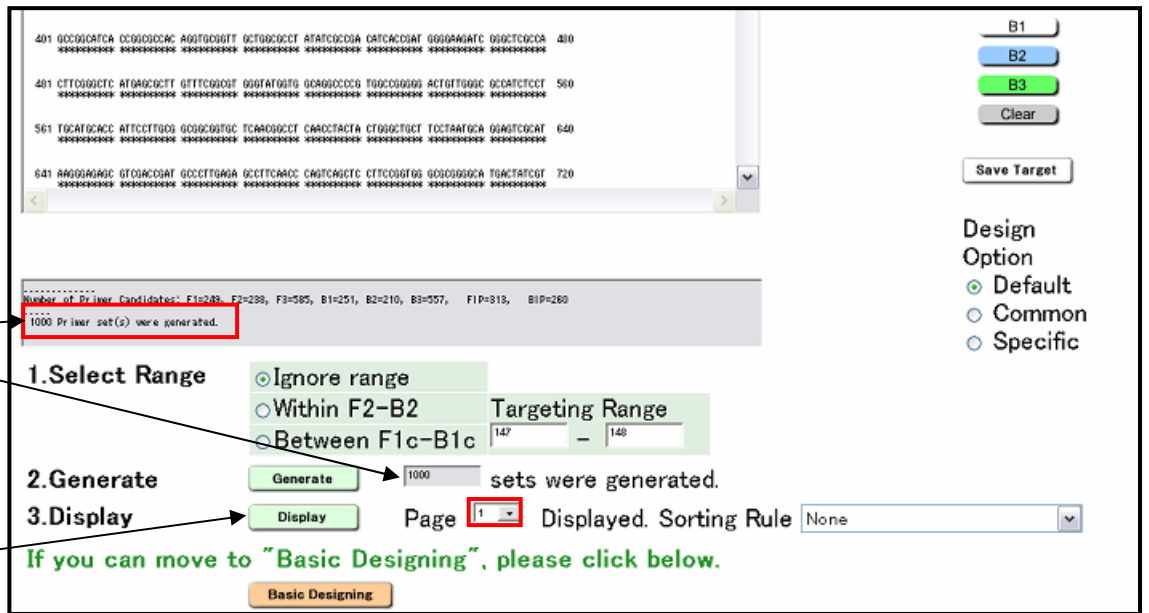
2. Generate

Generate 1000 sets were generated.

3. Display

Display Page 1 Displayed. Sorting Rule None

全部で 1000 セットのプライマーが設計されました。



全部で 1000 セットのプライマーが生成された

「Display」ボタンをクリックして結果を表示させる

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。

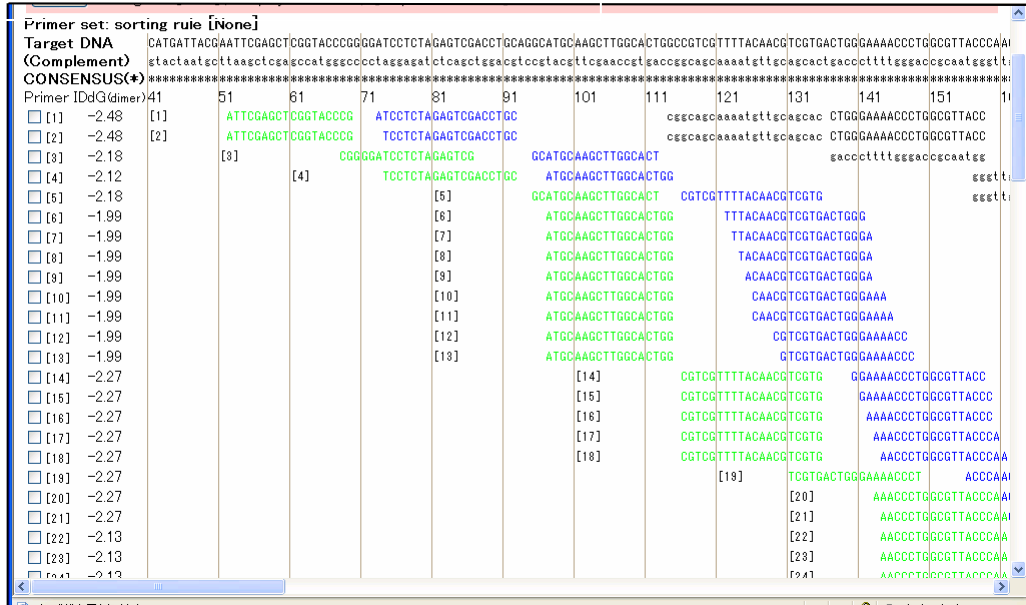
図 7. 5 結果の一覧表示画面(1 ページ目)

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

この部分避け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

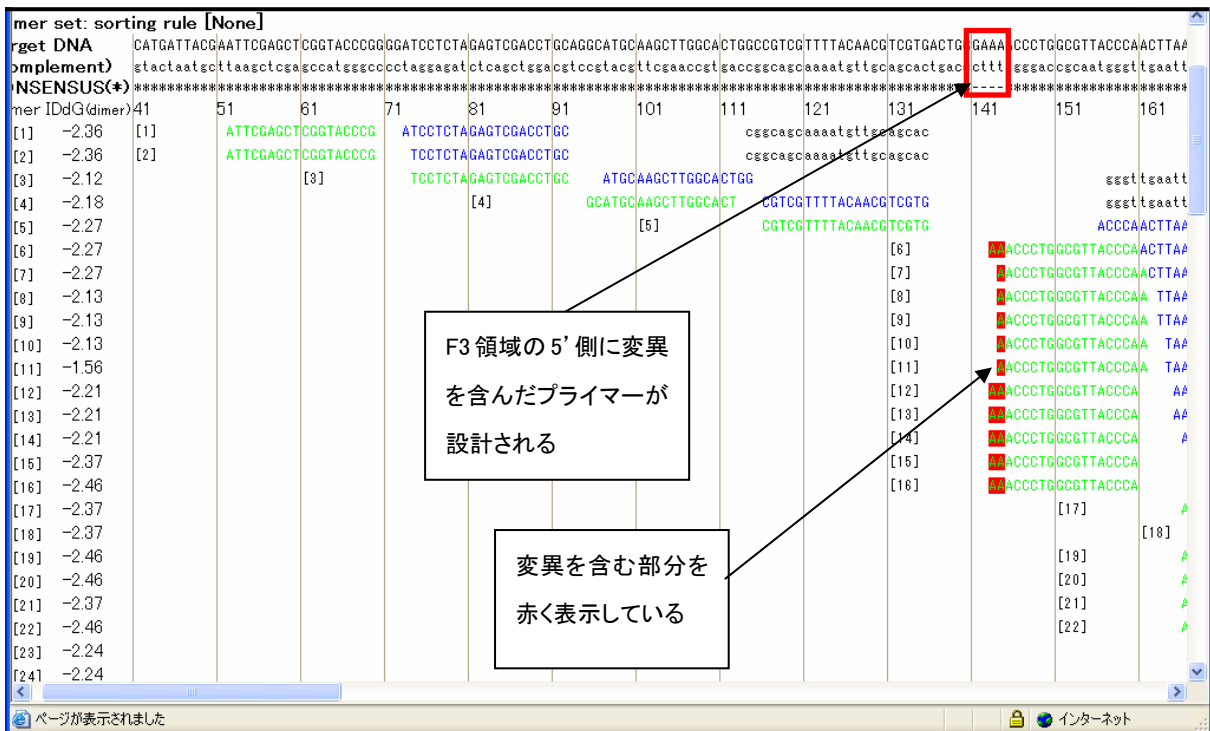
1)「F3 5' term」のボックスをチェックする

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)



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"/>
		F3 5'term	<input checked="" type="checkbox"/>	B3 5'term	<input type="checkbox"/>
	low level				
				<input type="button" value="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	AAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGAAAAACCCCTGCCGTTACCCA	ACT										
(Complement)	gtactaatgccttaagctcgagccatggccocctaggagatctcagotgzaicgtcgtacgt	togaacogtgaccggcagcaaaatgttcagcactgacccttttggacgcgaatgsgt	tga										
CONSENSUS(*)	*****												
Primer ID(dimer)	41	51	61	71	81	91	101	111	121	131	141	151	161
<input type="checkbox"/> [1]	-2.36	[1]	ATTCGAGCTCGGTACCCG	ATCCTCTAGAGTCGACCTGC					cggcagcaaaatgttcagc				
<input type="checkbox"/> [2]	-2.36	[2]	ATTCGAGCTCGGTACCCG	TCCTCTAGAGTCGACCTGC					cggcagcaaaatgttcagc				
<input type="checkbox"/> [3]	-2.12			TCCTCTAGAGTCGACCTGC			ATGCAAGCTTGGCACTGG					gsgtga	
<input type="checkbox"/> [4]	-2.18						GCATGCAAGCTTGGCACT	CGTCGTTTTACAACGTCGTG				gsgtga	
<input type="checkbox"/> [5]	-2.27							CGTCGTTTTACAACGTCGTG			ACCCTGGCGTTACCC		
<input type="checkbox"/> [6]	-2.27							CGTCGTTTTACAACGTCGTG			ACCCTGGCGTTACCC		
<input type="checkbox"/> [7]	-2.27							CGTCGTTTTACAACGTCGTG			ACCCTGGCGTTACCC		
<input type="checkbox"/> [8]	-2.27							CGTCGTTTTACAACGTCGTG			ACCCTGGCGTTACCCA		
<input type="checkbox"/> [9]	-2.27							CGTCGTTTTACAACGTCGTG			ACCCTGGCGTTACCCAA		
<input type="checkbox"/> [10]	-2.27											ACCCA	ACT
<input type="checkbox"/> [11]	-2.27											ACCCTGGCGTTACCCA	ACT
<input type="checkbox"/> [12]	-2.27											ACCCTGGCGTTACCCA	ACT
<input type="checkbox"/> [13]	-2.13											ACCCTGGCGTTACCCAA	T
<input type="checkbox"/> [14]	-2.13											ACCCTGGCGTTACCCAA	T
<input type="checkbox"/> [15]	-2.13											ACCCTGGCGTTACCCAA	
<input type="checkbox"/> [16]	-1.56											ACCCTGGCGTTACCCAA	
<input type="checkbox"/> [17]	-2.21											ACCCTGGCGTTACCCAA	
<input type="checkbox"/> [18]	-2.21											ACCCTGGCGTTACCCAA	
<input type="checkbox"/> [19]	-2.21											ACCCTGGCGTTACCCAA	
<input type="checkbox"/> [20]	-2.37											ACCCTGGCGTTACCCAA	
<input type="checkbox"/> [21]	-2.46											ACCCTGGCGTTACCCAA	
<input type="checkbox"/> [22]	-2.37											ACCCTGGCGTTACCCAA	
<input type="checkbox"/> [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

The screenshot shows the primer design interface with the following sections:

- 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:** A table with columns for Peculiarity (high level to low level) and Permission (F1c, B1c, F2, B2, F3, B3 for 3' and 5' terms).

In the Mutation/Consensus table, the 'F2 3\' term' checkbox is checked. A yellow callout box on the left contains the text: 1) 「F2 3\' term」のボックスをチェックする. An arrow points from this box to the checked checkbox.

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	CGTCGTTTTACAACGTCGTG					
[5]	-1.99					[5]		ATGCAAGCTTGGCACTGG	TTTACAACGTCGTGACTGG					
[6]	-1.99					[6]		ATGCAAGCTTGGCACTGG	TTTACAACGTCGTGACTGG					
[7]	-1.99					[7]		ATGCAAGCTTGGCACTGG	TACAACGTCGTGACTGG					
[8]	-1.99					[8]		ATGCAAGCTTGGCACTGG	ACAACGTCGTGACTGG					
[8]	-1.99					[8]		ATGCAAGCTTGGCACTGG	CAACGTCGTGACTGG					
[10]	-1.99					[10]		ATGCAAGCTTGGCACTGG	CAACGTCGTGACTGG					
[11]	-2.27						[11]		CGTCGTTTTACAACGTCGTG					ACCCAA
[12]	-2.37												[12]	
[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	AATGCTACTACTATTAGTAGAATTGATGCCACCTTTTCAGCTCGCGCCCCAAATGAAAA	60
SeqB	-----AATTGATGCCACCTTTTCAGCTTCGCGTCCAAATGAACAT	40
SeqC	-----CTCGCGCCCCACTTGAAAA	20
	** **** ** *	
SeqA	ATAGCTAAACAGGTTATTGACCATTTGCGAAATGTATCTAATGGTCAAACCTAACTACT	120
SeqB	ATAGCTACACAGCTTATTGACCATTTGCGAAATGTATCTAATGGTCAAACCTAACTACT	100
SeqC	ATCGCTAAACAGGTCGTTGACCATATGCGAAGTGTATCTAATGGTCAAACCTAACTACT	80
	** **** ** *	
SeqA	CGTTGCGAGAATTGGGAATCAACTGTTACATGGAATGAACTTCCAGACCGGTACTTTA	180
SeqB	CGATGCGAGAATCGGAAATCAACTGTTACATGGAATGAACTTCCAGACCGGTACTTTA	160
SeqC	CGTTGGAAGAATTGGCAATCAACTGTAACATGAACTTGCAGACACCGGTACTTTA	140
	** ** * **** * *	
SeqA	GTTGCATATTTAAACATGTTGAGCTACAGCACCAGATTCAGCAATTAAGCTCTAAGCCA	240
SeqB	GTTGCATATGTAACCATGTTGAGCTACAGCAGAGTTTCAGCAATTAAGCTCTAAGCCA	220
SeqC	GTTGCATATTTAAATCATGTTGAGCTACAGCAACAGATTCAGCAGTAAGCTCTAAGCCA	200
	** * **** ** *	
SeqA	TCCGCAAAAATGACCTCTTATCAAAAGGAGCAATTAAGGTACTCTCTAATCCTGACCTG	300
SeqB	TCCGCAAAAATGACCTCTTATCAAAAGGAGCAATTAAGGTACTCTCTAATCCTGACCTG	280
SeqC	TCCGCAACTGTGACCTCTTAAACAAAAGGAGCAATTAAGGTACTCTCTAATCCTGACATG	260
	***** ** *	
SeqA	TTGAGTTTGCCTTCGGTCTGGTTCGCTTTGAAGCTCGAATTAACACGCGATATTTGAAG	360
SeqB	TTGAGTTTGCCTTCGGTCTGGTTCGCTTTGAAGCTCGAATTAACACGCGATATTTGAAG	340
SeqC	TCGGAGTTAGCTTCGGTCTGGTTCGCTTTGAAGCTCGAATTAACACGCGATAGTTGATG	320
	* **** * **** *	
SeqA	TCCTTCGGGCTTCTCTTAATCTTTTGTGCAATCCGCTTTGCTTCTGACTATAATAGT	420
SeqB	TCCTTCGGGCTTCTCTTAATCTTTTGTGCAATCCGCTTTGCTTCTGACTATAATAGT	400
SeqC	CCCTTCAGGCTTCTCTGAATCTTTTGTGCAATCCGCTTTGCTTCTGACTATAATAGT	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

The screenshot shows the 'PrimerExplorer' software interface. At the top, the file path is 'C:\Documents and Settings\ys80042\デスクトップ\Normal\Alignment.txt'. The main window displays a multi-sequence alignment of SeqA, SeqB, and SeqC. The alignment is shown with gaps (dashes) and asterisks indicating conserved regions. On the right side, there are several buttons and options for primer design: 'Set Mutation' (Mut/Cons, Clear), 'Fixed Primer' (F3, F2, F1, B1, B2, B3, Clear), and 'Design Option' (Default, Common, Specific). The 'Common' option is selected. At the bottom, there is a 'Generate' button and a status bar indicating '5 Primer set(s) were generated.' Two yellow callout boxes with arrows point to the 'Common' radio button and the 'Generate' button, with text: '1) 「Common」ボタンをクリック' and '2) 「Generate」ボタンをクリック'.

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。

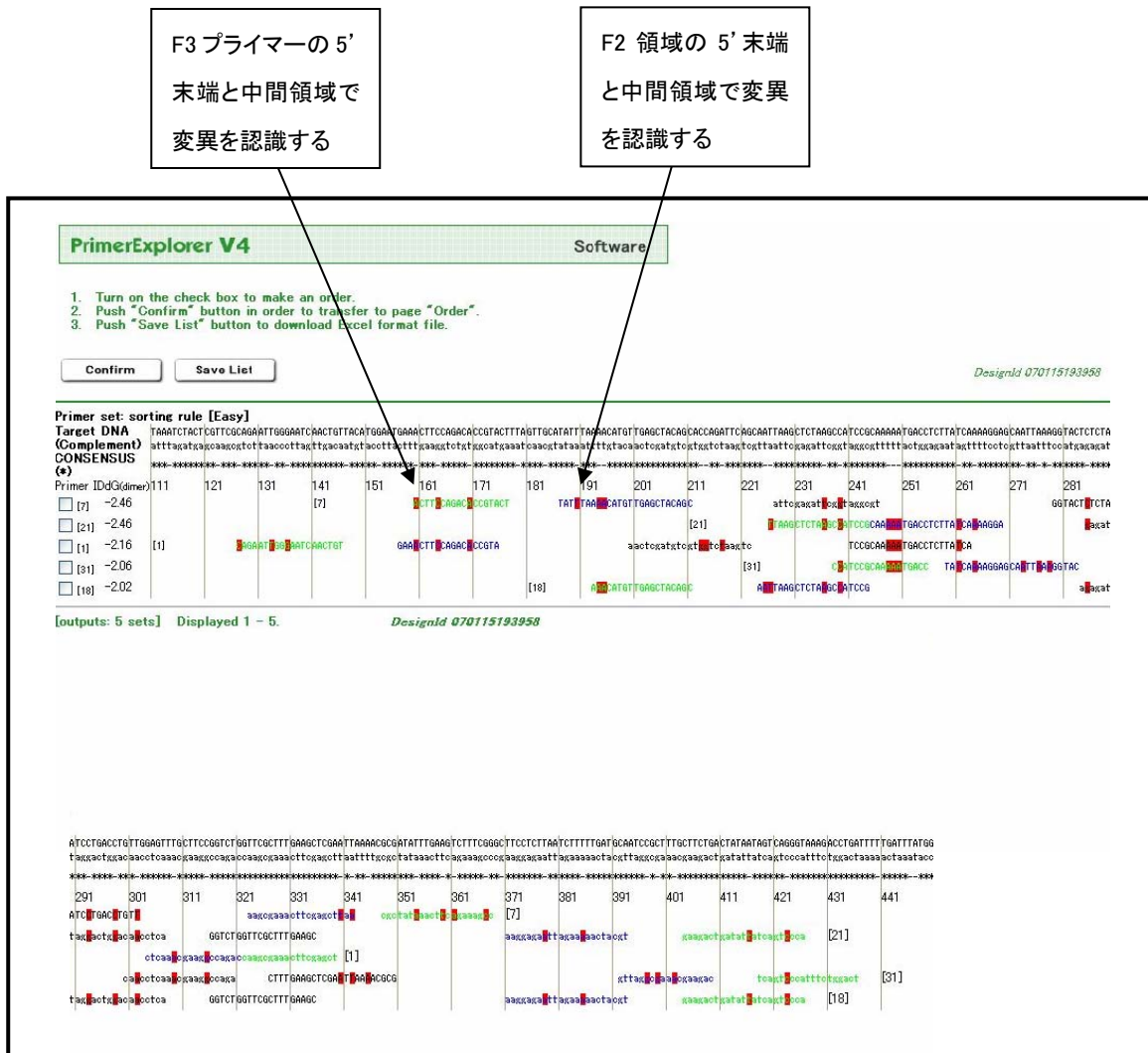


図 8.3 設計結果一覧画面

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.

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	CGAAGGCTCCAAATATCGC
FIP			45					TGCGGATTCCTAGAGCTTA-TATTAACATGTTGAGCTACAGC
BIP			43					GGTCTGGTTCGCTTTGAGC-TGCATCAAAGATTAGAGGAA

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					AGACCAGAGCACTCCAC-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	AGACCAGAGCACTCCAC
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-ATGACTCTTACAATCCG
BIP			43					GGTCTGGTTCGCTTTGAGC-TGCATCAAAGATTAGAGGAA
F2	224	244	21	57.44	-2.40	-5.68	0.43	ATGACTCTATGCTCCG
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

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。

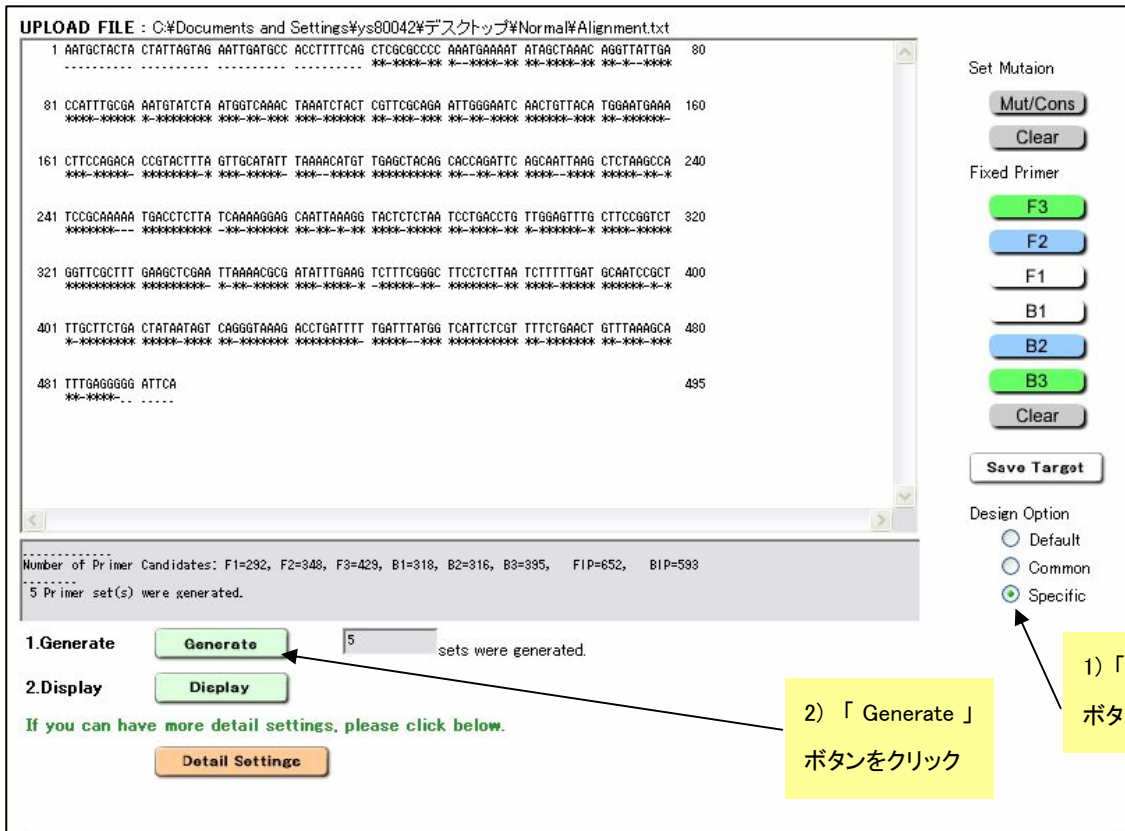


図 9.1 プライマー設計画面

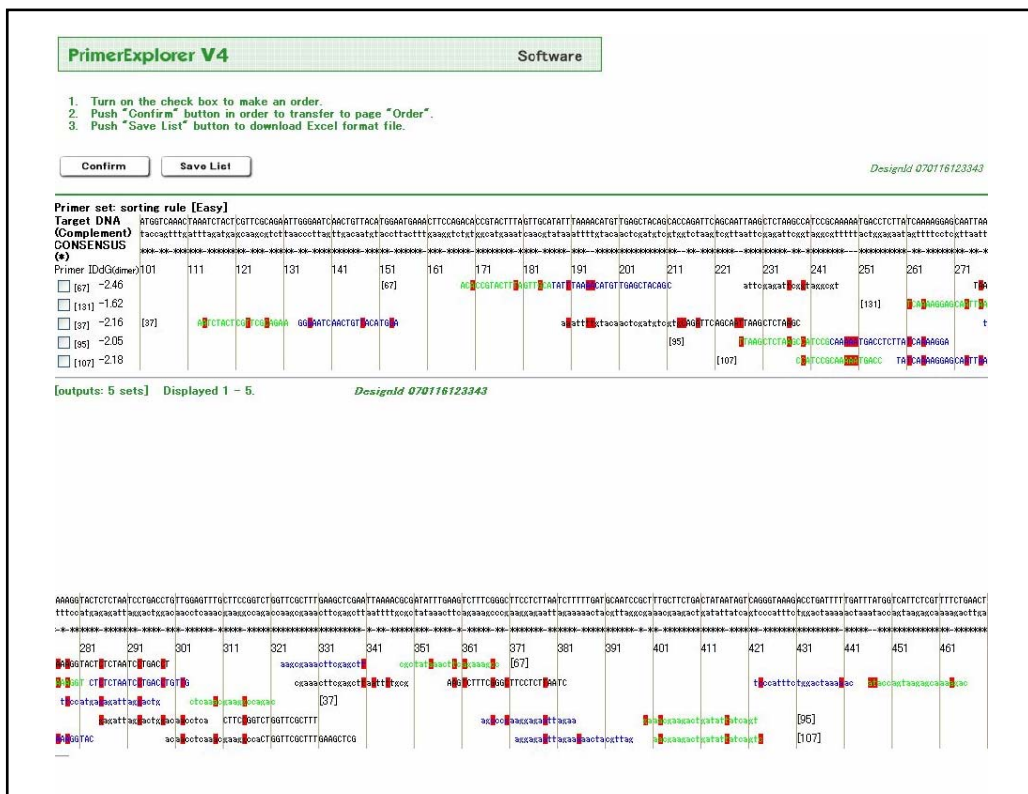


図 9.2 設計結果一覧画面

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	GCrates	Sequence
F3	168	186	19	55.94	-6.33	-5.57	0.42	ACCGTACTTGGTTCA
B3	348	368	21	56.71	-5.30	-5.16	0.43	CGAAGCCCAATATCC
FIP	45 TGCGGATGCTTAGAGCTTA-TATTAATGTTGAGCTACAGC							
BIP	43 TGGTACTTCTAATCAGACCTCGAGCTCRAAGCGAA							
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	CGAGCTCRAAGCGAA
B1c	275	299	25	60.01	-3.69	-5.25	0.40	TGGTACTTCTAATCAGAC

Primer Information

2 ID:131 dimer(minimum)dG=-1.62

label	5'pos	3'pos	len	Tm	5'dG	3'dG	GCrates	Sequence
F3	261	281	21	55.33	-3.69	-4.50	0.33	CAAGAGCACTTGGT
B3	446	466	21	55.17	-4.02	-4.13	0.38	CAGCAGCAGAGTGGCC
FIP	45 GCCTTTTCGAGCTCRAAGC-CTCTAATCAGACCTGTG							
BIP	46 AAGCTTTCAGTTCCTCTATC-CAGAGTCAAGTCTTACCT							
F2	283	303	21	56.73	-4.43	-4.66	0.48	CTCTAATCAGACCTGTG
F1c	326	349	24	61.49	-5.84	-5.01	0.47	AGATTTTCGAGCTCRAAGC
B2	422	442	21	55.38	-3.44	-4.92	0.38	CAGAGTCAAGTCTTACCT
B1c	358	382	25	62.64	-4.24	-2.75	0.44	AAGCTTTCAGTTCCTCTATC

Primer Information

3 ID:37 dimer(minimum)dG=-2.16

label	5'pos	3'pos	len	Tm	5'dG	3'dG	GCrates	Sequence
F3	113	131	19	55.44	-2.98	-5.26	0.42	ATTACTCTCGAGAA
B3	304	321	18	57.09	-5.35	-4.01	0.56	CAGACCAGAGCACTC
FIP	46 TGTCTAGCTCAAGCATTAAGGATCACTGTGCATG							
BIP	46 AAGTTCAGCAATAGCTCTAGC-GTCAAGTATAGAGTACCT							
F2	134	154	21	57.29	-4.85	-4.91	0.43	GGATCAACTGTACATGA
F1c	189	213	25	60.35	-5.90	-2.09	0.36	TGTCTAGCTCAAGCATTAAG
B2	277	297	21	55.25	-5.35	-4.08	0.43	GTCAAGTATAGAGTACCT
B1c	214	238	25	60.09	-3.90	-4.42	0.40	AAGTTCAGCAATAGCTCTAGC

Primer Information

4 ID:95 dimer(minimum)dG=-2.05

label	5'pos	3'pos	len	Tm	5'dG	3'dG	GCrates	Sequence
F3	226	244	19	55.93	-4.09	-5.68	0.47	TAGACTCTAGCATCCG
B3	399	422	24	55.82	-3.99	-5.01	0.33	TGACTATTATAGCAGAGCAAG
FIP	48 ACTCCAGCATCTCAGATTAGACCAATGACCTCTTACAGAGGA							
BIP	40 CTCCTGCTCAGTCCCTT-AGGATTAGAGGAATCCAG							
F2	245	269	25	57.71	-3.44	-4.36	0.32	CAGTACCTCTTACAGAGGA
F1c	285	307	23	61.09	-5.25	-3.43	0.48	ACTCCAGCATCTCAGATTAGA
B2	365	384	20	57.78	-3.40	-7.38	0.45	AGGATTAGAGGAATCCAG
B1c	311	330	20	62.22	-5.63	-5.68	0.55	CTCCTGCTCAGTCCCTT

Primer Information

5 ID:107 dimer(minimum)dG=-2.18

label	5'pos	3'pos	len	Tm	5'dG	3'dG	GCrates	Sequence
F3	238	255	18	55.83	-5.35	-4.90	0.50	CATCCGCAATGACC
B3	401	423	23	55.03	-4.74	-4.91	0.35	TGACTATTATAGCAGAGCA
FIP	45 ACAGAGCACTCCAGCA-TAAGAGAGCACTTGGTAC							
BIP	45 CTGTTCCCTTGAAGCTCG-AGTTCATCAAGATTAGAGGA							
F2	259	283	25	57.29	-3.15	-4.57	0.32	TATAGAGGCACTTGGTAC
F1c	299	318	20	61.92	-6.53	-5.17	0.50	ACAGAGCACTCCAGCA
B2	372	396	25	57.80	-4.91	-4.94	0.32	GATTTCATCAAGATTAGAGGA
B1c	319	338	20	61.15	-5.00	-6.26	0.55	CTGTTCCCTTGAAGCTCG

図 9.3 プライマー情報詳細画面

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 TCITTTTATG 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。

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: 070215740798

Primer set: sorting rule (None)
Target DNA CTATTAGAGAAATGGATGGACGCTTTTAGGCTGGGGGCGAAATGAAATAGAGTAAGAGGCGATTATGACGATTTGGAGAAATGATCTAATGTCAGAACTGCCTTCGAGAAATGGAAATGACCTGTACATGGAAG...

Primer ID	Gene	Start	End	Seq	Strand
11	D4S106m11	11	21	TTTCCCTCCTTTGACCTCGCCCC	+
12	D4S106m11	22	51	GGAGCTGAAAGCGTTATGACGATTTGGAGAAATGATCTAATGTCAGAACTGCCTTCGAGAAATGGAAATGACCTGTACATGGAAG...	-
13	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	+
14	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	-
15	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	+
16	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	-
17	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	+
18	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	-
19	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	+
20	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	-
21	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	+
22	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	-
23	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	+
24	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	-
25	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	+
26	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	-
27	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	+
28	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	-
29	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	+
30	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	-
31	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	+
32	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	-
33	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	+
34	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	-
35	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	+
36	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	-
37	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	+
38	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	-
39	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	+
40	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	-
41	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	+
42	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	-
43	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	+
44	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	-
45	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	+
46	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	-
47	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	+
48	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	-
49	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	+
50	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	-
51	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	+
52	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	-
53	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	+
54	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	-
55	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	+
56	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	-
57	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	+
58	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	-
59	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	+
60	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	-
61	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	+
62	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	-
63	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	+
64	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	-
65	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	+
66	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	-
67	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	+
68	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	-
69	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	+
70	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	-
71	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	+
72	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	-
73	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	+
74	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	-
75	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	+
76	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	-
77	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	+
78	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	-
79	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	+
80	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	-
81	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	+
82	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	-
83	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	+
84	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	-
85	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	+
86	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	-
87	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	+
88	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	-
89	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	+
90	D4S106m11	30	40	TGACCATTC	-

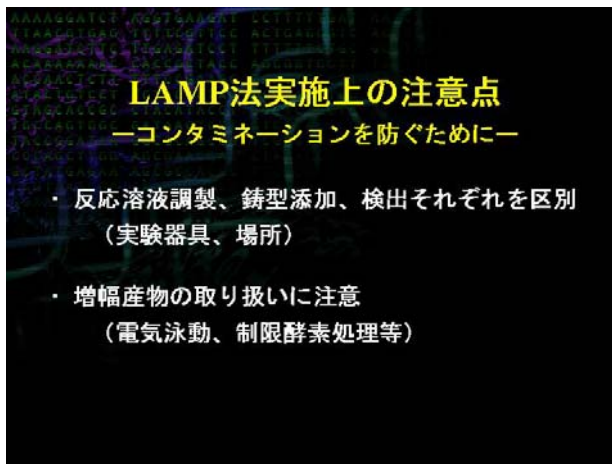
[Output: 1000 sets] Displayed 1 - 100. DesignID: 080215740229

図 9.5 設計結果一覧表示画面

研究の進め方とテクニック

研究の進め方とテクニック

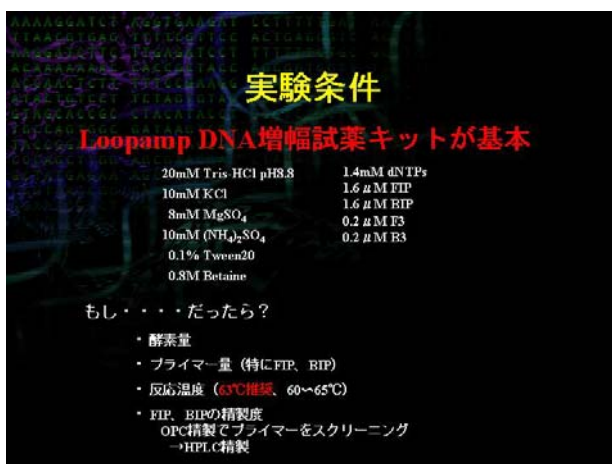




LAMP 法実施上の注意点はコンタミネーションを防ぐということが最も重要です。

その対策の1つは、反応溶液の調製、鑄型の添加、検出をそれぞれ区別して別々に行います。これは、実験器具や、実験する場所を区別します。もしも別々の実験場所を準備できない場合には、反応溶液の調製と鑄型の添加を別のクリーンベンチで行うことで同じ部屋で実験することが可能です。ただし、検出は必ず別の部屋で行って下さい。

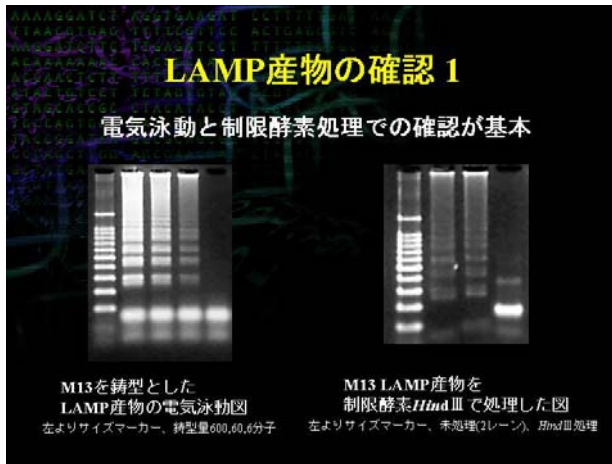
また、増幅産物の取り扱い時が最もコンタミネーションを起こしやすいので、電気泳動や制限酵素で目的の増幅産物を確認する際には十分に注意を払って下さい。



LAMP 法の実施条件は Loopamp DNA 増幅試薬キットに示されている条件が基本です。

さらに増幅速度、感度を上げる場合は以下のような検討をしてください。

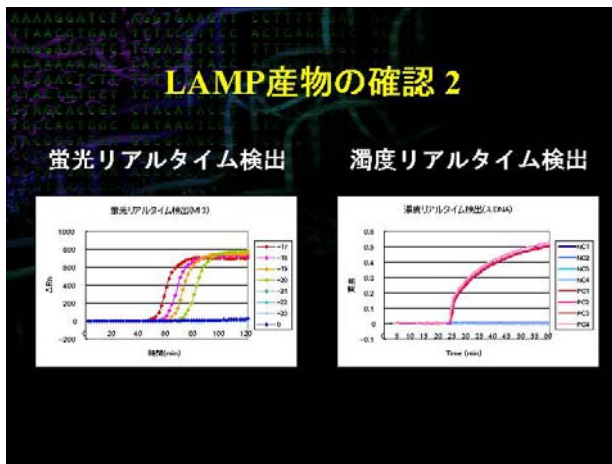
- ・ 酵素量、プライマー量 (特に Inner primer の量)
- ・ 反応温度 (63°Cを推奨していますが、60~65°Cで検討して下さい)
- ・ Inner primer の精製度 (はじめにプライマーセットをスクリーニングする際は OPC 精製で十分ですが、それ以後の検討では HPLC で精製されたものを使用して下さい)



LAMP 産物の確認の基本は、電気泳動と制限酵素での処理です。

左側の図が M13 を鋳型とした LAMP 産物の電気泳動図です。左から順にサイズマーカー、鋳型量 600 分子、60 分子、6 分子、ネガティブコントロールとなっています。

Target の M13 配列上には *Hind*III サイトが 7ヶ所存在します。右側の図は左から順にサイズマーカー、未処理の 2レーン、*Hind*III で処理したのとなっています。*Hind*III によりきれいに消化されており、目的のものが増えていることが確認されました。



LAMP 産物の確認は電気泳動による方法が基本ですが、これは反応終了後にチューブのフタを開けなければいけないため、コンタミネーションの危険が高くなります。そこで、はじめに電気泳動による確認を実施した後は、閉鎖系での検出をお奨めします。例えば蛍光リアルタイム検出や濁度リアルタイム検出が挙げられます。

左側の図は M13 を鋳型として蛍光リアルタイム検出をした結果です。鋳型量を 10^{-17} mol/tube から 10^{-23} mol/tube としていますが、鋳型量依存的に増幅速度が変化しました。

右側の図は λ DNA を鋳型として濁度リアルタイム検出をした結果です。NC1 から NC4 がネガティブコントロール、PC1 から PC4 がポジティブコントロールですが、非常に再現性の良い結果が得られました。

試薬の取り扱い

- ・ PCRでの一般的注意とほぼ同じ
- ・ 試薬は-20℃保存
- ・ プライマーは原液を-80℃保存
- ・ dNTPも徐々に劣化するので注意
- ・ 鋳型およびプライマーなどのDNAはTE等で保存 (pH8~9)
- ・ 低濃度ものは劣化しやすいので注意

LAMP 法の検討を進めていくと、はじめは反応が非常に上手くいっていたが、途中から上手くいけなくなるという現象にあうことがあります。そのような場合には試薬の劣化が疑われますので、試薬の取り扱いに注意して下さい。一般的な注意は PCR による実験時のものとほぼ同じで、試薬はすべて -20°C 保存、プライマーは原液を -80°C で保存して下さい。基質の dNTP も徐々に劣化するので注意が必要です。鋳型やプライマーなどの DNA を水などで調製した場合は劣化が速くなる可能性がありますので、できれば TE などの Buffer 中で保存して下さい。特にターゲットの鋳型 DNA については低濃度ものは非常に劣化しやすいので注意が必要です。

用語集

用語集

ATリッチ、GCリッチ:

核酸のGC含量は生物により、また細胞の核と核以外由来によっても異なるが、GC含量が少ないものをATリッチ、GC含量が多いものをGCリッチという。

bp:

base pair(塩基対)の略語。核酸の塩基のうち定まった組み合わせの2個が互いに水素結合によって対合したもの。核酸の複製、転写、mRNAとtRNAの相互作用に重要な役割を果たす。DNAではアデニン(A)とチミン(T)、グアニン(G)とシトシン(C)、RNAではAとウラシル(U)、GとCが対合する。2本鎖DNAの長さは、しばしば塩基対の長さ(bp)で表される。

dNTP:

dATP、dTTP(あるいはdUTP)、dGTP、dCTPを等量ずつ含む溶液で、核酸合成では基質として使われる。核酸合成の際、反応液中のdNTP濃度が高ければ、合成の際のヌクレオチド取り込みの間違いが多くなると言われている。

FASTA形式:

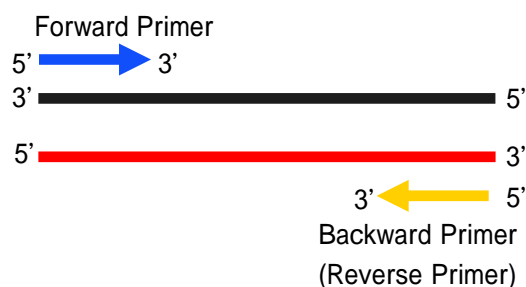
FASTAはデータベース検索により遺伝子やタンパク質の配列の類似性を調べることのできるコンピュータプログラムである。長い配列で類似性を保っているものを検索するのに適している。FASTA形式は配列解析プログラムで最もよく使われる形式であり、以下のようなフォーマットである。

```
>AA987701(genbank-upd)      先頭行は、>で始まるコメント(配列の名前や由来など)
taaagaagtaagcctttatttccttggtttgca    2行以降が配列データ
tggttcaaccttagctggggctgcagcagcac
>AA987701(genbank-upd)      複数の配列の場合は、続けて記入
taaagaagtaagcctttatttccttggtttgca
tggttcaaccttagctggggctgcagcagcac
```

Forward側、Backward側:

DNAの複製開始にはプライマーが必須で、PCRでは最低2種類、またLAMP法では最低4種類のプライマーが必要となるが、それらはDNA2本鎖に対して以下に示すように注目する遺伝子のコード領域の5'側を左に3'側を右に示した場合、5'→3'方向がForward側およびその逆がBackward側のものである。

PCRの場合



LAMP法の場合

⇨ p.51 LAMP法 図説(1)へ

GC 含量:

核酸の塩基組成を表す時、G と C が全体の中で占める割合(パーセント)をいう。プライマーの GC 含量は Target 遺伝子との結合を安定にさせるためには AT リッチにならないようにする。また、2 重らせん状態の核酸の場合、塩基対の組み合わせは決まっているため、全体の中で(G + C)がどれだけの割合になるかを示す GC 含量はその核酸の性質を表す指標の一つとなる。DNA の GC 含量は生物ごとに異なり、高等動物では 42%を中心とした狭い範囲の値をとるが、細菌では 75 ~ 25%までの広範囲に渡る。

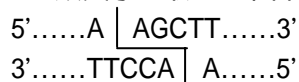
GenBank 形式:

GenBank は米国 NCBI(National Center for Biotechnology Information)で構築されている国際的な公的 DNA データベースである。GenBank では、データベースエントリの形式は以下のようになっている。

LOCUS	遺伝子座の名前、配列の長さの種類、生物分類、登録の日付
DEFINITION	エントリの記述
ACCESSION	もともとのアクセッション番号
KEYWORDS	このエントリを相互参照するためのキーワード
SOURCE	DNA が由来する生物
ORGANISM	生物の記述
REFERENCE	文献情報
COMMENT	生物学的機能やデータベースの情報
FEATURES	位置あるいは領域ごとの配列についての情報
source	配列の範囲、もとの生物
misc_signal	配列の範囲、機能やシグナルの種類
mRNA	配列の範囲、mRNA
CDS	配列の範囲、タンパク質のコード領域
intron	配列の範囲、イントロンの場所
Mutation	配列中の位置、変異による配列の変化
BASE COUNT	A、C、G、T、そのほかの記号の数
ORIGIN	配列の始まりを示す文字列
	1 gaattcgata aatctctggt ttattgtgca gtttatggtt ccaaaatcgc
	51 atatactcac agcataactg tatatacacc cagggggcgg aatgaaagcg
//	配列の終わりを示す記号

Hind :

制限酵素の一種。遺伝子操作の実験によく用いられる。*Haemophilus influenzae* Rd から調製されるため、その頭文字を取って命名されている。認識・切断塩基配列は以下の通りである。



HPLC 精製:

合成オリゴヌクレオチドの精製グレードの一つ。

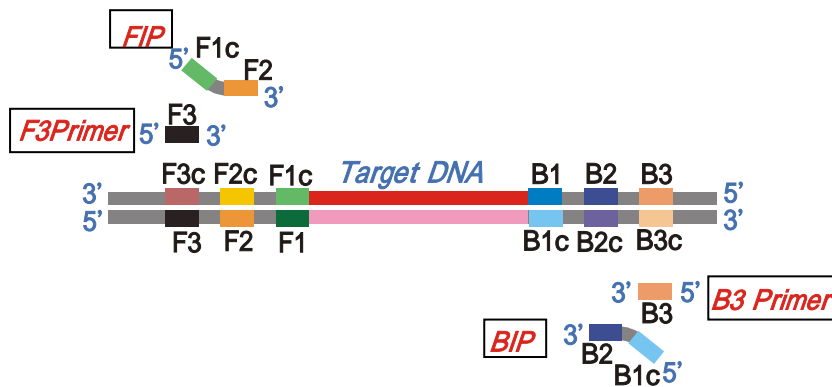
LAMP 法:

LAMP 法(Loop mediated isothermal Amplification)は、栄研化学(株)が独自に開発した簡易、迅速、精確、安価な増幅として遺伝子増幅技術である。遺伝子技術法では PCR 法と比べると、特異性、増幅

効率が高く、65 付近の一定温度で増幅を行えるという利点がある。

等温での増幅を可能とした大きな特徴は、2本鎖をはがしながら合成を進める鎖置換型 DNA ポリメラーゼによって温度変化サイクルによる2本鎖変性 アニールング - DNA 合成というステップ無しに合成が進む 独自の4種の(Target 遺伝子上の6箇所の領域を認識する)プライマーによって増幅される遺伝子の末端に形成されるループ構造を介して、自己の構造を鋳型としてDNA合成が進む、という2点。以下の図に増幅の流れを大まかに示す。

(1)

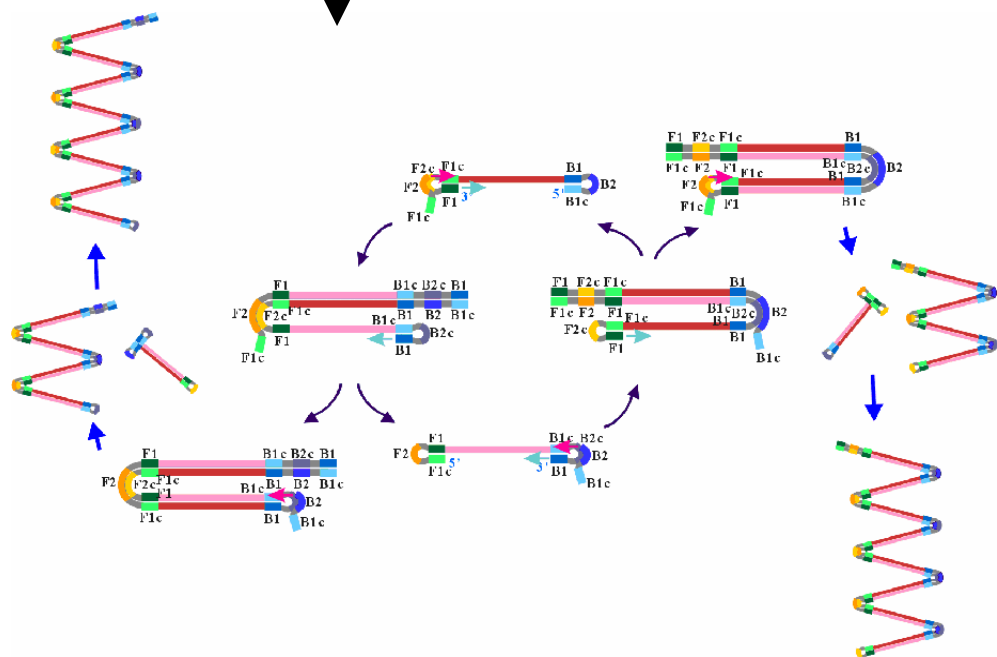


鎖置換型 DNA ポリメラーゼの働きにより 65 付近の定温で複数段階の反応が起こる

(2)



(3)



6種類のプライマーを加えて(1)、何段階かの反応を経ると両端にループ構造を持った1本鎖ができる。(2)これが起点となって、様々な部分にプライマーが結合して増幅反応が進展し、同一鎖上にループ領域を挟んで互いに相補的な配列を繰り返す構造をもつ様々なサイズの増幅産物が合成される。

Loopamp DNA 増幅試薬キット:

LAMP法の原理を用いた研究用試薬製品である。中味としては、buffer、基質、鎖置換型DNAポリメラーゼがセットになっており、ユーザーが調べたいサンプルとそのターゲット遺伝子用に設計されたLAMP用プライマーを用意することによりあらゆる分野での利用が可能である。WebSERVE/e Genome Orderにて購入できる。

Loop primer/ループプライマー:

LAMP法において、増幅反応の起点構造であるダンベル様構造及び増幅途上産物に形成されるループ構造領域の内、5末端側のLoopの1本鎖部分(B1領域とB2領域の間、あるいはF1領域とF2領域の間)に相補的な配列を持つプライマー(それぞれLoop primerB、Loop primerF)。ループプライマーを用いることによりDNA合成の起点が増え、増幅反応時間の短縮、特異性の向上が可能となる。

M13 ファージ:

繊維状の1本鎖DNAファージ。大腸菌のF繊維を介して宿主に感染し、菌体内に取り込まれる。宿主内で1本鎖DNAは、2本鎖の複製型となり、それを鋳型として1本鎖DNAが合成され、新しくつくられた子ファージ粒子内に組み込まれた後、宿主大腸菌を溶菌することなく菌体外に放出される。このファージはクローニングベクターとしても有用であり、ジデオキシ法を用いた塩基配列の決定に際し1本鎖DNAの調製用に広く用いられている。

Nearest-Neighbor 法:

遺伝子のT_m値を予測する方法の一つで、現在主流になっているものである。すべての隣接塩基に関する熱力学的な因子を基に以下の式によりT_m値を求める。

$$T_m = H \times 1000 / (S + R \ln(C/4)) - 273.15 + 16.6 \log[Na^+]$$

R: 気体定数 = 1.987 cal / (mol K)
H: エンタルピー (kcal / mol)
S: エントロピー (eu)
C: オリゴヌクレオチド濃度 (M)
[Na⁺]: ナトリウムイオン濃度

OPC 精製:

合成オリゴヌクレオチドの精製グレードの一つ。ただし、オリゴヌクレオチドメーカーにより同グレードでも名称が異なる。

PCR:

PCR (polymerase chain reaction) は、特定のDNA領域をはさんだ2種類のプライマーとDNA合成反応の試験管内における繰り返して、その特定DNA領域を数十万倍に増幅する方法である。複製反応のプライマーとしては増幅部両端の塩基配列を含む合成オリゴヌクレオチドを用いるのが普通で、反応は1)DNA2本鎖の解離、2)オリゴヌクレオチドとのアニーリング、3)DNAポリメラーゼによる相補鎖合成、の3反応の繰り返し(通常20回~30回)から成る。1985年に米国Cetus社が開発。

TE buffer:

核酸溶解用buffer(10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA)。2価の金属イオン(Mg²⁺など)をキレートす

る作用をもつ EDTA (ethylenediamine-N,N,N',N'-Tetraacetic acid,キレート剤; 試料中に存在する微量金属除去剤)を含むため、2 価の金属イオンを必要とするヌクレアーゼ(核酸分解酵素)の活性を阻害し、核酸を保存させる効果をもつ。

Tm 値:

生体高分子の融解温度のこと。核酸を含む溶液の場合は、温度上昇によって塩基対間の水素結合の切断による 2 重らせん核酸構造が 50%失われ、2 本鎖 DNA の 50%が 1 本鎖 DNA になる温度をいう。GC 間では 3 つ、AT 間では 2 つの水素結合をもつため、GC 塩基対に富む DNA の方が熱変性に対して抵抗性があり Tm 値が高い。プライマーの結合能は一般的に Tm 値で表される。

アニーリング:

2 本鎖の DNA を 1 本鎖に解離させた後、解離した 1 本鎖 DNA を再び 2 本鎖 DNA に会合させること。DNA 特有の 2 重らせん構造が回復するので、アニーリングを再生 (renaturation)ともいう。2 本鎖 DNA は、加熱やアルカリ処理を加えると 1 本鎖 DNA に解離する。解離した 2 本の DNA は条件を整えてやると再び水素結合を形成し、完全に元の 2 重らせんになる。

オリゴ濃度:

本文 p.5 上段のスライド中のオリゴ濃度とは、オリゴヌクレオチドの濃度、つまりプライマー濃度のことである。

5' 末端、3' 末端:

核酸の各ヌクレオチドは、五炭糖の 5 番目の炭素の隣の 3 番目の炭素の間でリン酸ジエステル結合しているが、両端では -OH 基のままで存在する。それぞれを 5' 末端、3' 末端といい、1 本の核酸では通常左側が 5' 末端で上流とよび、右側が 3' 末端となり下流とよぶ。

クローニング:

遺伝子のクローニングは、不特定多数の DNA 断片をベクターに挿入した組み換え体 DNA を宿主に導入して得られたコロニー又はプラークから目的の DNA 断片をもつものを検出し、その DNA を単離すること。

自由エネルギー:

熱力学状態関数の 1 つ。通常の実験室条件下における熱力学的平衡の基準を表す。状態が変化可能な系は自由エネルギー極小の方向へと変化する。化学反応においても同様で、化学平衡状態では系の自由エネルギーが極小となる。現在実用されているものとしてはギブスの自由エネルギーとヘルムホルツの自由エネルギーがある。

制限酵素:

特定の配列を認識し DNA を切断する酵素の総称。酵素活性に必要な因子と切断様式により、I 型、II 型、III 型に分けられる。細菌類に広く分布しており、酵素の種類や認識配列は菌種によって異なるので、種類はきわめて多い。

濁度リアルタイム検出:

LAMP 法により遺伝子増幅を行いながら、同時に増幅副産物であるピロリン酸マグネシウムの白濁を検出することにより、遺伝子増幅反応をリアルタイムに検出すること。このピロリン酸マグネシウムの白濁度検出は LAMP の増幅効率の高さと特異性の高さにより可能となったものである。

電気泳動:

電圧をかけることによって物質が、その荷電に応じ、正負いずれかの電極へ移動する現象を利用した分析・分離法。電界をかける対象に、溶液、ろ紙、ゲル状物質、両性担体などを用いる。

核酸の電気泳動法で、比較的大きな分子量 (60 ~ 100kbp) の DNA を分離する際はアガロース・ゲル、小さな分子量 (1kbp 以下) の DNA を分離する際はアクリルアミド・ゲルが担体として用いられる。

二次構造:

プライマーの二次構造とは、プライマー自身の相補配列部分が結合して形成するヘアピン構造のこと。プライマー配列によりヘアピン構造の形成されやすさは大きく異なる。プライマー自身がヘアピン構造を形成してしまうと Target 遺伝子に結合できなくなってしまうたり、他の予期していない遺伝子と結合してしまい、偽陽性の原因になることがある。

プライマー:

一般に DNA ポリメラーゼに伸長反応を開始させるために Target 遺伝子と 2 本鎖を形成し 3 末端 -OH を供給するオリゴヌクレオチドをプライマーという。DNA ポリメラーゼの作用によりプライマーの 3 末端 -OH 部分に、鋳型 DNA 配列に相補的なヌクレオチドを付加しながら 5 側から 3 側への伸長反応が進む。

プライマーダイマー:

プライマー同士がハイブリダイズして形成する構造のこと。試験管内で DNA 合成反応を行う遺伝子増幅法では、反応液中のプライマー濃度は Target 遺伝子の濃度に比べて圧倒的に多くする必要があるので、プライマー同士がハイブリダイズしやすい構造を持っているとプライマーダイマーを形成し、Target 遺伝子とのハイブリダイゼーションが大幅に抑制されてしまう。

ブレンテキスト形式:

配列情報のみを以下のように記述する形式。

```
ctcgaggact ggggaccctg caccgaacat ggagaacaca acatcaggat tcctaggacc
cctgctcgtg ttacagggcg ggtttttctt gttgacaaga atcctcacia taccacagag
tctagactcg tggtagactt ctctcaattt tctaggggga gcaccacgt gtcctggccc
```

変異:

突然変異のこと。遺伝子の塩基配列に変化が生じたためにもたらされる遺伝形質の変化。突然変異の単位は大きさの点からゲノム、染色体、染色体の一部、遺伝子、ヌクレオチドなどに分類される。また遺伝子の変化の仕方による分類からは点変異、欠失、重複、逆位、挿入、転座などと区別される。突然変異の起こりうる単位はさまざまであるから、その表現効果も著しい変化を伴うものから統計的な処理をして初めて検出されるものまでである。

末端安定性:

プライマーと鋳型遺伝子が形成する 2 本鎖 DNA における各プライマーの 3 末端および 5 末端の 2 本鎖形成度合い (形成され易さ) のこと。LAMP 法プライマー設計支援ソフトでは Nearest-Neighbor 法により G (自由エネルギー変化) を計算し、安定性を見ている。

