

LAMP 法プライマー設計の手引き

(PrimerExplorer V5)

栄研化学株式会社
マーケティング推進室

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 V5 のご紹介

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

PrimerExplorer V5 の画面ボタン説明

1. 通常プライマー設計画面説明(イーजी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जीモード)	11
4. 詳細設計画面(エキスパートモード)	12

LAMP 法プライマー設計支援ソフトによるプライマー設計の実例

1. M13 を鋳型(Target)としたプライマーの設計	13
1.1 Target 配列のアップロード	13
1.2 プライマーの設計(イーजी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 プライマーセットの選択	22
2. AT rich 配列でのプライマー設計	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ー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. ループプライマーの設計	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	48
9. 特異的プライマーの設計	51
9.1 イージーモードでの設計	51
9.2 エキスパートモードでの設計	53

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—	55
実験条件	55
LAMP 産物の確認1	56
LAMP 産物の確認2	56
試薬の取り扱い	56

用語集	57
-----	----

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

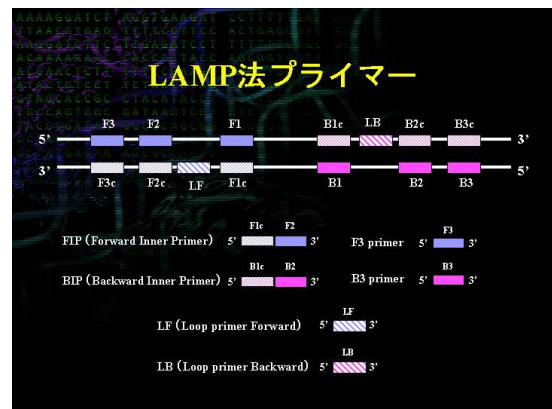
PrimerExplorer V5 のご紹介

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。

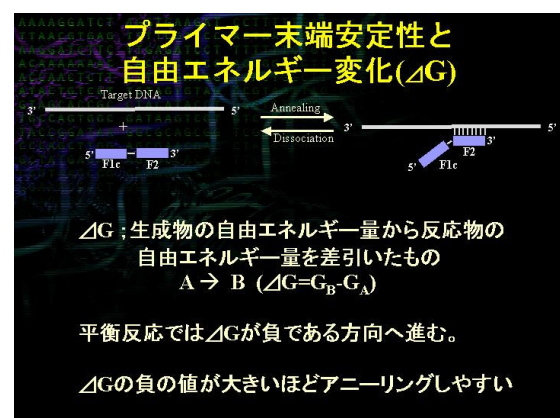
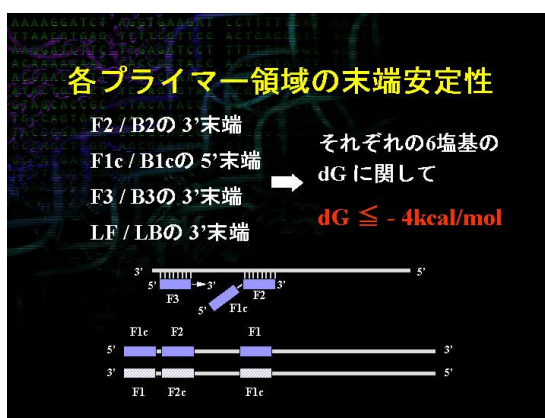
T_m 値計算実験条件としては、塩濃度やオリゴ濃度の影響を受けやすいため、一定条件での算出が望ましいとされています (オリゴ濃度を $0.1 \mu\text{M}$ 、ナトリウムイオン濃度を 50mM 、マグネシウムイオン濃度を 4mM)。

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

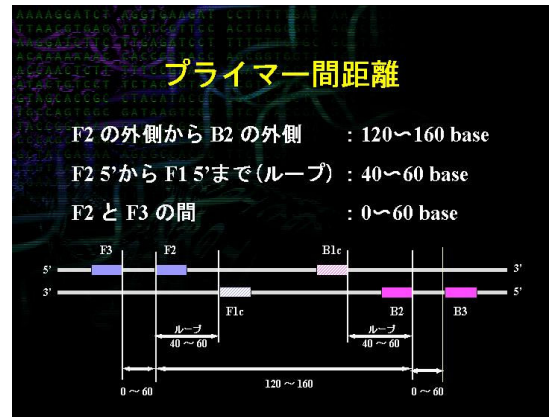
特に Inner primer に関しては、極端に二次構造をとらないように設計します。

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。

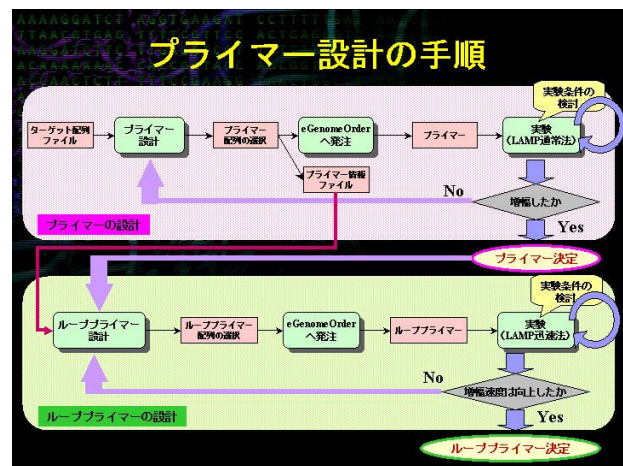
F2 領域の 5' 末端から F1 領域の 5' 末端まで(ループを形成する部分)は 40 から 60 base になるように設計します。F2 領域と F3 領域の間の距離は 0 から 60 base になるように設計します。



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、満足のない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。もし満足のない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 V4	Primer Explorer V5
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	○	○
プライマーセット配列情報保存機能	×	○

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

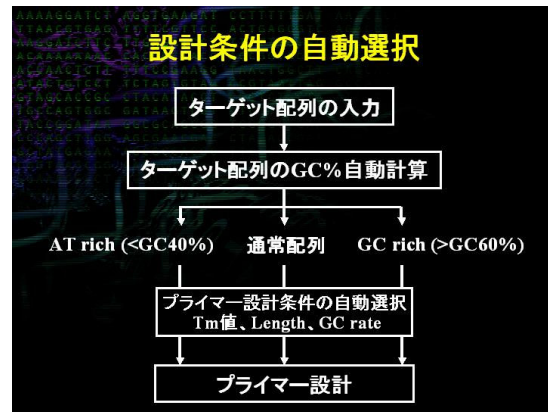
ユーザー自身がプライマー設計条件を入力してプライマーを設計します。デフォルトとして、通常配列(45%<GC<60%)を対象としたプライマー設計条件があらかじめ入力されています。ターゲット配列が AT rich(GC 含量<45%)または GC rich 配列(GC 含量>60%)の場合には、T_m 値、Length、GC 含量について以下の条件を設定してプライマーを設計します。

	T _m 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となります。

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。

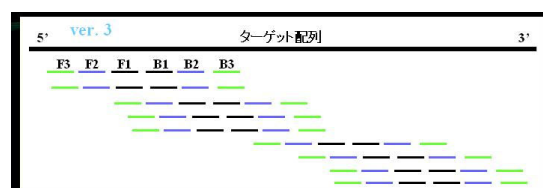
4.6 ループプライマーの設計

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

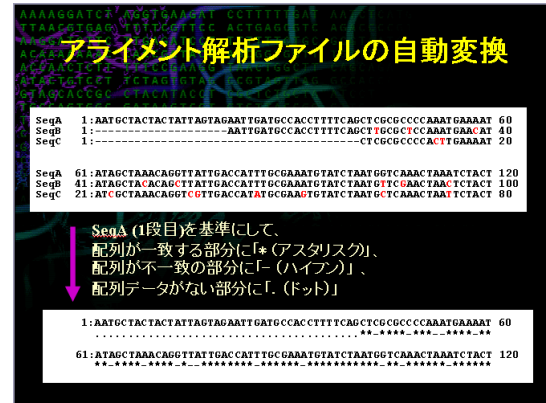
変異株を対象にしてプライマーを設計する場合に、デフォルト状態でプライマー設計を行うとランダムにプライマーがつけられ、変異部位を含んだプライマーが設計されることがあります。一般的に、野生株と変異株を共通のプライマーで増幅・検出するためには、変異部位を含まないプライマーセットを選択します。

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

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。

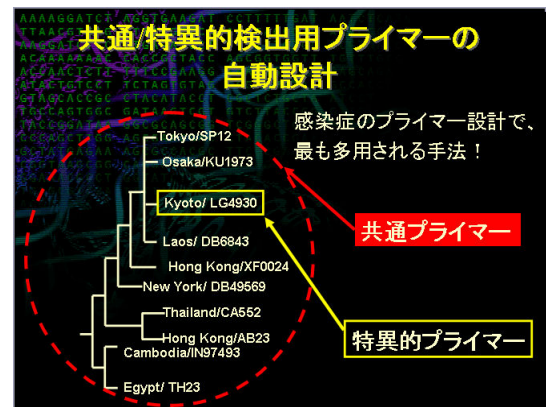


4.9 共通プライマーの自動設計

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ます。

4.10 特異的プライマーの自動設計

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ます。



4.11 プライマーセット設計結果画面の保存機能

プライマーの設計結果の一覧表を 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

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。

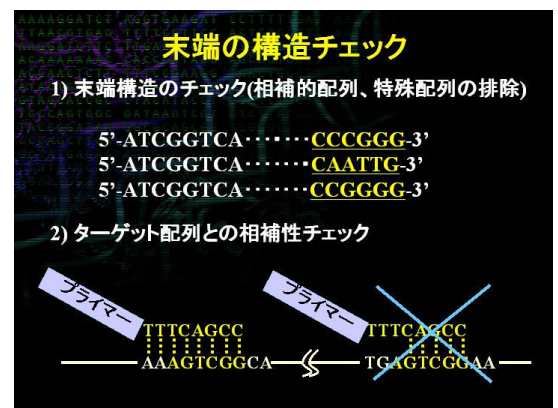
4.13 設計条件の保存

設計条件の保存及び再読込が可能です。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ます。

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。相補的配列とはシンメトリックな配列（例えば CCCGGG 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。



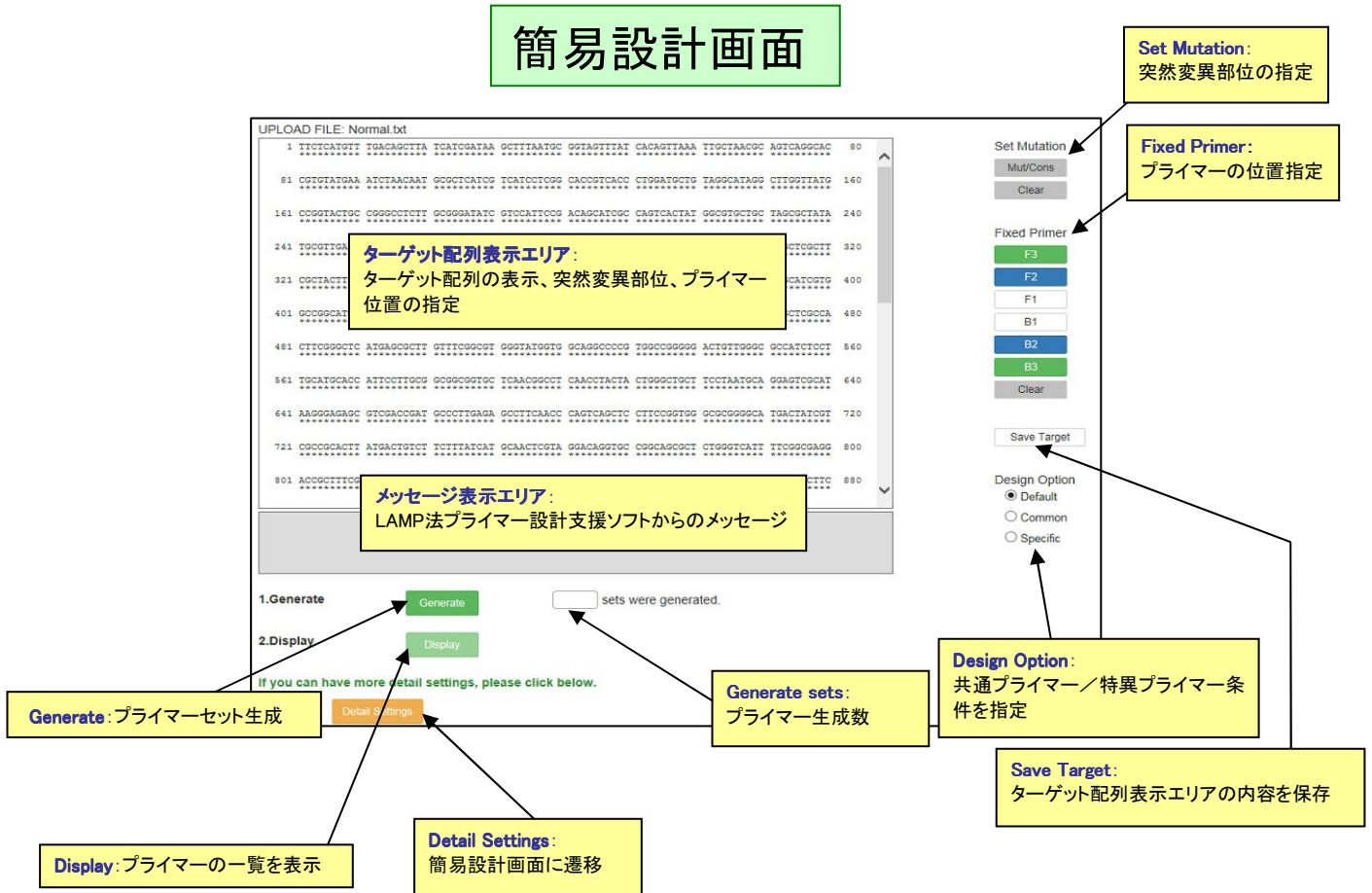
4. 15 プライマーセット配列情報の保存機能

プライマーの配列情報を Excel 形式でファイルにダウンロードできます。塩基配列や T_m 値などの基本的な情報が表示されます。

PrimerExplorer V5 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



詳細設計画面

UPLOAD FILE: Normal.txt

```

1  TTCTGATGTT TGGAGCTTA TCATGTATA GGTTAATGC GGTAGTTAT CACAGTAAA TTCTTAAGC AGTCAGGAC 80
81  GGTATGAAA ATCTACAAI GGGCTCATG TCATCTCGG GAGCTCAGC CTGAGTCTG TGGGATAGS CTTGGTATP 160
161  CCGGTACTGC CGGGCTCTT GGGGATATC GTCCATTCG ACAGCATGC CAGTCACAT GGGCTCTGC TACGCTATA 240
241  TCC
321  CCG
401  GCG
481  TTTCGGCTC ATGAGCGCT GTTTCGGCT GGTATGCTG GAGGCCGCG TGGCGGGGG ACTGTGGGG GCACATCTCT 560
561  TCAATGCAC ATTCCTTGG GGGGGGTC TCAAGCGCT GACCTACTA CTGGCTTCT ICTTAATGA GAGTGTGAT 640
641  AAGGGAGAC GTACACGAT GCGCTTASA GCGTCAAGC CAGTCAGCT CTTCGGTGG CCGCGGGGA TGACTATGT 720
721  CCGCGACTI ATGACTGCT ICTTTATCAT GCAACTGTA GACAGGTCG CCGCAGCGT CTGGTCAIT TTGGGGAGP 800
801  ACCGCTTTC CTGGAGCGG ACGATGATG GCGCTGTCT TCGGTATTC GGAATCTGC ACGCCCTGC TCAAGCTTC 880
            
```

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
 Between F1c-B1c
 Targeting Range: [] - [] sets were generated.

2. Generate [Generate] **3. Display** [Display]

Page 1 | Displayed. Sorting Rule: [None]

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

Basic Designing [Basic Designing]

Parameter Condition: [Normal]

Parameter Conditions:
 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: 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 ↓

Set Mutation: [Mut/Cons] [Clear]
Fixed Primer: [F2] [F1] [B1] [B2] [B3] [Clear]
Save Target: [Save Target]
Design Option: [Default] [Common] [Specific]
Sorting Rule: [None]
Save Parameters: [Save Parameter] [Reset Parameter]
Reset Parameters: [Reset Parameter]

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

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
デフォルトは"None"

Save Parameters:
設定パラメータを保存

Reset Parameters:
パラメータのリセット

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:
パラメータのリセット

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: パラメータセットの変更

Generate sets: プライマー生成数

Show Page: 表示する頁を指定

ループプライマー設計画面説明

簡易設計画面

The screenshot shows the 'UPLOAD FILE: PrimerInfo_Normal' interface. It features a sequence viewer with a text area containing DNA sequences and their positions (e.g., 1 TTCATGTT TGACAGCTTA TCATCGATAA GCITTAATGC GGTAGTTTAT CACAGTTAAA TTGCTAACGC AGTCAGGCAC 80). A yellow callout box labeled 'ターゲット配列表示エリア' (Target sequence display area) points to this text, explaining that it shows target sequences, mutation sites, and primer positions. Below the sequence viewer is a 'メッセージ表示エリア' (Message display area) for LAMP primer design support software messages. At the bottom, there are two main steps: '1. Generate' with a green 'Generate' button and '2. Display' with a green 'Display' button. A 'Detail Settings' button is also present. A 'Page 1' dropdown menu is shown next to the text 'sets were generated.' and 'Displayed.'. Several yellow callout boxes provide further details: 'Generate: ループプライマー生成' (Generate: Loop primer generation), 'Generate sets: プライマー生成数' (Generate sets: Number of primer generations), 'Show Page: 表示する頁を指定' (Show Page: Specify the page to display), 'Display: ループプライマーの一覧を表示' (Display: Display a list of loop primers), and 'Detail Settings: 詳細設計画面に遷移' (Detail Settings: Transition to the detailed design screen).

詳細設計画

UPLOAD FILE: PrimerInfo_Normal

```

1 TTCTCATGTT TGACAGCTTA TCATCGATAA GCITTAATGC GGTAGTITAT CACAGTTAAA TTGCTAACGC AGTCAGGAC 80
81 CGTGTATGAA ATCTAACAT GCGCICATCG TCATCCICGG CACCGTCACC CTGGATGCTG TAGGCATAGG CTGGTTIATG 160
161 CCGGTACTGC CCGGCTCTTT GCGGGATAIC GTCCAITCGG ACAGCATCGC CAGTCACTAT GCGGTGCTGC TAGGGCTATA 240
F3===== <==== F2==== >==== <==== F1==== >====
241 TCGGTTGATG CAATTTCTAT GCGCAGCGGT TCTCGAGGA CTGTCCGACC GCITTGCCCG CCGCCACATC CTGCTCGCIT 320
<==== S1 =====> <==== S =====>
321 CGCTACTTGG AGCCACTATC GACTACGGA TCATGGGAC CACACCGGTC CTGTGGATCC TCTACGCGG ACGCATCGTG 400
2=====
401 GCGCGCAT TCGGATCGG GCGGCTCGG GCGGCTCGG GCGGCTCGG GCGGCTCGG GCGGCTCGG GCGGCTCGG 480
481 CTTCGGGC TCGGATCGG GCGGCTCGG GCGGCTCGG GCGGCTCGG GCGGCTCGG GCGGCTCGG GCGGCTCGG 560
561 TGCATGCAAC ATTCCTTGG GCGGCTCGG TCAACGGCT CAACTACTA CTGGGCTGCT TCTTAATGCA GCGGCTCGG 640
641 AAGGGAGAGC GTGGACGAT GCGGCTCGG GCGGCTCGG CAGTCACTC CTTCGGTGG GCGGCTCGG TCGGATCGG 720
721 GCGGCTCGG ATGACTGCT TCTTAATGCA GCGGCTCGG GCGGCTCGG GCGGCTCGG CTGGGCTCGG TCGGATCGG 800
801 ACCGCTTTCG CTGGATCGG AGGATGATG GCGGCTCGG TCGGATTC GCGGCTCGG ACCGCTTTCG TCGGATTC 880
    
```

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

1.Generate → Generate

2.Display → Display

sets were generated.

Generate sets: プライマー生成数

Page 1 Displayed.

Show Page: 表示する頁を指定

Reset Parameters: パラメタのリセット

Reset Parameter

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

Parameter Condition

Length LF/LB 15 - 25 → **Length:** 各プライマーの長さの最短、最長を指定

Tm LF/LB 60 - 66 → **Tm:** 各プライマーのTmの最低、最高を指定

GC rate(%) 40 - 65 → **GC rate:** 各プライマーのGC含量の許容範囲を指定

dG threshold [Kcal/mol] 3'stability -2 → **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

dimer check -3.5

Limitations LF/LB 10 → **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

[Regular primer] dG threshold [Kcal/mol] 5'stability -3.0 3'stability -4.0 → **Distance:** 各プライマー間距離について指定