

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

1.1 Target 配列のアップロード

PrimerExplorer Ver.5 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。

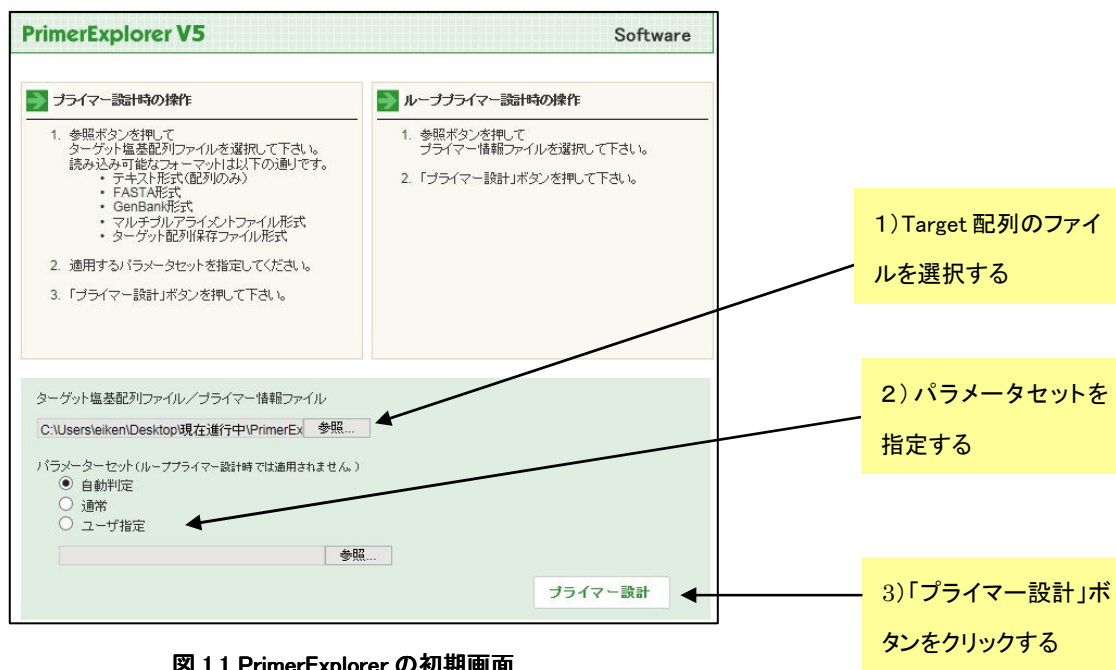


図 1.1 PrimerExplorer の初期画面

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)。

The screenshot displays a web-based primer design tool interface. At the top, it shows the uploaded file name 'Normal.txt' and a DNA sequence with line numbers from 1 to 880. On the right side, there are controls for 'Set Mutation' (Mut/Cons, Clear), 'Fixed Primer' (F3, F2, F1, B1, B2, B3, Clear), and 'Design Option' (Default, Common, Specific). Below the sequence, there are two main buttons: 'Generate' and 'Display'. A yellow callout box points to the 'Generate' button with the text '「Generate」ボタンをクリックする'. Another yellow callout box points to the 'Display' button with the text '「Display」ボタンをクリックする'. Below the buttons, there is a status message: '1.Generate [Generate] [] sets were generated.' and '2.Display [Display]'. At the bottom, there is a link for 'Detail Settings'.

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。「Save」ボタンを押すと各プライマーセットの塩基配列情報を Excel file の形で保存できます。

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 for loop primer designing.
3. Push "Save" button to download the primer information in the screen display layout.

DesignId 160412090709

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

label 5'pos 3'pos len Tm 5'dG 3'dG GCrate 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	GTCTCGCCGAAAATGACC
FIP			41					AGCTGACTGGGTTGAAGGCTCT-GCAGGAGTCGCATAAGGGA
BIP			40					CATGACTATCGTCGCCGCACT-CACCTGTCTACGAGTTGC
F2	628	646	19	60.88	-6.10	-5.20	0.58	GCAGGAGTCGCATAAGGGA
F1c	668	689	22	65.68	-5.49	-5.93	0.55	AGCTGACTGGGTTGAAGGCTCT
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

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

label 5'pos 3'pos len Tm 5'dG 3'dG GCrate Sequence

F3	1576	1593	18	59.72	-7.03	-4.72	0.56	GCGACCTGAGCAACAACA
B3	1769	1786	18	59.08	-5.00	-5.75	0.56	AACTGGCGGTATGGATGC
FIP			41					ACATAATGGTGCAGGGCGCTG-TGAATGGTCTTCGGTTCCG
BIP			40					CGCAGGATGCTGCTGGCTAC-AATCACTCAGGGTCAATGCC
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	ACATAATGGTGCAGGGCGCTG
B2	1733	1752	20	59.64	-4.06	-5.40	0.50	AATCACTCAGGGTCAATGCC
B1c	1677	1696	20	65.39	-7.02	-5.42	0.65	CGCAGGATGCTGCTGGCTAC

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

label 5'pos 3'pos len Tm 5'dG 3'dG GCrate Sequence

F3	128	145	18	60.55	-5.84	-5.42	0.61	ACCCTGGATGCTGTAGGC
B3	317	334	18	59.61	-6.54	-6.03	0.61	GGCTCCAAGTAGCGAAGC
FIP			40					GTGACTGGCGATGCTGTCCG-GCTTGGTTATGCCGGTACTG
BIP			39					TATGGCGTGCTGCTAGCGCTA-CAAAGCGGTCCGACAGTG
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	GTGACTGGCGATGCTGTCCG
B2	279	296	18	60.06	-5.01	-5.05	0.61	CAAAGCGGTCCGACAGTG
B1c	218	238	21	65.98	-4.98	-6.50	0.57	TATGGCGTGCTGCTAGCGCTA

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。

UPLOAD FILE: Normal.txt

1 TTCTCATGTT TGACAGCTTA TCAATGATRA GCCTTAAATGC GGTAGTTTAT CACAGTTAAA TTGCTAACGC AGTCAGGCAC 80

81 CGTGTATGAA ATCTAACAAI GGGCTCATGG ICAITCCTGG CACCGTCACC CTGGATGCTG TAGGCATAGG CTTGGTATG 160

161 CCGGTACTGC CCGGCTCTIT GCGGATAATC GTCCATTCGG ACAGCAATCG CAGTCACTAT GGGCTGCTGC TAGGCTATA 240

241 TGGGTATGATG CATTITCTAT GCGCACCGGT ICTGGGAGCA CTGTCCGACC GCTTGGGCGC CCGGCCAGTC CTGCTGGCT 320

321 CGCTACTTGG AGCCACTATC GACTAGCGCA TCAITGGCGA CACACCGGTC CTGTGGATCC TCTACGCGCG ACGCATCGTG 400

401 GCGGGCAICA CCGGCGCCAC AGGTGCGGTT GCTGGGCGCT ATATGCGCGA CAICACCGAT GGGGAAGATC GGGCTGGCCA 480

481 CTTCGGCTTC ATGAGCGCTT GTTTCGGGTT GGGTATGGTG GCAGGCGCGG TGCCCGGGGG ACTGTGGGCG GCCATCTCCT 560

561 TGCAITGCACC ATTCTTGGG GCGGCGGCTG TCAACGGGCT CAACCTACTA CTGGGCTGCT TCTTAAATGCA GGAGTGGCAT 640

641 AAGGAGAGAC GTCCACCGAT GCCCTTGAAG GCCCTTCACC CAGTCAGCTC CTTCGGTGGG GCGCGGGCCA TGAATACTGT 720

721 CCGCGCACTT ATGACTGTCT TCTTTATCAT GCARCTGGTA GACAGGTTGC CCGCAGCGCT CTGGGTCATT TTGGGGAGG 800

801 ACCGCTTTCG CTGGAGCGCG ACGATGATCG GCCTGTGCTT TCGGTATTG GGAATCTTGC ACGGCTTCCG TCAAGGCTTC 880

1.Generate sets were generated.

2.Display

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

「Detail Settings」ボタンをクリックする

図 1.5 プライマー設計画面

UPLOAD FILE: Normal.txt

```

1 TCTCATGTT TGACAGCTA TCAIDATAA GCTTAAATC GGTAGTTAT CACAGTAAA TTGCTAACG ATCAGGCGC 80
CGCTATATA ATCTAACAT GGGCCATCG TCATCTCGG CAGCCCTAC CTGGATCTG TAGCCATAGC CTGGTTATG 160
CGCTATATA ATCTAACAT GGGCCATCG TCATCTCGG CAGCCCTAC CTGGATCTG TAGCCATAGC CTGGTTATG 160
161 CCGTACTGC CCGGCTCTT CCGGAAATC TCCATTCGG ACAGCATGC CAGTCACTT GCGCTCTGC TAGCCATAGC 240
CGCTATATA ATCTAACAT GGGCCATCG TCATCTCGG CAGCCCTAC CTGGATCTG TAGCCATAGC CTGGTTATG 160
241 TCGTTGATG CAAITTCAT GGCACCGCT TGTGGAGCA CTTCGACG GGTITGGCG CCGCCCTAGC CTCTCTGCT 320
CGCTATATA ATCTAACAT GGGCCATCG TCATCTCGG CAGCCCTAC CTGGATCTG TAGCCATAGC CTGGTTATG 160
321 CCGTACTGC CCGGCTCTT CCGGAAATC TCCATTCGG ACAGCATGC CAGTCACTT GCGCTCTGC TAGCCATAGC 240
CGCTATATA ATCTAACAT GGGCCATCG TCATCTCGG CAGCCCTAC CTGGATCTG TAGCCATAGC CTGGTTATG 160
401 GCGCATGC CCGGCTCTT GGTTCGCTT ATATGGGCA CATGCGCAT GGGGAAAGC GCGCTCTGC TAGCCATAGC 480
CGCTATATA ATCTAACAT GGGCCATCG TCATCTCGG CAGCCCTAC CTGGATCTG TAGCCATAGC CTGGTTATG 160
481 CTTCGGCTC ATGAGCTCT GGTTCGCTT GGTTCGCTT GGTTCGCTT GGTTCGCTT GGTTCGCTT GGTTCGCTT 560
CGCTATATA ATCTAACAT GGGCCATCG TCATCTCGG CAGCCCTAC CTGGATCTG TAGCCATAGC CTGGTTATG 160
641 TGCATGCAC ATTCCTTGG GGGGCGTGC TGAAGCGCT CAACTACTA CTGGCTCTC TCCATAAGC GAGTGGCAT 640
CGCTATATA ATCTAACAT GGGCCATCG TCATCTCGG CAGCCCTAC CTGGATCTG TAGCCATAGC CTGGTTATG 160
641 AAGGGAGGC GTGACCAT GCGCTTGA GCGTCAACC CAGTCACTC CTTCGGTGG CCGCGGGGA TGCATGCT 720
CGCTATATA ATCTAACAT GGGCCATCG TCATCTCGG CAGCCCTAC CTGGATCTG TAGCCATAGC CTGGTTATG 160
721 CCGCAGCTC ATGAGCTCT TCTTATCAT GGAAGTCTA GAGCAGTGC CCGCAGCTC CTGGCTCTC TCCATAAGC 800
CGCTATATA ATCTAACAT GGGCCATCG TCATCTCGG CAGCCCTAC CTGGATCTG TAGCCATAGC CTGGTTATG 160
801 ACCGCTTTC CTGGAGCGG AGGATAGTC GCGTCTGCT TGGGTAATC GGAATCTTC ACCGCTTTC TGAAGCTTC 880
CGCTATATA ATCTAACAT GGGCCATCG TCATCTCGG CAGCCCTAC CTGGATCTG TAGCCATAGC CTGGTTATG 160

```

Number of Primer Candidates: F1=251, F2=242, F3=593, B1=253, B2=219, B3=568, F1P=318, B1P=248
1000 Primer set(s) were generated.

Set Mutation
Mut/Cons
Clear

Fixed Primer
F3
F2
F1
B1
B2
B3
Clear

Save Target

Design Option
Default
Common
Specific

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

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 Normal Save Parameter Reset Parameter

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

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

GC rate(%) 40 - 65

dG threshold
5'stability -3
3'stability -4
dimer check -2.5

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

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

Mutation/Consensus

Peculiarity	Permission
high level	F1c 5'term <input type="checkbox"/> B1c 5'term <input type="checkbox"/>
↑	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 type="checkbox"/> B2 5'term <input type="checkbox"/>
↓	F3 5'term <input type="checkbox"/> B3 5'term <input type="checkbox"/>
low level	

Reset Parameter

「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程

UPLOAD FILE: Normal.txt

1 TTCTCAATGTT TGACAGCTTA TCATCGATAA GCCTTAAATGC GGTAGTTTAT CACAGTTAAA TTGCTAACGC AGTCAGGCAC 80
 81 CGTGTATGAA ATCTAACAAAT GCGCTCATCG TCATCTCGTG CACGGTCACC CTGGATGCTG TAGGCATAGG CTTGGTTATG 160
 161 CCGGACTGCG CCGGCTCTTT GCGGGATAAT GTCCATTCCG ACAGCATCGC CAGTCACTAT GCGCTGCTGC TAGGCTIATA 240
 241 TGGGTGATG CAATTTCIAT GCGCACCOST TCTGGAGACA CTGTCCGACC GCCTTGGCCG CCGCCDAGTC CTGCTDGCCT 320
 321 CGCTACTTGG AGCCACTATC GACTACGGGA TCATGGGCGA CACACCGGTC CTGTGGATCC TCTAAGCCGG ACGCATCGTG 400
 401 GCGGCAATCA CCGGCGCCAC AGGTGGGTTT GCTGGGCGCT ATATGGCCGA CATCACCGAT GGGGAGATC GGGCTDGCCT 480
 481 CTTCGGGCTC ATGACGCTTT GTTTCGGCTT GGTATGTTG GCGCGCCGCG TGGCCGGGGG ACTGTGTTGG CCATCTCTCT 560
 561 TGCATGACCC ATTCCTTGGG GCGGCGGTTG TCAACGGGCT CAACCTACTA CTGGGCTGCT TCCTAATGCA GAGTGTGCAI 640
 641 AAGGAGAGAC GTGACCGCAT GCGCTTGGAA GCGCTTGAAC CAGTCAGCTC CTTCGGTGG GCGCGGGGCA TGAATATGCT 720
 721 GCGCCGACTT ATGACGCTCT TCCTTATCAT GCAACTGCTA GAGACGGTGC CCGCAGCGCT CTGGGCTCAT TTGGGGGAGG 800
 801 ACCGCTTTCG CTGGAGCGCG ACATGATCG GCGCTGCTCT TGGGTTATTC GGAATCTTGC ACCGCTTTCG TCAAGCCCTC 880

Number of primer candidates: 1128
 1000 Primer set(s) were generated. F2=242, F3=593, B1=253, B2=213, B3=568, F1P=318, B1P=266

Set Mutation
 Mut/Cons
 Clear

Fixed Primer
 F3
 F2
 F1
 B1
 B2
 B3
 Clear

Save Target

Design Option
 Default
 Common
 Specific

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

2. Generate
 Generate 1000 sets were generated.

3. Display
 Display Page 1 Displayed. Sorting Rule: None

メッセージエリアに現在の進行状況が表示される

全部で1000セットのプライマーが生成された

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

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

プライマーセットはF2領域の5'末端の位置を規準に設計され、設計条件を満たすプライマーセットがTarget配列の全長にわたり5'末端から3'末端方向へ順番に表示されます。各々種類のF2領域に対して一種類の他領域(F3、F1c、B1c、B2、B3領域)が組み合わせられ、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 V5 Software

DesignId 160412104924

Primer set: sorting rule [None]

Target DNA CACAGTTAAATTGCTAACGGAGTCAGGCACCGTGTATGAAATCTAACAATGCGCTCATCGTCATCCTCGGCACCGTCACCCT
 (Complement) gtgtcaatttaacgattgcgtcagtcocgtggcacatactttagattgtttacgcgagtagcagtaggagccgtggcagtgaggga
 CONSENSUS(*)
 Primer IDdG(dimer) 51 61 71 81 91 101 111 121 131

ID Number	自由エネルギー変化値	F3 領域	F2 領域
[1]	-2.01	TGCTAACGGAGTCAGGCA	AATGCGCTCATCGTCATCC
[2]	-2.01	TGCTAACGGAGTCAGGCA	ATGCGCTCATCGTCATCC
[3]	-2.46		GCGCTCATCGTCATCCTC
[4]	-2.46		GCGCTCATCGTCATCCTC
[5]	-2.46		GCGCTCATCGTCATCCTC
[6]	-2.23		
[7]	-2.49		
[8]	-2.49		
[9]	-2.16		
[10]	-1.82		
[11]	-1.82		
[12]	-1.82		

2) Confirm ボタンをクリックする

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

ATTACGGTCAATCCGCC caagstgctctcttagctgccaacaatsagcsaagtc [39]
 ATTACGGTCAATCCGCC caagstgctctcttagctgccaacaatsagcsaagtc [40]
 ATTACGGTCAATCCGCC gccaacaatsagcsaagtc actactttcgaocgatgctc [41]
 ATTACGGTCAATCCGCC gccaacaatsagcsaagtc actactttcgaocgatgctc [42]
 taatgccaagttagcgg GTTCCACGGAGAATCCGACG actttcgaocgatgctcttc aactaccgcaaggataaaca [45]
 taatgccaagttagcgg GTTCCACGGAGAATCCGACG actttcgaocgatgctcttc aactaccgcaaggataaaca [46]
 taatgccaagttagcgg GTTCCACGGAGAATCCGACG actttcgaocgatgctcttc aactaccgcaaggataaaca [47]
 taatgccaagttagcgg GTTCCACGGAGAATCCGACG actttcgaocgatgctcttc aactaccgcaaggataaaca [48]
 taatgccaagttagcgg GTTCCACGGAGAATCCGACG actttcgaocgatgctcttc aactaccgcaaggataaaca [49]
 taatgccaagttagcgg GTTCCACGGAGAATCCGACG actttcgaocgatgctcttc aactaccgcaaggataaaca [50]
 ATTACGGTCAATCCGCCGTTGTTCACGGAGAATCCGACGGGGTGTACTCGCTCACA TTTAATGTTGATGAAAGCTGGCTACAGGAAAGCCAGACCGGAATTATTTTGTATGGCGTTCCTATTGGTTAAAAATGAG
 1311 1321 1331 1341 1351 1361 1371 1381 1391 1401 1411 1421 1431 1441
 taatgccaagttagcgg GTTCCACGGAGAATCCGACG actttcgaocgatgctcttc aactaccgcaaggataaaca [51]
 taatgccaagttagcgg TCCACGGAGAATCCGACGG actttcgaocgatgctcttc aactaccgcaaggataaaca [52]
 taatgccaagttagcgg TCCACGGAGAATCCGACGG actttcgaocgatgctcttc aactaccgcaaggataaaca [53]
 aatgccaagttagcggcaacaTCCACGGAGAATCCGACGG actttcgaocgatgctcttc aactaccgcaaggataaaca [54]
 atgccaagttagcggcaacaTCCACGGAGAATCCGACGG actttcgaocgatgctcttc aactaccgcaaggataaaca [55]
 agttagcggcaacaagstg ATCCGACGGGGTGTACTCGC ccgatgctcttcocsgtct aactaccgcaaggataaaca [56]
 ttagcggcaacaagstg ATCCGACGGGGTGTACTCGC ccgatgctcttcocsgtct aactaccgcaaggataaaca [57]
 ttagcggcaacaagstg ATCCGACGGGGTGTACTCGC ccgatgctcttcocsgtct aactaccgcaaggataaaca [58]
 tagcggcaacaagstg ATCCGACGGGGTGTACTCGC ccgatgctcttcocsgtct aactaccgcaaggataaaca [59]

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)

Header		Header		Header		Header		Header		Header	
Header		Header		Header		Header		Header		Header	
291.00											
291.01											
291.02											
291.03											
291.04											
291.05											
291.06											
291.07											
291.08											
291.09											
291.10											
291.11											
291.12											
291.13											
291.14											
291.15											
291.16											
291.17											
291.18											
291.19											
291.20											
291.21											
291.22											
291.23											
291.24											
291.25											
291.26											
291.27											
291.28											
291.29											
291.30											
291.31											
291.32											
291.33											
291.34											
291.35											
291.36											
291.37											
291.38											
291.39											
291.40											
291.41											
291.42											
291.43											
291.44											
291.45											
291.46											
291.47											
291.48											
291.49											
291.50											
291.51											
291.52											
291.53											
291.54											
291.55											
291.56											
291.57											
291.58											
291.59											
291.60											
291.61											
291.62											
291.63											
291.64											
291.65											
291.66											
291.67											
291.68											
291.69											
291.70											
291.71											
291.72											
291.73											
291.74											
291.75											
291.76											
291.77											
291.78											
291.79											
291.80											
291.81											
291.82											
291.83											
291.84											
291.85											
291.86											
291.87											
291.88											
291.89											
291.90											
291.91											
291.92											
291.93											
291.94											
291.95											
291.96											
291.97											
291.98											
291.99											
292.00											

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複数(3~5種類以上)のプライマーセットを設計し、実際に反応性を比較することにより適当なプライマーを選択します。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。

同じ領域に設計された複数のプライマーセットから適当なプライマーを選択する場合には、詳細情報を比較します。ここでは例として、プライマーセットの一覧表示画面(図1. 8a)のID Number 10、11の2種類を比較します。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(図1. 10)。

The figure displays two panels, '1' and '2', showing primer information for different primer sets. The data is as follows:

label	5'pos	3'pos	len	Tm	5'dG	3'dG	GCrate	Sequence
Panel 1 (ID:1)								
dimer(minimum)dG=-2.01								
F3	62	79	18	60.91	-4.49	-6.25	0.56	TGCTAACGCAGTCAGGCA
B3	250	268	19	59.11	-6.85	-4.56	0.53	GGGTGCGCATAGAAATTGC
F1P		41						GCAGTACCGGCATAACCAAGCC-AATGCGCTCATCGTCATCC
B1P		39						GCCTCTTGCGGGATATCGTCC-GCTAGCAGCAGCCATAG
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	GCTAGCAGCAGCCATAG
B1c	174	194	21	64.55	-5.93	-6.04	0.62	GCCTCTTGCGGGATATCGTCC
Panel 2 (ID:2)								
dimer(minimum)dG=-2.01								
label	5'pos	3'pos	len	Tm	5'dG	3'dG	GCrate	Sequence
F3	62	79	18	60.91	-4.49	-6.25	0.56	TGCTAACGCAGTCAGGCA
B3	250	268	19	59.11	-6.85	-4.56	0.53	GGGTGCGCATAGAAATTGC
F1P		40						GCAGTACCGGCATAACCAAGCC-ATGCGCTCATCGTCATCC
B1P		39						GCCTCTTGCGGGATATCGTCC-GCTAGCAGCAGCCATAG
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	GCTAGCAGCAGCCATAG
B1c	174	194	21	64.55	-5.93	-6.04	0.62	GCCTCTTGCGGGATATCGTCC

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 -4.0kcal/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 11はF1cの5'末端の安定性が -3.55 となっており、末端の安定性が不適となるため、ID Number 10を選択します。

ID Number の上に「Primer Information」ボタンがありますが、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。また、プライマーの配列情報を保存するには「Save」ボタンをクリックします(図 1.11)。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)

左端のボックスをチェックして「Order」ボタンをクリックするとプライマー注文画面に進みます。(図1. 13 参照)

3) 「Order」ボタンをクリックして注文画面に進む

2) 「Save」ボタンをクリックして配列情報を保存する

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

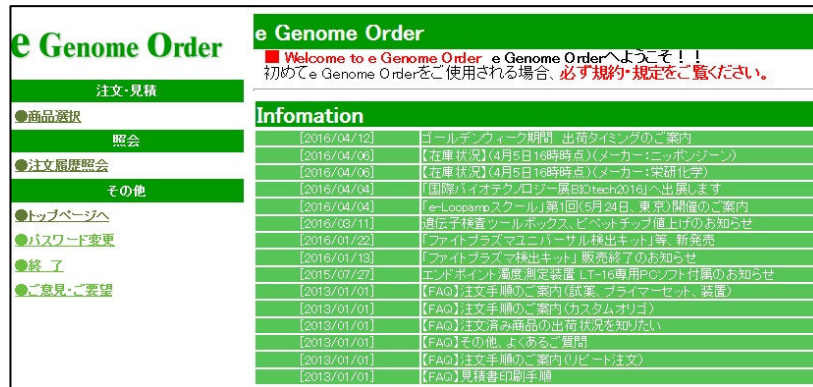


図 1.13 ログイン画面（ログイン後、発注画面が表示されます）

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 V5 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」ボタンをクリックする

「Parameter Set」は「AT rich」が選択されている

プライマーの長さが長めに、Tm 値が低めに設定されている

Parameter	Condition	Value 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 2.2 結果の一覧表示画面

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 147 セットのプライマーセットが設計され、148 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。

Confirm
Save List
DesignId 160412160037

Primer set: sorting rule [None]

Target DNA	CTATTAGTAGAATTGATGCCACCTTTTCAGCTCGCGCCCCAAATGAAAATATAGCTAAACAGGTTATTGACCATTGCGAAATGTATCTAATGGTCAAA									
Complement)	gataatcatcttaactacggtggaaaaagtcgagcgcggggtttacttttatatcgatttgcacaataactggtaaacgctttacatagattaccagtttg									
CONSENSUS(*)	*****									
Primer ID(dimer)	11	21	31	41	51	61	71	81	91	101
<input type="checkbox"/> [1]	-1.83	[1]	TGATGCCACCTTTTCAGC		GCCCCAAATGAAAATATAGCT					accagtttg
<input type="checkbox"/> [2]	-2.32			[2]	GCCCCAAATGAAAATATAGCT	AACAGGTTATTGACCATTGTC				tttg
<input type="checkbox"/> [3]	-2.32			[3]	GCCCCAAATGAAAATATAGCT	AACAGGTTATTGACCATTGTC				ttg
<input type="checkbox"/> [4]	-2.32			[4]	GCCCCAAATGAAAATATAGCT	ACAGGTTATTGACCATTGTC				
<input type="checkbox"/> [5]	-1.51			[5]	GCCCCAAATGAAAATATAGCT	AGGTTATTGACCATTGCGAA				
<input type="checkbox"/> [6]	-1.51			[6]	GCCCCAAATGAAAATATAGCT	GTTTATTGACCATTGCGAA				
<input type="checkbox"/> [7]	-1.51			[7]	GCCCCAAATGAAAATATAGCT	GTTTATTGACCATTGCGAAAT				
<input type="checkbox"/> [8]	-1.69			[8]	CCAAATGAAAATATAGCTAAACAGG		CGAAATGTATCTAATGGTCAAA			
<input type="checkbox"/> [9]	-1.54					[9]	GTTTATTGACCATTGCGAAAT		CTAATGGTCAAA	
<input type="checkbox"/> [10]	-1.54					[10]	GTTTATTGACCATTGCGAAAT		TAATGGTCAAA	
<input type="checkbox"/> [11]	-1.29					[11]	GTTTATTGACCATTGCGAAAT		TAATGGTCAAA	
<input type="checkbox"/> [12]							GTTTATTGACCATTGCGAAAT		AATGGTCAAA	
<input type="checkbox"/> [13]							GTTTATTGACCATTGCGAAAT		AATGGTCAAA	
<input type="checkbox"/> [14]							GTTTATTGACCATTGCGAAAT		ATGGTCAAA	
<input type="checkbox"/> [15]							GTTTATTGACCATTGCGAAAT		ATGGTCAAA	
<input type="checkbox"/> [16]							GTTTATTGACCATTGCGAAAT		TGGTCAAA	
<input type="checkbox"/> [17]	-1.29					[17]	GTTTATTGACCATTGCGAAAT		GGTCAAA	
<input type="checkbox"/> [18]	-2.46					[18]	GTTTATTGACCATTGCGAAAT		GTCAA	
<input type="checkbox"/> [19]	-2.46					[19]	GTTTATTGACCATTGCGAAAT		TCAA	

5' 末端から 3' 末端方向へ 147 セットのプライマーセットが設計され、148 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 V5 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。

Design Option
 Default
 Common
 Specific

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

2. Generate
Generate [] 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 F

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

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)

2.Generate sets were generated.

3.Display Page Displayed. Sorting Rule

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

Parameter Condition

Length

F1c/B1c	<input type="text" value="19"/>	-	<input type="text" value="25"/>
F2/B2	<input type="text" value="17"/>	-	<input type="text" value="25"/>
F3/B3	<input type="text" value="17"/>	-	<input type="text" value="25"/>

Tm

F1c/B1c	<input type="text" value="63"/>	-	<input type="text" value="66"/>
F2/B2	<input type="text" value="58"/>	-	<input type="text" value="61"/>
F3/B3	<input type="text" value="58"/>	-	<input type="text" value="61"/>

GC rate(%) -

dG threshold

5'stability	<input type="text" value="-3"/>
3'stability	<input type="text" value="-4"/>
dimer check	<input type="text" value=""/>

Distances (F2-B2)

primexplorer.jp から SaveParamsfba1b97c を開くか、または保存しますか?

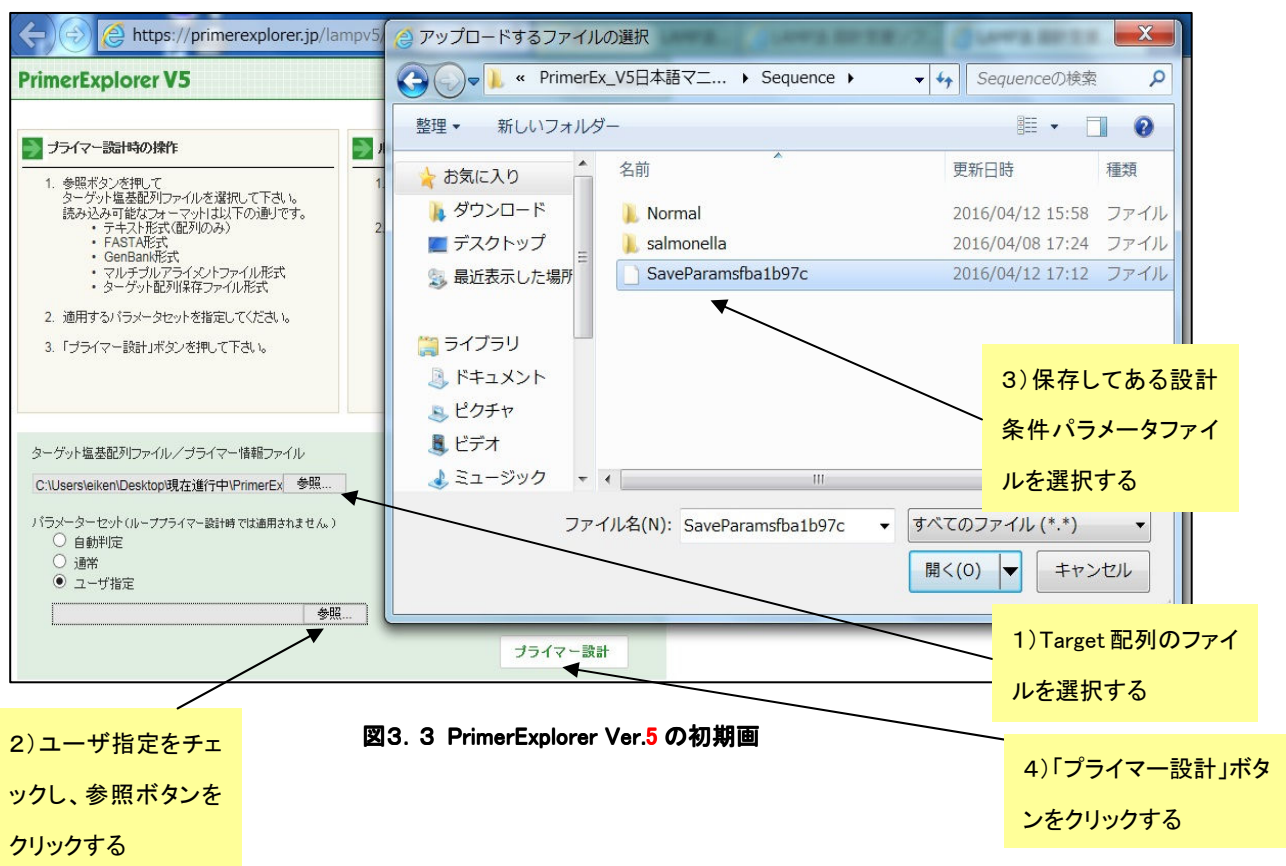
設計条件を保存する

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 V5 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。



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)設計条件が表示されます。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。

Design Option
 Default
 Common
 Specific

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

2. Generate
 [] sets were generated.

3. Display
 Page 1 | Displayed. | Sorting Rule: None

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

Parameter Condition: **Custom**

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

「Parameter Set」は「Custom」と表示されている

先程保存した設計条件が表示される

図3. 4 プライマー設計画面

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

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

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: **Normal**
 AT rich
 GC rich
 Custom

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

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

1) プライマー領域を指定する

2) このボタンをクリックして F2 領域を指定する

図4.2 プライマー領域指定後の画面

プライマー領域に指定した部分の表示

2) このボタンをクリックして F2 領域を指定しなおす

1) 変更する場合は、新たな F2 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。

1) プライマー領域を指定する

2) このボタンをクリックして F3 領域を指定する

このボタンをクリックしてプライマー領域の情報を消す

「Display」ボタンをクリックする

1. Select Range
 Ignore range
 Within F2-B2 Targeting Range
 Between F1c-B1c 208 - 227

2. Generate
 Generate 116 sets were generated.

3. Display
 Display Page 1/1 Displayed. Sorting Rule: None

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

Primer set: sorting rule [None]

Target DNA	TCAACGGCCTCAACTACTACTGGGCTGCTTCCTAATGCAAGGAGTCGCATAAGGGAGAGCGTCGACCGATGCCCTT
(Complement)	agttgccggagttggatgatgaccgcagcaaggattacgtcctcagcgtaattcctctctgcagctggctacgggaa
CONSENSUS(*)	*****
Fixed Primer	<----- F3 ----->
Primer IDG(dimer)	191 201 211 221 231 241 251 261
<input type="checkbox"/> [1]	-1.63 [1] C T A C T G G G C T G C T T C C T A A T G C A G G A G T C G C A T A A G G G A
<input type="checkbox"/> [2]	-2.46 [2] C T A C T G G G C T G C T T C C T A A T C A G G A G T C G C A T A A G G G A G A
<input type="checkbox"/> [3]	-2.15 [3] C T A C T G G G C T G C T T C C T A A T A G G A G T C G C A T A A G G G A G A G
<input type="checkbox"/> [4]	-2.13 [4] C T A C T G G G C T G C T T C C T A A T T C G C A T A A G G G A G A G C G T
<input type="checkbox"/> [5]	-2.45 [5] C T A C T G G G C T G C T T C C T A A T T C G C A T A A G G G A G A G C G T C
<input type="checkbox"/> [6]	-2.45 [6] C T A C T G G G C T G C T T C C T A A T C G C A T A A G G G A G A G C G T C
<input type="checkbox"/> [7]	-1.06 [7] C T A C T G G G C T G C T T C C T A A T G C A G G A G T C G C A T A A G G G A
<input type="checkbox"/> [8]	-2.46 [8] C T A C T G G G C T G C T T C C T A A T C A G G A G T C G C A T A A G G G A G A
<input type="checkbox"/> [9]	-2.41 [9] C T A C T G G G C T G C T T C C T A A T A G G A G T C G C A T A A G G G A G A G
<input type="checkbox"/> [10]	-2.41 [10] C T A C T G G G C T G C T T C C T A A T T C G C A T A A G G G A G A G C G T
<input type="checkbox"/> [11]	-2.45 [11] C T A C T G G G C T G C T T C C T A A T T C G C A T A A G G G A G A G C G T C
<input type="checkbox"/> [12]	-2.45 [12] C T A C T G G G C T G C T T C C T A A T C G C A T A A G G G A G A G C G T C

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 V5 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)

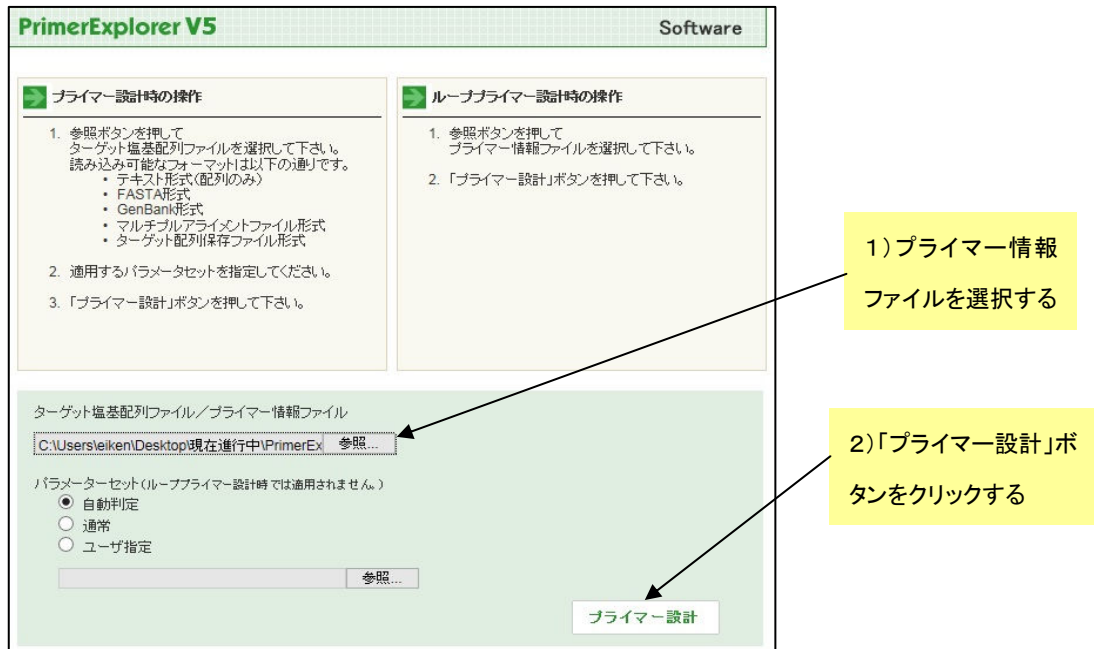


図 5.1 PrimerExplorer の初期画面

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。

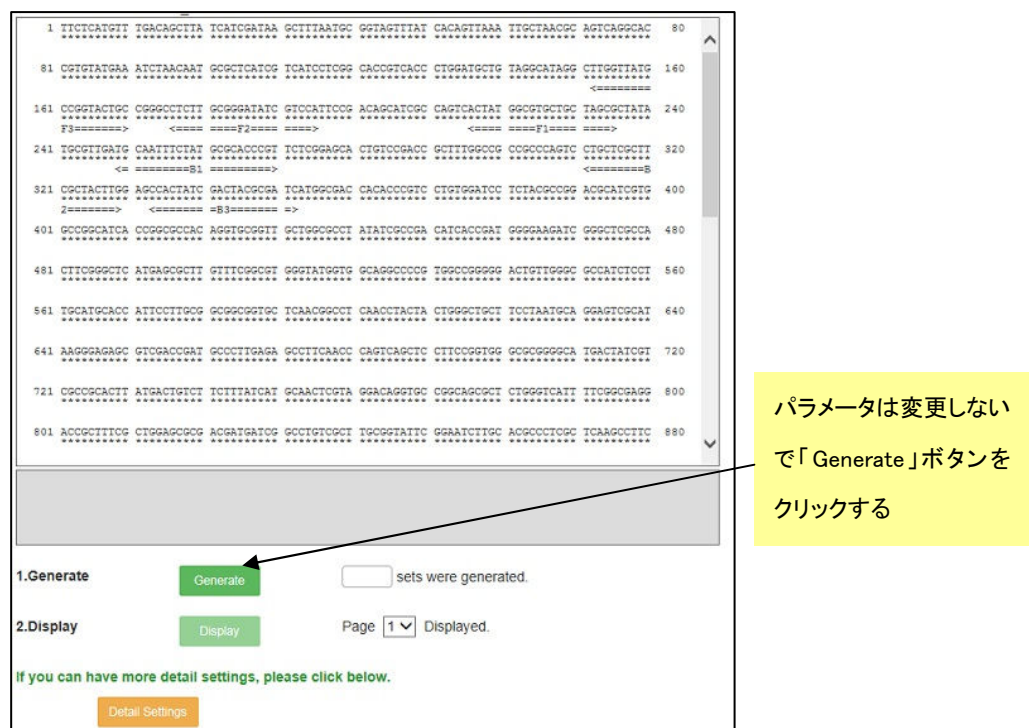


図 5.2 ループプライマー設計画面

1 セットのプライマーが生成されますので、続いて「Confirm」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)

2) 「Confirm」ボタンをクリックする

1) ボックスをチェックする

保存しておいたプライマー情報の領域

Confirm Save List Designid 160413160245

Primer set

Target DNA
Complement
CONSENSUS(*)

Primer IDdG(dimer) 141 151 161 171 181 191 201 211 221 231

Forward 側のループプライマー

Backward 側のループプライマー

Designid 160413160245

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。さらに、ループプライマーセットの詳しい情報を見るために、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「Confirm」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詳細情報

プライマー詳細表示画面(図5.4)に、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。

2)「Order」ボタンをクリックして注文画面に進む

1) ボックスをチェックする



The screenshot shows a web interface for primer details. At the top, there is an 'Order' button. Below it, there is a 'Save' button with an unchecked checkbox to its left. A table displays primer information for a dimer with a minimum dG of -2.95. The table has columns for label, 5' position, 3' position, length, Tm, 5'dG, 3'dG, GCrate, and Sequence. Two primer sets, LF and LB, are listed with their respective sequences highlighted in green.

label	5'pos	3'pos	len	Tm	5'dG	3'dG	GCrate	Sequence
LF	198	214	17	61.27	-6.24	-6.19	0.65	ACTGGCGATGCTGTCGG
LB	273	289	17	60.10	-5.88	-6.04	0.65	TCGGAGCACTGTCCGAC

図5.4 プライマー詳細画面表示

ループプライマーセットが複数設計できましたら、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。選択したセットのOrderは、ボックスをチェックした後、「Order」を押してOrder画面に進み注文をします。