

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

PrimerExplorer V5 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:	GCAGGCATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTT	CAACGTCGTGACTGGGA	AACCCCTG	60
M13_3M1.nuc	1:	GCAGGCATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTT	CAACGTCGTGACTGGGA	AACCCCTG	60
M13_3.nuc	61:	CGGTTACCCAACCTTAATCG	CTTGCAGCACATCCC	CTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCG	120
M13_3M1.nuc	61:	CGGTTACCCAACCTTAATCG	CTTGCAGCACATCCC	CTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCG	120
M13_3.nuc	121:	AAGAGG	CCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAG	TTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCT	180
M13_3M1.nuc	121:	AAGAGT	CCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAC	TTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCT	180
M13_3.nuc	181:	TTGCCTGGTTTCCGGCACCGAAGCGGTGC	CGGAAAGCTGGCTGGAGTGC	GATCCTTCCTG	240
M13_3M1.nuc	181:	TTGCCTGGTTTCCGGCACCGAAGCGGTGC	CGGAAAGCTGGCTGGAGTGC	GATCCTTCCTG	240
M13_3.nuc	241:	AGGCCGATACGGTCGTCCCTCAA	ACTGGCAGATGCACGGTTACGATGCGCCCATCT		300
M13_3M1.nuc	241:	AGGCCGATACGGTCGTCCCTCAA	ACTGGCAGATGCACGGTTACGATGCGCCCATCT		300
M13_3.nuc	301:	ACACCAACGTAACCTATCCCATTACGGTCAATCCGCCGTTTGT	TCCCACGGAGAATCCGA		360
M13_3M1.nuc	301:	ACACCAACGTAACCTATCCCATTACGGTCAATCCGCCGTTTGT	TCCCACGGAGAATCCGA		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:	CGCGAATTTTAACAAAAATTTAACGTTTAC			510
M13_3M1.nuc	481:	CGCGAATTTTAACAAAAATTTAACGTTTAC			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 GCAGGCATGCAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTCAACCTCGTGACTGGGAAACCCCTGGGTTACCCAACTTAATCGCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCC
 (Complement) cgtccgtacgttogaacogtgaocggagcaaatgttgcagcactgacccttggaccocaaatggatgaaatggaaacgtctgtaacgcttassssaaaacgctcaaccgattatccttctccggctgctcaccgssaaase
 CONSENSUS(*) *****

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

[1] -1.99 ATGCAAGCTTGGCACTGG CGTCGTTTCAACCTCGTGA
 [2] -1.99 ATGCAAGCTTGGCACTGG TTTCAACCTCGTGA
 [3] -1.99 ATGCAAGCTTGGCACTGG TTTCAACCTCGTGA
 [4] -1.99 ATGCAAGCTTGGCACTGG TTTCAACCTCGTGA
 [5] -1.99 ATGCAAGCTTGGCACTGG TTTCAACCTCGTGA
 [6] -2.27 [6] CGTCGTTTCAACCTCGTGA GAAACCCCTGGGTTACCC
 [7] -2.27 [7] CGTCGTTTCAACCTCGTGA GAAACCCCTGGGTTACCC
 [8] -2.27 [8] CGTCGTTTCAACCTCGTGA GAAACCCCTGGGTTACCC
 [9] -2.27 [9] TCGTGACTGGGAAACCCCT ACCCAACTTAATCGCTTGC
 [10] -2.27 [10] GAAACCCCTGGGTTACCCAACTTAATCGCTTGCAGCAC
 [11] -2.27 [11] GAAACCCCTGGGTTACCCAACTTAATCGCTTGCAGCAC
 [12] -2.13 [12] GAAACCCCTGGGTTACCCAA TTAATCGCTTGCAGCAC
 [13] -2.13 [13] GAAACCCCTGGGTTACCCAA TTAATCGCTTGCAGCAC
 [14] -2.13 [14] GAAACCCCTGGGTTACCCAA TTAATCGCTTGCAGCAC
 [15] -2.13 [15] GAAACCCCTGGGTTACCCAA TTAATCGCTTGCAGCAC
 [16] -2.35 [16] CGTCGTTTCAACCTCGTGA GAAACCCCTGGGTTACCC
 [17] -2.35 [17] CGTCGTTTCAACCTCGTGA GAAACCCCTGGGTTACCC
 [18] -2.35 [18] CGTCGTTTCAACCTCGTGA GAAACCCCTGGGTTACCC
 [19] -2.37 [19] GAAACCCCTGGGTTACCCAA GCAGCACATCCCCCTTTC
 [20] -2.37 [20] GAAACCCCTGGGTTACCCAA GCAGCACATCCCCCTTTC
 [21] -2.37 [21] ATGCAAGCTTGGCACTGG CGCTGGCGTAATAGCG
 [22] -2.37 [22] ATGCAAGCTTGGCACTGG CGCTGGCGTAATAGCG
 [23] -2.46 [23] ATGCAAGCTTGGCACTGG CGCTGGCGTAATAGCGAAGA
 [24] -2.46 [24] ATGCAAGCTTGGCACTGG CGCTGGCGTAATAGCGAAGA
 [25] -2.37 [25] ATGCAAGCTTGGCACTGG CGCTGGCGTAATAGCGAAGA

Target DNA GCAGGCATGCAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTCAACCTCGTGACTGGGAAACCCCTGGGTTACCCAACTTAATCGCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCC
 (Complement) cgtccgtacgttogaacogtgaocggagcaaatgttgcagcactgacccttggaccocaaatggatgaaatggaaacgtctgtaacgcttassssaaaacgctcaaccgattatccttctccggctgctcaccgssaaase
 CONSENSUS(*) *****

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

Target DNA GCAGGCATGCAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTCAACCTCGTGACTGGGAAACCCCTGGGTTACCCAACTTAATCGCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCC
 (Complement) cgtccgtacgttogaacogtgaocggagcaaatgttgcagcactgacccttggaccocaaatggatgaaatggaaacgtctgtaacgcttassssaaaacgctcaaccgattatccttctccggctgctcaccgssaaase
 CONSENSUS(*) *****

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

[1] -1.99 GCATGCAGCTTGGCACT CGTCGTTTCAACCTCGTGA
 [2] -1.99 ATGCAAGCTTGGCACTGG TTTCAACCTCGTGA
 [3] -1.99 ATGCAAGCTTGGCACTGG TTTCAACCTCGTGA
 [4] -1.99 ATGCAAGCTTGGCACTGG TTTCAACCTCGTGA
 [5] -1.99 ATGCAAGCTTGGCACTGG TTTCAACCTCGTGA
 [6] -1.99 ATGCAAGCTTGGCACTGG TTTCAACCTCGTGA
 [7] -1.99 ATGCAAGCTTGGCACTGG TTTCAACCTCGTGA
 [8] -1.99 ATGCAAGCTTGGCACTGG TTTCAACCTCGTGA
 [9] -2.27 [9] CGTCGTTTCAACCTCGTGA GAAACCCCTGGGTTACCC
 [10] -2.27 [10] CGTCGTTTCAACCTCGTGA GAAACCCCTGGGTTACCC
 [11] -2.27 [11] CGTCGTTTCAACCTCGTGA GAAACCCCTGGGTTACCC
 [12] -2.27 [12] CGTCGTTTCAACCTCGTGA GAAACCCCTGGGTTACCC
 [13] -2.27 [13] CGTCGTTTCAACCTCGTGA GAAACCCCTGGGTTACCC
 [14] -2.27 [14] TCGTGACTGGGAAACCCCT ACCCAACTTAATCGCTTGC
 [15] -2.27 [15] GAAACCCCTGGGTTACCCAACTTAATCGCTTGCAGCAC
 [16] -2.27 [16] GAAACCCCTGGGTTACCCAACTTAATCGCTTGCAGCAC
 [17] -2.13 [17] GAAACCCCTGGGTTACCCAA TTAATCGCTTGCAGCAC
 [18] -2.13 [18] GAAACCCCTGGGTTACCCAA TTAATCGCTTGCAGCAC
 [19] -2.13 [19] GAAACCCCTGGGTTACCCAA TTAATCGCTTGCAGCAC
 [20] -2.13 [20] GAAACCCCTGGGTTACCCAA TTAATCGCTTGCAGCAC
 [21] -1.98 [21] GTCGTGACTGGGAAACCCCT AATCGCTTGCAGCAC
 [22] -1.98 [22] GTCGTGACTGGGAAACCCCT AATCGCTTGCAGCAC
 [23] -1.98 [23] GTCGTGACTGGGAAACCCCT AATCGCTTGCAGCAC
 [24] -2.37 [24] GAAACCCCTGGGTTACCCAA GCAGCACATCCCCCTTTC
 [25] -2.37 [25] GAAACCCCTGGGTTACCCAA GCAGCACATCCCCCTTTC

Target DNA GCAGGCATGCAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTCAACCTCGTGACTGGGAAACCCCTGGGTTACCCAACTTAATCGCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCC
 (Complement) cgtccgtacgttogaacogtgaocggagcaaatgttgcagcactgacccttggaccocaaatggatgaaatggaaacgtctgtaacgcttassssaaaacgctcaaccgattatccttctccggctgctcaccgssaaase
 CONSENSUS(*) *****

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

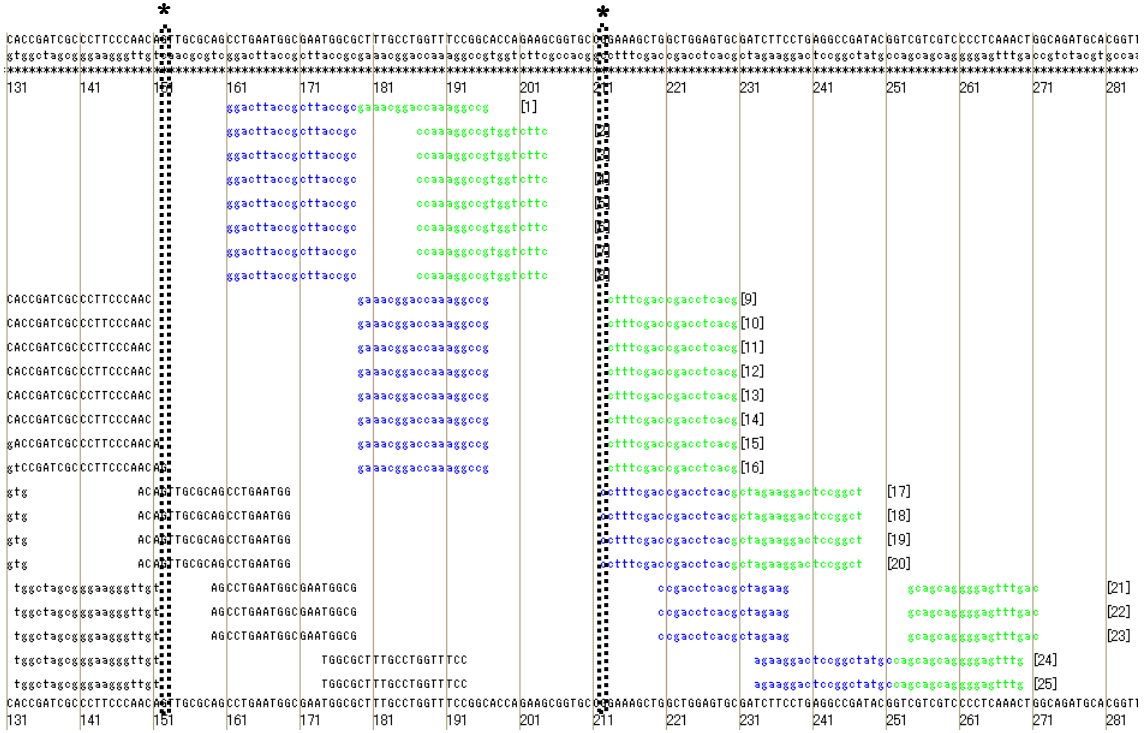


図 6.2 続き

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			F1c領域			E1c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
6				●		●													共通
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 V5 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

1. Select Range

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

Targeting Range: 147 - 148

Set Mutation

- Mut/Cons
- Clear

Fixed Primer

- F3
- F2
- F1
- B1
- B2
- B3
- Clear

Save Target

Design Option

- Default
- Common
- Specific

図 7.2 変異部位を入力した後の画面

1. Select Range

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

Targeting Range: 147 - 148

2. Generate

Generate [] sets were generated.

Set Mutation

- Mut/Cons
- Clear

Fixed Primer

- F3
- F2
- F1
- B4
- B2
- B3
- Clear

Design Option

- Default
- Common
- Specific

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

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

1. Select Range

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

Targeting Range: 211 - 216

2. Generate

Generate [] sets were generated.

Set Mutation

- Mut/Cons
- Clear

Fixed Primer

- F3
- F2
- F1
- B1
- B2
- B3
- Clear

Design Option

- Default
- Common
- Specific

ここではこの変異情報を用いる

「Generate」ボタンをクリックする

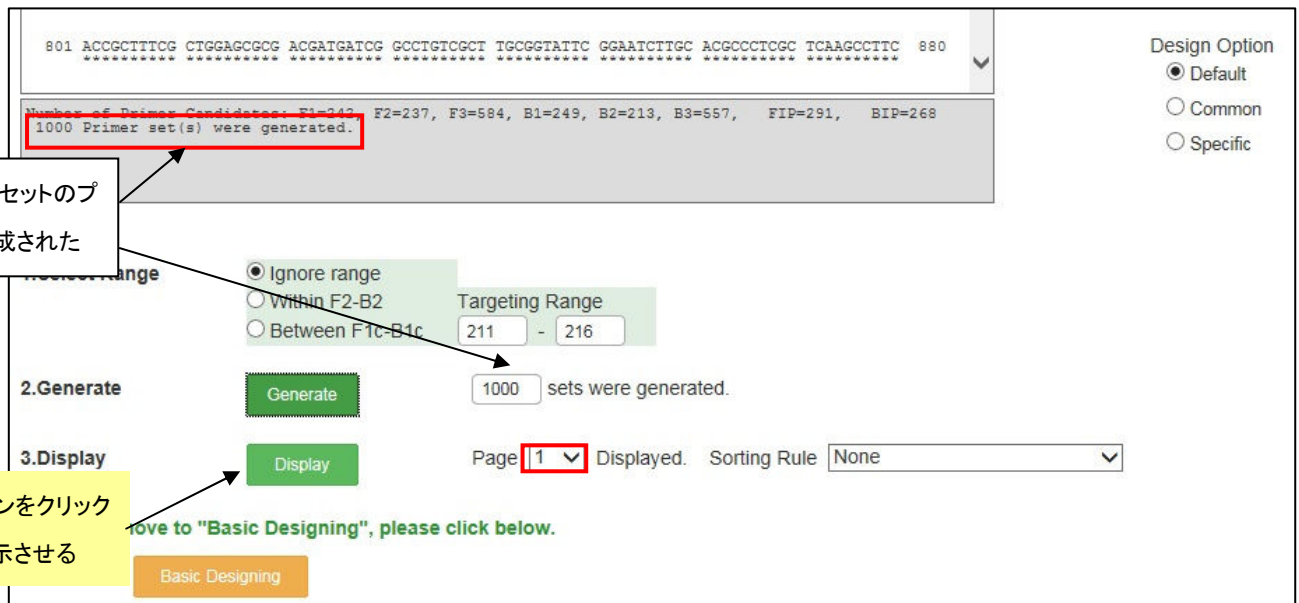


図 7. 4 設計後の画面

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 (DoG(dimer))	Target DNA	Primer Sequence	Target DNA (Complement)
[1] -2.01 [1]	TGCTAACGCACTCAGGCA	AATGCGCTCATCGTCATCC	gtgtcaatttaacgatttgcgtcagtcogtggcacataacttagattgttacgcgagtagcagtaggagccgtggcagtgggacctacgaacatccgataccgaaccaatacggccatgacgcccggagaa
[2] -2.01 [2]	TGCTAACGCACTCAGGCA	ATGCGCTCATCGTCATCC	gtgtcaatttaacgatttgcgtcagtcogtggcacataacttagattgttacgcgagtagcagtaggagccgtggcagtgggacctacgaacatccgataccgaaccaatacggccatgacgcccggagaa
[3] -2.46		GCGCTCATCGTCATCC	gtgtcaatttaacgatttgcgtcagtcogtggcacataacttagattgttacgcgagtagcagtaggagccgtggcagtgggacctacgaacatccgataccgaaccaatacggccatgacgcccggagaa
[4] -2.46		GCGCTCATCGTCATCC	gtgtcaatttaacgatttgcgtcagtcogtggcacataacttagattgttacgcgagtagcagtaggagccgtggcagtgggacctacgaacatccgataccgaaccaatacggccatgacgcccggagaa
[5] -2.46		GCGCTCATCGTCATCC	gtgtcaatttaacgatttgcgtcagtcogtggcacataacttagattgttacgcgagtagcagtaggagccgtggcagtgggacctacgaacatccgataccgaaccaatacggccatgacgcccggagaa
[6] -1.82			gtgtcaatttaacgatttgcgtcagtcogtggcacataacttagattgttacgcgagtagcagtaggagccgtggcagtgggacctacgaacatccgataccgaaccaatacggccatgacgcccggagaa
[7] -1.82			gtgtcaatttaacgatttgcgtcagtcogtggcacataacttagattgttacgcgagtagcagtaggagccgtggcagtgggacctacgaacatccgataccgaaccaatacggccatgacgcccggagaa
[8] -1.82			gtgtcaatttaacgatttgcgtcagtcogtggcacataacttagattgttacgcgagtagcagtaggagccgtggcagtgggacctacgaacatccgataccgaaccaatacggccatgacgcccggagaa
[9] -2.06			gtgtcaatttaacgatttgcgtcagtcogtggcacataacttagattgttacgcgagtagcagtaggagccgtggcagtgggacctacgaacatccgataccgaaccaatacggccatgacgcccggagaa
[10] -1.93			gtgtcaatttaacgatttgcgtcagtcogtggcacataacttagattgttacgcgagtagcagtaggagccgtggcagtgggacctacgaacatccgataccgaaccaatacggccatgacgcccggagaa
[11] -1.97			gtgtcaatttaacgatttgcgtcagtcogtggcacataacttagattgttacgcgagtagcagtaggagccgtggcagtgggacctacgaacatccgataccgaaccaatacggccatgacgcccggagaa
[12] -1.97			gtgtcaatttaacgatttgcgtcagtcogtggcacataacttagattgttacgcgagtagcagtaggagccgtggcagtgggacctacgaacatccgataccgaaccaatacggccatgacgcccggagaa
[13] -1.97			gtgtcaatttaacgatttgcgtcagtcogtggcacataacttagattgttacgcgagtagcagtaggagccgtggcagtgggacctacgaacatccgataccgaaccaatacggccatgacgcccggagaa
[14] -1.93			gtgtcaatttaacgatttgcgtcagtcogtggcacataacttagattgttacgcgagtagcagtaggagccgtggcagtgggacctacgaacatccgataccgaaccaatacggccatgacgcccggagaa
[15] -2.36			gtgtcaatttaacgatttgcgtcagtcogtggcacataacttagattgttacgcgagtagcagtaggagccgtggcagtgggacctacgaacatccgataccgaaccaatacggccatgacgcccggagaa
[16] -2.15			gtgtcaatttaacgatttgcgtcagtcogtggcacataacttagattgttacgcgagtagcagtaggagccgtggcagtgggacctacgaacatccgataccgaaccaatacggccatgacgcccggagaa
[17] -2.01			gtgtcaatttaacgatttgcgtcagtcogtggcacataacttagattgttacgcgagtagcagtaggagccgtggcagtgggacctacgaacatccgataccgaaccaatacggccatgacgcccggagaa
[18] -2.36			gtgtcaatttaacgatttgcgtcagtcogtggcacataacttagattgttacgcgagtagcagtaggagccgtggcagtgggacctacgaacatccgataccgaaccaatacggccatgacgcccggagaa
[19] -2.46			gtgtcaatttaacgatttgcgtcagtcogtggcacataacttagattgttacgcgagtagcagtaggagccgtggcagtgggacctacgaacatccgataccgaaccaatacggccatgacgcccggagaa
[20] -2.15			gtgtcaatttaacgatttgcgtcagtcogtggcacataacttagattgttacgcgagtagcagtaggagccgtggcagtgggacctacgaacatccgataccgaaccaatacggccatgacgcccggagaa

この部分に変異がある

この部分を超え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

Primer set: sorting rule [None]		Target DNA																			
(Complement)		gtgtcaatttaacgattgctgcaactgcaacatacttagattgttacgagtagcagtaggagcgtggaagtggaacctacgacatccgtatccgaaaccaataaggccatgacgcccggagaaagcccatatagcagtaaggctgtgtgagcgtcagtgata																			
CONSENSUS(*)		*****																			
Primer ID(dimer)		51	61	71	81	91	101	111	121	131	141	151	161	171	181	191	201	211			
<input type="checkbox"/> [1]	-2.01	[1]	TGCTAACGCACTCAGGCA				AATGCGTCATCGTCATCC					cogaaccaataaggccatgacg		GCCCTTTGCGGGATATCGTCC						gata	
<input type="checkbox"/> [2]	-2.01	[2]	TGCTAACGCACTCAGGCA				AATGCGTCATCGTCATCC					cogaaccaataaggccatgacg		GCCCTTTGCGGGATATCGTCC						gata	
<input type="checkbox"/> [3]	-2.46					[3]	GCGTCATCGTCATCCCTC			CGTCACCCTGGATGCTGTA				cggagaaagcccatatagcagg						CTAT	
<input type="checkbox"/> [4]	-2.46					[4]	GCGTCATCGTCATCCCTC			CCCTGGATGCTGTAGGCA				cggagaaagcccatatagcagg						CTAT	
<input type="checkbox"/> [5]	-2.46					[5]	GCGTCATCGTCATCCCTC			CTGGATGCTGTAGGCATAGG				cggagaaagcccatatagcagg						CTAT	
<input type="checkbox"/> [6]	-2.23							[6]	ACCTGGATGCTGTAGGC			GCTTGGTATGCCGACTG								ggctgtgtgagcgtcagtgTAT	
<input type="checkbox"/> [7]	-2.49								[7]	CTGGATGCTGTAGGCATAGG			GCTTGGTATGCCGACTG							ggctgtgtgagcgtcagtgTAT	
<input type="checkbox"/> [8]	-2.49								[8]	GGATGCTGTAGGCATAGG			GCTTGGTATGCCGACTG							ggctgtgtgagcgtcagtgTAT	
<input type="checkbox"/> [9]	-2.16							[9]	ACCTGGATGCTGTAGGC			GGTATGCCGACTG								ggctgtgtgagcgtcagtgTAT	
<input type="checkbox"/> [10]	-1.82										[10]	TTGGTATGCCGACTG								tgata	
<input type="checkbox"/> [11]	-1.82										[11]	TTGGTATGCCGACTG								a	
<input type="checkbox"/> [12]	-1.82										[12]	TTGGTATGCCGACTG								a	
<input type="checkbox"/> [13]	-2.16													[13]	GGGGATATCGTCCAT						
<input type="checkbox"/> [14]	-2.33													[14]	GGGATATCGTCCATCGGAC					GACATCGCACTCACTAT	
<input type="checkbox"/> [15]	-2.16													[15]	TTGTCCATTCCGACAGCA					CAGTCACTAT	
<input type="checkbox"/> [16]	-2.33													[16]	GGGATATCGTCCATCGGAC					CACTAT	
<input type="checkbox"/> [17]	-2.06																				
<input type="checkbox"/> [18]	-1.93																				
<input type="checkbox"/> [19]	-1.97																				
<input type="checkbox"/> [20]	-1.97																				

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配列の特定の領域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なる、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 V5 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

この変異情報を用いる

2) 「Generate」ボタンをクリックする

3) プライマーが設計された後「Display」ボタンをクリックする

1) 「F3 5' term」のボックスをチェックする

Set Mutation
Mut/Cons
Clear

Fixed Primer
F3
F2
F1
B1
B2
B3
Clear

Save Target

Design Option
Default
Common
Specific

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

Generate
sets were generated.

Display
Page 1 displayed. Sorting Rule None

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

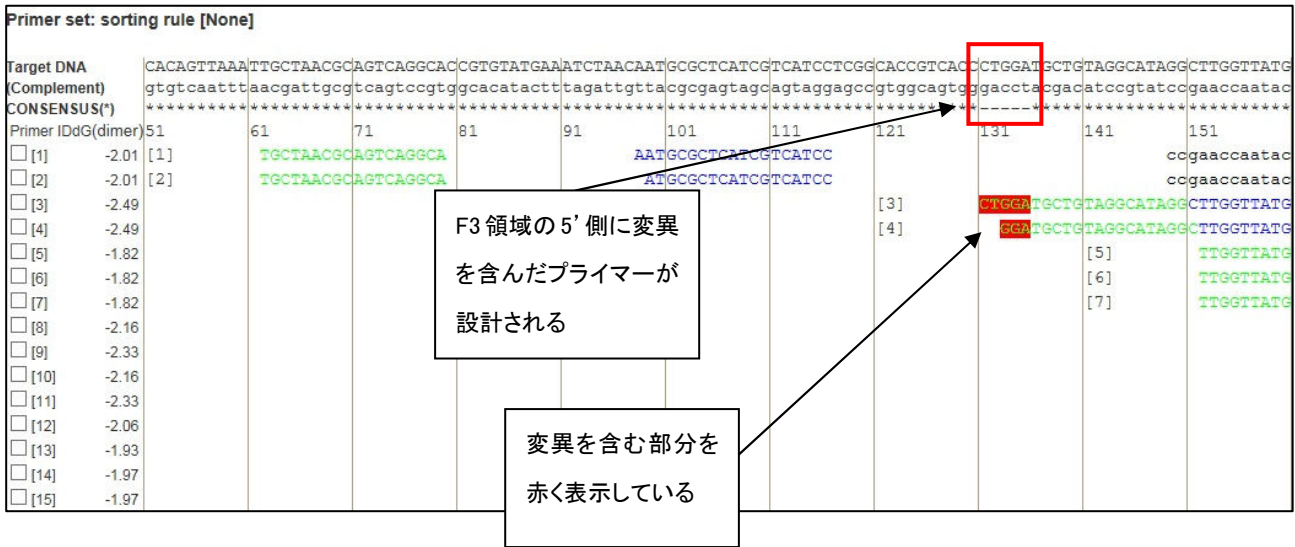
Peculiarity	Permission	
	F1c/B1c	F2/B2
high level	F1c 5'term	B1c 5'term
↑	F2 3'term	B2 3'term
	F3 3'term	B3 3'term
	F1c inner	B1c inner
	F2 inner	B2 inner
	F3 inner	B3 inner
	F1c 3'term	B1c 3'term
	F2 5'term	B2 5'term
↓	F3 5'term	B3 5'term
low level		

Reset Parameter

プライマーが設計されたら、続いて「Display」ボタンをクリックして結果を表示させます。図 7. 8の一覧表示画面を見ると、プライマー内に変異を含む部分が赤く表示されています。F3プライマー領域の5'末端に変異を含むような設定をしましたので、今回はF3領域の5'末端に変異が含まれるような設計がされます。

<参考>
 変異を含む領域を指定した場合の設計順序は、変異が含まれる指定した領域(例えば F3 5' 末端)を含むプライマー領域はフィルターで除かれず、残った領域とともに組み合わ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	Permission			
		high level	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					

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)

Primer set: sorting rule [None]

Target DNA	CACAGTTAAAATTGCTAACGCAGTCAGGCACCGTGTATGAAATCTAACAATGCGCTCATCGTCATCCTCGGCACCGTCACCCCTGGATGCTGTAGGCATAGGCTTGTTATG										
(Complement)	gtgtcaatttaacgattgcgtcagtcctgtgcacatacttagattgtaacgagtagcagtaggagccgtggcagtgggacotacgacatccgtatccgaaccaatac										
CONSENSUS(*)	*****										
Primer IDdG(dimer)	51	61	71	81	91	101	111	121	131	141	151
<input type="checkbox"/> [1]	-2.01	[1]	TGCTAACGCAGTCAGGCA			AATGCGCTCATCGTCATCC			CTGCTAGGCTAGG		ccgaaccaatac
<input type="checkbox"/> [2]	-2.01	[2]	TGCTAACGCAGTCAGGCA			ATGCGCTCATCGTCATCC			CTGCA		ccgaaccaatac
<input type="checkbox"/> [3]	-2.46				[3]	GCGCTCATCGTCATCCTC			CTGCTAGGCTAGG		
<input type="checkbox"/> [4]	-2.49							[4]	CTGCA		CTTGTTATG
<input checked="" type="checkbox"/> [5]	-2.49							[5]	GGA		CTTGTTATG
<input type="checkbox"/> [6]	-1.82									[6]	TGTTATG
<input type="checkbox"/> [7]	-1.82									[7]	TGTTATG
<input type="checkbox"/> [8]	-1.82									[8]	TGTTATG
<input type="checkbox"/> [9]	-2.16										
<input type="checkbox"/> [10]	-2.33										
<input type="checkbox"/> [11]	-2.16										
<input type="checkbox"/> [12]	-2.33										
<input type="checkbox"/> [13]	-2.06										
<input type="checkbox"/> [14]	-1.93										
<input type="checkbox"/> [15]	-1.97										

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

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. マルチプル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 V5 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      AATGCTACTACTATTAGTAGAATTGATGCCACCTTTTCAGCTCGCGCCCAATGAAAAT 60
SeqB      -----AATTGATGCCACCTTTTCAGCTTCGCTCCAAATGAACAT 40
SeqC      -----CTCGCGCCCACTTGAAAAT 20
          ** **** * **

SeqA      ATAGCTAAACAGGTTATTGACCATTTGCGAAATGTATCTAATGGTCAAACCTAACTACT 120
SeqB      ATAGCTACACAGCTTATTGACCATTTGCGAAATGTATCTAATGGTCAAACCTAACTACT 100
SeqC      ATCGCTAAACAGGTCGTTGACCATATGCGAAGTGTATCTAATGGTCAAACCTAACTACT 80
          ** **** * ** ***** **

SeqA      CGTTGCGAGAATTGGGAATCAACTGTTACATGGAATGAACTCCAGACACCGTACTTTA 180
SeqB      CGATGCGAGAATCGGAATCAACTGTTACATGGAATGAACTCCAGACACCGTACTTTA 160
SeqC      CGTTGGAAGAATTGGCAATCAACTGTAACATGAACTCCAGACACCGTACTTTA 140
          ** * ** * ** * ** ***** **

SeqA      GTTGATATTTAAACATGTTGAGCTAGACACCAGATTCAGCAATTAAGCTCTAAGCCA 240
SeqB      GTTCATATGTAACCCATGTTGAGCTAGACACGAGTTTCAGCAATTAAGCTCTAAGCCA 220
SeqC      GTTGATATTTAAATCATGTTGAGCTAGACACAGATTCAGCACGTAAGCTCTAAGCCA 200
          ** * ** * ** * ** ***** **

SeqA      TCCGCAAAAATGACCTCTTATCAAAAGGAGCAATTAAGGTAAGTCTCTAATCCTGACCTG 300
SeqB      TCCGCAAAAATGACCTCTTATCAAAAGGAGCAATTAAGGTAAGTCTCTAATCCTGACCTG 280
SeqC      TCCGCAAACTGTGACCTCTTAAACAAAAGGAGCAATTAAGGTAAGTCTCTAATCCTGACATG 260
          ***** ** ***** **

SeqA      TTGGAGTTTGCCTTCGGTCTGGTTTCGCTTTGAAGCTCGAATTAACACGCGATATTTGAG 360
SeqB      TTGGAGTTTGCCTTCGGTCTGGTTTCGCTTTGAAGCTCGAATTAACACGCGATATTTGAG 340
SeqC      TCGGAGTTTAGCTTCGGTCTGGTTTCGCTTTGAAGCTCGAATTAACACGCGATATTTGAG 320
          * ***** ** ***** **

SeqA      TCTTTCGGGCTTCCTCTTAATCTTTTGTGCAATCCGCTTTGCTTCTGACTATAATAGT 420
SeqB      TCTTTCGGGCTTCCTCTTAATCTTTTGTGCAATCCGCTTTGCTTCTGACTATAATAGT 400
SeqC      CCTTTCAGGCTTCCTCTGAATCTTTTGTGCAATCCGCTTTGCTTCTGACTATAATAGT 380
          ***** ** ***** **

SeqA      CAGGGTAAAGACCTGATTTTGTATTTATGGTCATTCTCGTTTTCTGAAGTGTAAAGCA 480
SeqB      CAGGGTAAAGACCTGATTTTGTATTTATGGTCATTCTCGTTTTCTGAAGTGTAAAGCA 460
SeqC      CACGGTAAAGACCTGATTTTGTATTTATGGTCATTCTCGTTTTCTGAAGTGTAAAGCA 440
          ** ***** ** ***** **

SeqA      TTTGAGGGGATTCA 495
SeqB      TTTGAGGC----- 468
SeqC      TTAGAGGG----- 448
          ** ****
    
```

図 8.1 マルチアライメント

UPLOAD FILE: Alignment.txt

1 AATGCTACTA CTATTAGTAG AATTGATGCC ACCTTTTCAG CTCGCGCCCA AATGAAAAT ATAGCTAAAC AAGTTATTGA 80

 81 CCATTTGCGA AATGTAICTA ATGTCRAAC TAAATCTACT CGTTGCGAGA ATTGGGAATC AACTGTATCA TCGAATGAAA 160

 161 CTTGCGAGCA CGTACTCTTA GTTGCAATTT TAAACATGTT TGAGCTAGAC CACGCAATTC AGCAATTAAG CTTAAGCCA 240

 241 TCCGCAAAA TGAACCTCTT TCAAAAGGAG CAATTAAGG TACTCTCTAA TCTGACCTG TTGGAGTTTC CTTCCGCTCT 320

 321 GGTTCGCTTT GAGCTCGAA TFAAAGCGCG AATTTGAGG TCTTTCGGGC TTCTCTTFAA TCTTTTGTAT GCAATCCGCT 400

 401 TTGCTCTGA CTATAATAGT CAGGGTAAAG ACCTGATTTT TGATTTATGG TCAATCTCGT TTCTGAACT GTTTAAAGCA 480

 481 TTTGAGGGG ATTCA 495
 *****

Number of Primer Candidates: F1=107, F2=123, F3=144, B1=131, B2=129, B3=170, FIP=181, BIP=176
 5 Primer set(s) were generated.

1.Generate 5 sets were generated.

Set Mutation

Fixed Primer

Design Option
 Default
 Common
 Specific

- 1) 「Common」ボタンをクリックする
- 2) 「Generate」ボタンをクリックする

図 8.2 マルチアライメント読み込み画面

PrimerExplorer V5
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 for loop primer designing.

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

Order

DesignId 160419140508

Primer Information

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

label	5'pos	3'pos	len	Tm	5'dG	3'dG	GCrat	Sequence
F3	160	177	18	56.40	-4.85	-4.90	0.50	CTT CAGAC CCGTACT
B3	348	368	21	56.71	-5.30	-5.16	0.43	C GAAAGC TTCAA TATCGC
F1P			45					TGCGGAT GC TAGAGCTTA-TAT TAA CATGTTGAGCTACAGC
B1P			44					GGTACT TCTAATC TGAC TGT TA TCGAGCTTCAAAAGCGAA
F2	187	211	25	57.98	-1.98	-4.98	0.32	TAT TAA CATGTTGAGCTACAGC
F1c	227	246	20	60.67	-6.94	-4.32	0.50	TGCGGAT GC TAGAGCTTA
B2	323	342	20	57.85	-4.34	-5.93	0.40	TA TCGAGCTTCAAAAGCGAA
B1c	279	302	24	60.91	-4.57	-5.00	0.46	GGTACT TCTAATC TGAC TGT

Primer Information

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

label	5'pos	3'pos	len	Tm	5'dG	3'dG	GCrat	Sequence
F3	226	244	19	55.93	-4.09	-5.68	0.47	TAGCTCTA GC ATCCG
B3	404	426	23	56.19	-5.84	-4.35	0.39	ACC TGACTA TATAGTCAGAG
F1P			48					ACTCC ACA GTCA GATTAGA CA CA TGACCTCTTA CA AAGGA
B1P			43					GGTCTGGTTCGCTTTGAGC-TGCATCAA GAGATT GAGGGAA
F2	245	269	25	57.71	-3.44	-4.36	0.32	CAA TGACCTCTTA CA AAGGA
F1c	285	307	23	61.09	-5.25	-3.43	0.48	ACTCC ACA GTCA GATTAGA
B2	371	393	23	56.24	-5.31	-4.71	0.30	TGCATCAA GAGATT GAGGGAA
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	GCrat	Sequence
F3	127	146	20	55.09	-3.90	-4.55	0.40	GGAAT GG ATCACTGT
B3	322	339	18	57.03	-6.28	-6.19	0.50	TGAGCTTCAAAAGCGAAC
F1P			42					CTGAA CT TGCTGTAGCTCAA-GAA CTT CAGAC CCGTA
B1P			41					TCCGCAAA TGACCTCTTA CA-CAGACC GAGGC AACTC
F2	157	175	19	55.99	-4.01	-5.41	0.47	GAA CTT CAGAC CCGTA
F1c	200	222	23	62.33	-3.90	-5.26	0.48	CTGAA CT TGCTGTAGCTCAA
B2	304	321	18	57.09	-5.35	-4.01	0.56	CAGACC GAGGC AACTC
B1c	241	263	23	60.17	-6.94	-3.15	0.39	TCCGCAAA TGACCTCTTA CA

図 8.4 プライマー詳細情報画面

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 V5
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 for loop primer designing.
3. Push "Save" button to download the primer information in the screen display layout.

DesignId 160419162437

1 ID:67 dimer(minimum)dG=-2.46

label	5'pos	3'pos	len	Tm	5'dG	3'dG	GCrate	Sequence
F3	168	186	19	55.94	-6.33	-5.57	0.42	AC CCGTACTT AGT CA
B3	348	368	21	56.71	-5.30	-5.16	0.43	C GAAAG C TCAA TATCGC
FIP		45						TGCGGAT GC TAGAGCTTA-TAT TAA CAIGTTGAGCTACAGC
BIP		43						T A GGTACT TCTAATC TGAC T TCGAGCTTCAAAGCGAA
F2	187	211	25	57.98	-1.98	-4.98	0.32	TAT TAA CATGTTGAGCTACAGC
F1c	227	246	20	60.67	-6.94	-4.32	0.50	TGCGGAT GC TAGAGCTTA
B2	323	340	18	56.33	-5.04	-5.93	0.44	TCGAGCTTCAAAGCGAA
B1c	275	299	25	60.01	-3.69	-5.25	0.40	T A GGTACT TCTAATC TGAC T

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

label	5'pos	3'pos	len	Tm	5'dG	3'dG	GCrate	Sequence
F3	261	281	21	55.33	-3.69	-4.50	0.33	CA AAGAGCA TT A GGT
B3	446	466	21	55.17	-4.02	-4.13	0.38	CAG AACGAGAAATGACCA
FIP		45						GCGT TT A TCGAGCTTCAAAGC-C TCTAATC TGAC TGT G
BIP		46						A G CTTTC GGTTCCTCT AATC-CA AATCAGGCTTTACC T
F2	283	303	21	56.73	-4.43	-4.66	0.48	CT TCTAATC TGAC TGT G
F1c	326	349	24	61.49	-5.84	-5.01	0.42	GCGT TT A TCGAGCTTCAAAGC
B2	422	442	21	55.38	-3.44	-4.92	0.38	CA AATCAGGCTTTACC T
B1c	358	382	25	62.64	-4.24	-2.75	0.44	A G CTTTC GGTTCCTCT AATC

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

label	5'pos	3'pos	len	Tm	5'dG	3'dG	GCrate	Sequence
F3	113	131	19	55.44	-2.98	-5.26	0.42	A TCTACTCG TCG AGAA
B3	304	321	18	57.09	-5.35	-4.01	0.56	CAGACC GAAGC AACTC
FIP		46						FGCTGTAGCTCAACATG TTA A-GG AATCAACTGT ACATG A
BIP		46						AG TTCAGCA TAAGCTCTA GC-GTCA SATTAGA AGTACC T
F2	134	154	21	57.29	-4.85	-4.91	0.43	GG AATCAACTGT ACATG A
F1c	189	213	25	60.35	-5.90	-2.09	0.36	FGCTGTAGCTCAACATG TTA A
B2	277	297	21	55.25	-5.35	-4.08	0.43	GTCA GATTAGA AGTACC T
B1c	214	238	25	60.09	-3.90	-4.42	0.40	AG TTCAGCA TAAGCTCTA GC

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: Alignment.bt

```

1 AATCTACTA CTATAGTAG AATGATGCG ACCTTTTCAG CTCGGCCGCC AAATGAAAT ATAGCTAAGC AGTATATGA 90
81 CCAITTCGGA AATGTATCTA ATGGTCAAC TAATCTACT CGTTCGCGA AITGGGATC AACTCTTACA TGGATGAAA 160
161 CTTCAGACA CGTACTTITA GTTGCATAT TAARCATGT TGACTACAG CACCAGATC AGCAATTAAG CTCTAAGCCA 240
241 TCGGCAAAA TGACCTCTTA TCAAAAGGAG CAATTAAGC TACTCTTAA TCGTACCTG TTGGAGTTG CTTCGGTCT 320
321 GGTTCGCTT GAGCTCGGA TTAAGCGG ATATTTGAG TCTTTCGGC TTCTCTTAA TCTTTTGAAT GCAATCGCT 400
401 TTCTTCTGA CTATAAGT CAGGTAAG ACCTGATTT TGAITATGG TCATCTCTT TTCTGAACT GTTAAAGCA 480
481 TTTCAGGGG ATTCA ..... 495
    
```

Number of Primer Candidates: F1=392, F2=346, F3=429, B1=316, B2=316, B3=395, F1P=652, B1P=593
 982 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 Targeting Range
 Between F1c-B1c

2. Generate
 Generate 982 sets were generated.

3. Display
 Display Page 1 | 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

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
 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			
	F1c 5'term	F1c 3'term	B1c 5'term	B1c 3'term
↑ high level	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
↓ low level	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

Reset Parameter

「Generate」ボタンをクリックする

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

