

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

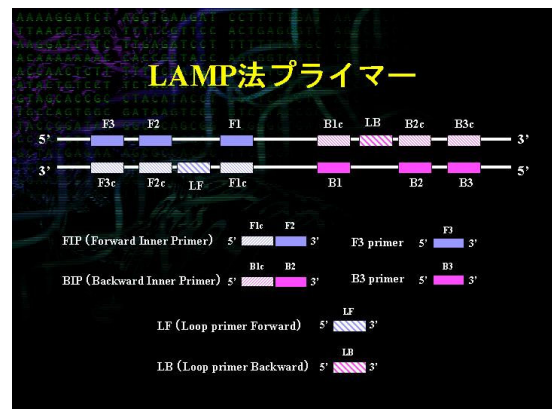
PrimerExplorer V5 のご紹介

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。

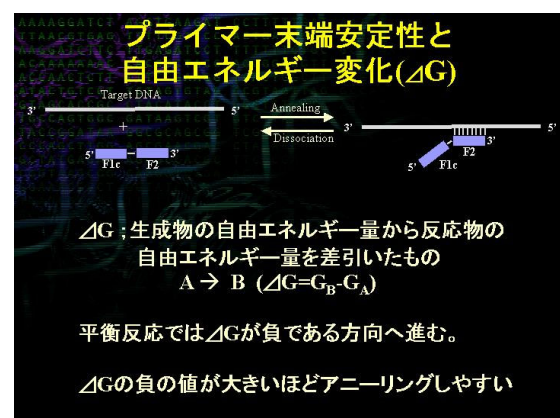
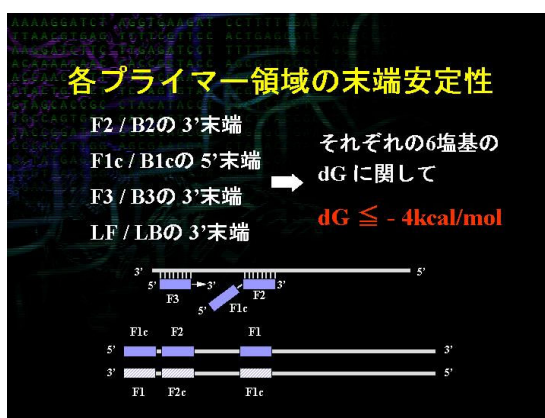
T_m 値計算実験条件としては、塩濃度やオリゴ濃度の影響を受けやすいため、一定条件での算出が望ましいとされています (オリゴ濃度を $0.1 \mu\text{M}$ 、ナトリウムイオン濃度を 50mM 、マグネシウムイオン濃度を 4mM)。

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

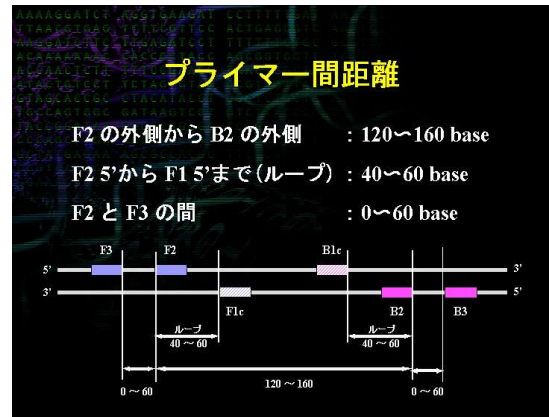
特に Inner primer に関しては、極端に二次構造をとらないように設計します。

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。

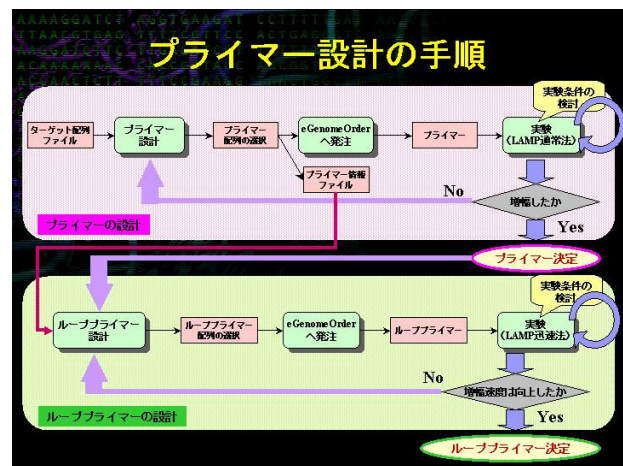
F2 領域の 5' 末端から F1 領域の 5' 末端まで(ループを形成する部分)は 40 から 60 base になるように設計します。F2 領域と F3 領域の間の距離は 0 から 60 base になるように設計します。



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

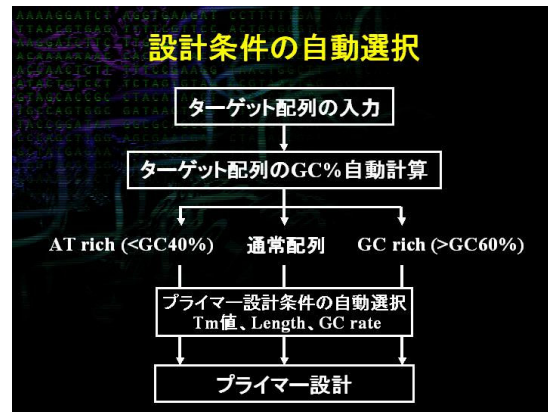
ユーザー自身がプライマー設計条件を入力してプライマーを設計します。デフォルトとして、通常配列(45%<GC<60%)を対象としたプライマー設計条件があらかじめ入力されています。ターゲット配列が AT rich(GC 含量<45%)または GC rich 配列(GC 含量>60%)の場合には、T_m 値、Length、GC 含量について以下の条件を設定してプライマーを設計します。

	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。

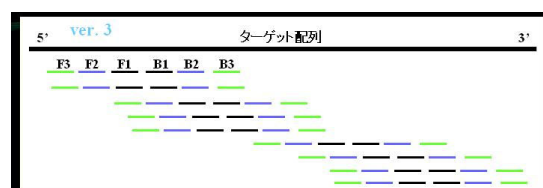
4.6 ループプライマーの設計

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。

アライメント解析ファイルの自動変換

SeqA 1: AATGCTACTACTATTAGTAGAAATTGATGCCACCTTTTCAGCTCGGCGCCCAAAATGAAAAT 60
 SeqB 1: -----AATGATGCCACCTTTTCAGCTTGGGTCACAAATGAACT 40
 SeqC 1: -----CTGCGCCCCAGTTGAAAAT 20

SeqA (1段目を基準にして、
 配列が一致する部分に「* (アスタリスク)」、
 配列が不一致の部分に「- (ハイフン)」、
 配列データがない部分に「. (ドット)」

```
1: AATGCTACTACTATTAGTAGAAATTGATGCCACCTTTTCAGCTCGGCGCCCAAAATGAAAAT 60
. . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
61: ATAGCTAACACAGGTTATTGACCAATTGCGAAATGTATC TAATGGTCAAACTAAATCTACT 120
* * . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
21: ATCGCTAACACAGGTCCTTGACCAATTGCGAAATGTATC TAATGGTCAAACTAAATCTACT 120
* * . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
```

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。

共通/特異的検出用プライマーの自動設計

感染症のプライマー設計で、最も多用される手法！

共通プライマー

特異的プライマー

Tokyo/SP12
 Osaka/KU1973
 Kyoto/LG4930
 Laos/DB6943
 Hong Kong/XF0024
 New York/DB49569
 Thailand/CA552
 Hong Kong/AB23
 Cambodia/IN97493
 Egypt/TH23

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。

末端の構造チェック

1) 末端構造のチェック(相補的配列、特殊配列の排除)

```
5'-ATCGGTCA.....CCCGGG-3'
5'-ATCGGTCA.....CAATTG-3'
5'-ATCGGTCA.....CCGGGG-3'
```

2) ターゲット配列との相補性チェック

プライマー TTTCAGCC
 AAAGTICGGCA
 プライマー TTTCAGCC
 TGAAGTICGAA

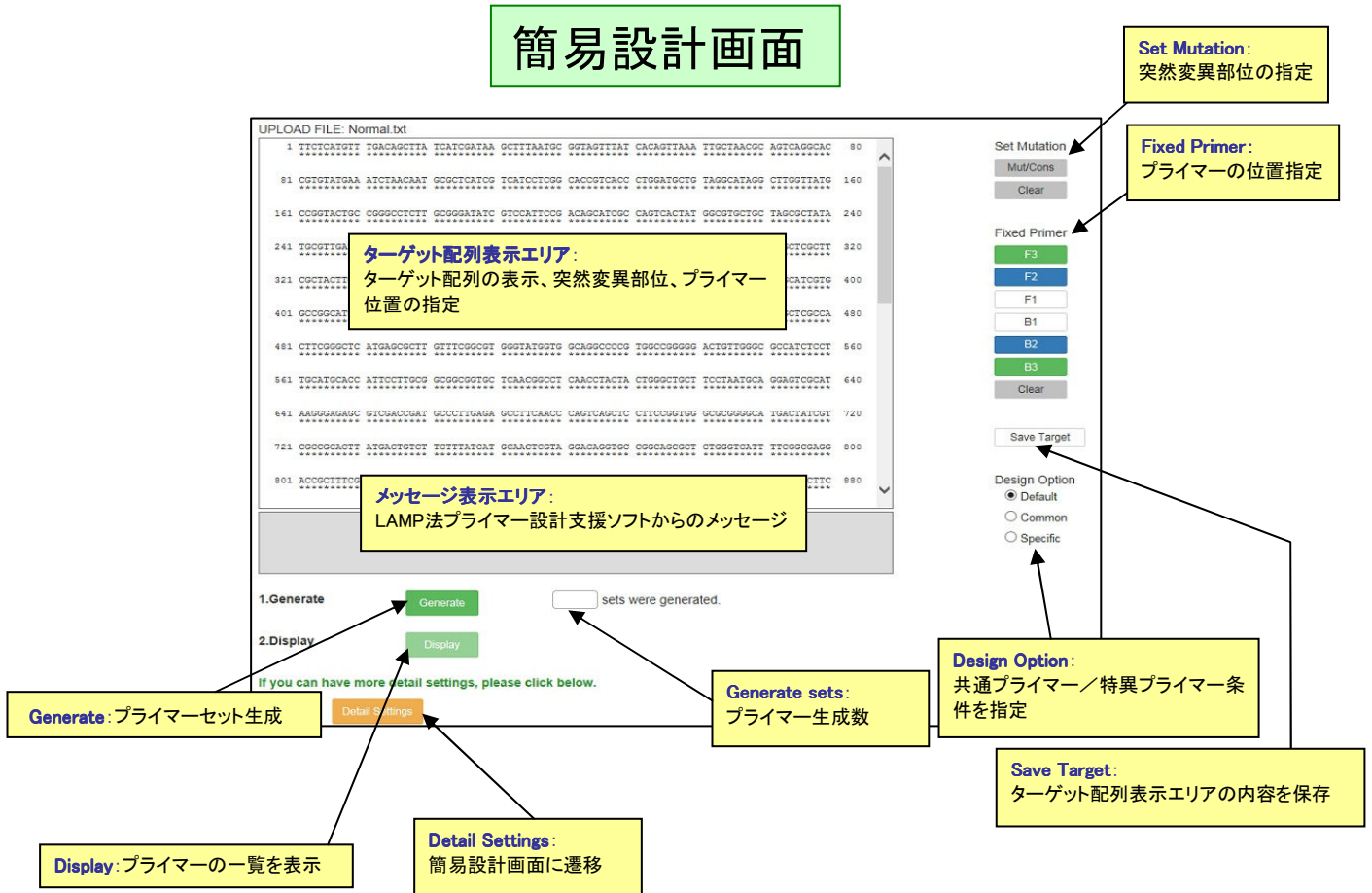
4. 15 プライマーセット配列情報の保存機能

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 TGGGATAGG CTTGGTATP 160
161  CCGGTACTGC CGGGGCTTT GGGGATATC GTCCATTCG ACAGCATGC CAGTCACAT GGGGTCTGC TACGCTATA 240
241  TCC 320
321  CCG 400
401  GCG 480
481  TTTCGGCTTC ATGAGCGCTI GTTTCGGCT GGTATAGTG GAGGCCGCG TGGCGGGGG ACTGTGGGG GCACATCTCI 560
561  TCAATGCAC ATTCCTTGGG GGGGGGTGC TCAAGCGCTI GACCTACTA CTGGCTTCT ICTTAATGA GAGTGTGAT 640
641  AAGGGAGGC GTGACCGAT GCGCTTARG GCGTTCAGC CAGTCAAGC TTTCGGTGG GCGGGGGGA TGACTATGT 720
721  CGCGCACTI ATGACTGCTI ICTTATCAT GCAACTGTA GAGAGGTC GGGCAGCGT CTGGTCAIT TTGGGGAGP 800
801  ACCGCTTTC CTGGAGCGG AGGATGATG GCGTGTGCTI TGGGTATTC GGAATCTGC AGCGCTTGC 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]

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			
	F1c 5'term	B1c 5'term	F2 3'term	B2 3'term
high level ↑	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
low level ↓	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Set Mutation: 突然変異部位の指定
[Mut/Cons] [Clear]

Fixed Primer: プライマーの位置指定
[F2] [F1] [B1] [B2] [B3] [Clear]

Save Target: ターゲット配列表示エリア内容を保存
[Save Target]

Design Option: 共通プライマー / 特異プライマー条件を指定
[Design Option] Default Common Specific

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
[Save Parameter] [Reset Parameter]

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
[Reset Parameter]

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 'PrimerInfo_Normal' upload file 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 box highlights the 'ターゲット配列表示エリア' (Target sequence display area) with the text: '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' (Display of target sequence, mutation sites, and primer position specification). Below the sequence viewer is a 'メッセージ表示エリア' (Message display area) containing the text: 'LAMP法プライマー設計支援ソフトからのメッセージ' (Message from LAMP primer design support software). At the bottom, there are two main steps: '1. Generate' and '2. Display'. The 'Generate' step includes a 'Generate' button and a text field 'sets were generated.'. The 'Display' step includes a 'Display' button, a 'Page 1' dropdown menu, and the text 'Displayed.'. A 'Detail Settings' button is also present. Annotations in yellow boxes explain these elements: '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 CACAGTAAA TTGCTAACGC AGTCAGGCAC 80
81 CGTGTATGAA ATCTAACAAAT GCGGCICATCG TCATCCICGG CACCGTCRACC CTGGATGCTG TAGGCATAGG CTTGGTITATG 160
161 CCGGTACTGC CCGGCTCTIT GCGGGATAIC GTCCAITTCG ACAGCATCGC CAGTCACTAT GCGGTGCTGC TAGGGCTATA 240
F3===== <=====F2===== <=====F1=====
241 TCGGTTGATG CAATITCTAT GCGCAGCCGT TCTCGAGGA CTGTCCGACC GCITTGCCCG CCGCCACATC CTGCTCGCIT 320
<=====B1===== <=====B
321 CGCTACTTGG AGCCACTATC GACTACGGGA TCATGGCGAC CACACCCGTC CTGTGGATCC TCTACGCCGG ACCCATCTGC 400
Z=====
401 GCGCGCAT TCGGCTGCTG TCGGCTGCTG TCGGCTGCTG TCGGCTGCTG TCGGCTGCTG TCGGCTGCTG TCGGCTGCTG 480
481 CTTCGGGC TCGGCTGCTG TCGGCTGCTG TCGGCTGCTG TCGGCTGCTG TCGGCTGCTG TCGGCTGCTG TCGGCTGCTG 560
561 TGCATGCACC AITTCITGG GCGGGGCTGC TCAACGGCTT CAACTACTA CTGGGCTGCT TCTTAATGCA GGATGCGCAT 640
641 AAGGGAGAGC GTCCAGCGAT GCGGCTGAGA GCGGCTGAGA GCGGCTGAGA GCGGCTGAGA GCGGCTGAGA GCGGCTGAGA 720
721 GCGGCTGAGA GCGGCTGAGA GCGGCTGAGA GCGGCTGAGA GCGGCTGAGA GCGGCTGAGA GCGGCTGAGA GCGGCTGAGA 800
801 ACCGCTTTCG CTGGAGCGCG ACGATGATCG GCGGCTGCGT TCGGCTGCTG GCGGCTGCTG ACGGCTGCTG TCAAGCCTTC 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			← Distance: 各プライマー間距離について指定
	3'stability	-4.0			

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。

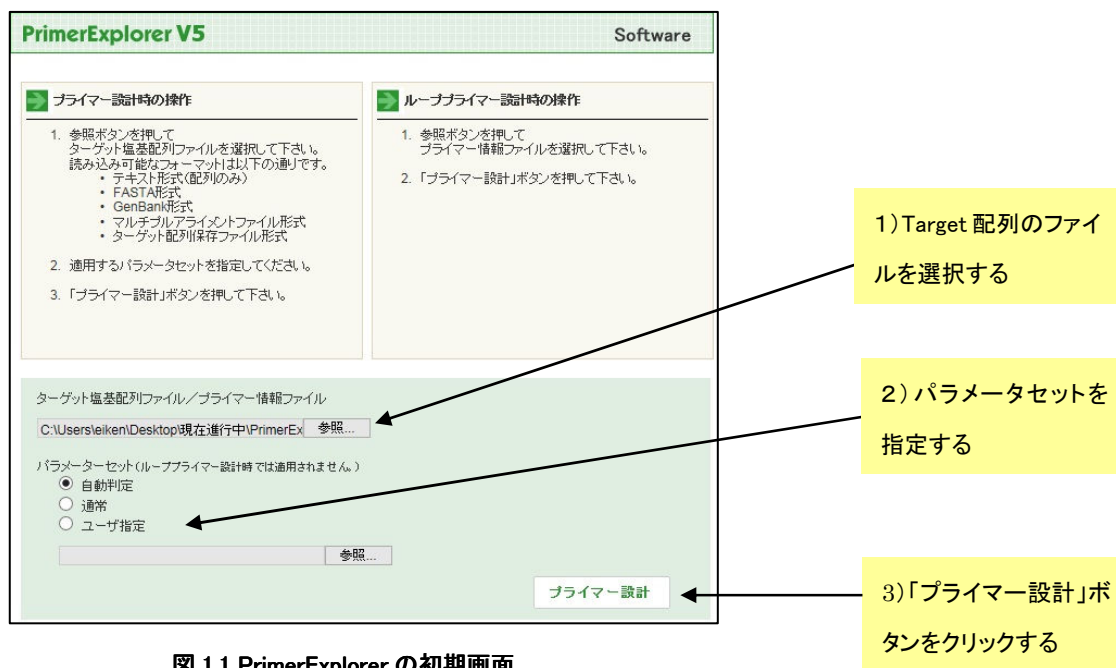


図 1.1 PrimerExplorer の初期画面

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 several control panels: 'Set Mutation' with 'Mut/Cons' and 'Clear' buttons; 'Fixed Primer' with buttons for F3, F2, F1, B1, B2, B3, and 'Clear'; and 'Design Option' with radio buttons for 'Default' (selected), 'Common', and 'Specific'. Below the sequence, there is a '1.Generate' section with a green 'Generate' button and a text field showing '0 sets were generated.'. Below that is a '2.Display' section with a green 'Display' button. At the bottom, there is a link for 'Detail Settings' and a note: 'If you can have more detail settings, please click below.'. Two yellow callout boxes with arrows point to the 'Generate' and 'Display' buttons, with text: 「Generate」ボタンをクリックする and 「Display」ボタンをクリックする.

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。

PrimeExplorer V5 Software

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

Design# 76042090709

Confirm Save List

Prime set name rule (Easy)	Design#	Order	Check
(1) Prime DVA	104	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
CONS NGUS (1)	111	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prime DVA (Prime)	111	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(28) - 36	128	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(40) - 45	(40)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(8) - 423	(8)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(18) - 97	(18)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(88) - 195	(88)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Design# 07019143952

Display 1 / 5

Prime set name rule (Easy)	Design#	Order	Check
(20) Prime DVA	204	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(25) Prime DVA	254	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(30) Prime DVA	304	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(35) Prime DVA	354	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(40) Prime DVA	404	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(45) Prime DVA	454	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(50) Prime DVA	504	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(55) Prime DVA	554	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(60) Prime DVA	604	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(65) Prime DVA	654	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(70) Prime DVA	704	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(75) Prime DVA	754	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(80) Prime DVA	804	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(85) Prime DVA	854	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(90) Prime DVA	904	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(95) Prime DVA	954	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(100) Prime DVA	1004	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(105) Prime DVA	1054	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(110) Prime DVA	1104	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(115) Prime DVA	1154	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(120) Prime DVA	1204	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(125) Prime DVA	1254	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(130) Prime DVA	1304	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(135) Prime DVA	1354	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(140) Prime DVA	1404	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(145) Prime DVA	1454	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(150) Prime DVA	1504	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(155) Prime DVA	1554	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(160) Prime DVA	1604	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(165) Prime DVA	1654	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(170) Prime DVA	1704	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(175) Prime DVA	1754	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(180) Prime DVA	1804	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(185) Prime DVA	1854	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(190) Prime DVA	1904	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(195) Prime DVA	1954	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Prime set name rule (Easy)	Design#	Order	Check
(200) Prime DVA	2004	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(205) Prime DVA	2054	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(210) Prime DVA	2104	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(215) Prime DVA	2154	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(220) Prime DVA	2204	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(225) Prime DVA	2254	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(230) Prime DVA	2304	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(235) Prime DVA	2354	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(240) Prime DVA	2404	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(245) Prime DVA	2454	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(250) Prime DVA	2504	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(255) Prime DVA	2554	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(260) Prime DVA	2604	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(265) Prime DVA	2654	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(270) Prime DVA	2704	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(275) Prime DVA	2754	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(280) Prime DVA	2804	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(285) Prime DVA	2854	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(290) Prime DVA	2904	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(295) Prime DVA	2954	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(300) Prime DVA	3004	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

「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

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 GCTTTAATGC GGTAGTTTAT CACAGTTAAA TTGCTAOCPC AGTCAGGCAC 80

81 CGTGTATGAA ATCTAACAAI GGGCTCATCG ICATCCCTGG CACCGTCACC CTGGATGCTG TAGGCATAGG CTTGGTATG 160

161 CCGGTACTGC CCGGCTCTIT GCGGATAATC GTCCATTCGG ACAGCAATCG CAGTCACTAT GGGCTGCTGC TAGGCCTATA 240

241 TGGGTATGATG CATTITCTAT GCGCACCGGT ICTGGGAGCA CTGTCCGACC GCTTGGGCGC CCGCCAGCTC CTGCTGGCIT 320

321 CGCTACTTGG AGCCACTATC GACTAGCGCA TCAATGCGCA CACACCCGTC CTGTGGATCC TCTACGCGCG ACGCATCGTG 400

401 GCGGGCAICA CCGGCGCCAC AGGTGCGGTT GCTGGGCGCT ATATCGCGCA CAATCCGAT GGGGAAGATC GGGCTGGCCA 480

481 CTTCGGCTC ATGAGCGCTT GTTTCGGCT GGGTATGGTG GCAGGCGCGG TGGCGGCGGG ACTGTGGGCG GCCATCTCCT 560

561 TGCAATGCACC ATTCTTGGG GCGGCGGCTG TCAACGCGCT CAACCTACTA CTGGGCTGCT TCTTAAATCA GGAGTGGCAT 640

641 AAGGAGAGC GTCCACCGAT GCCCTGAGA GCCCTCACC CAGTCAGCTC CTTCGGTGG GCGCGGCGCA TGAATATGCT 720

721 CCGCGCACTT ATGACTGCTT TCTTATCAT GCACTCTGTA GACAGGCTG CCGCAGCGCT CTGGGTCATT TTGGGCGAGG 800

801 ACCGCTTTCG CTGGAGCGCG ACGATGATCG GCCTGTGCTT TCGGTATTC GGAATCTTGC ACGCCCTCGC TCAAGCCTTC 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 GCTTTAATC GGTAGTTAT CACAGTAAA TTGCTAACG ATCCAGGCA 80
CGCTATATA ATCTAACAT GGGCCATCG TCACTCCCG CAGCCCTAC CTGGATCTG TAGCCATAGC CTGGTTATD 160
CGCTATATA ATCTAACAT GGGCCATCG TCACTCCCG CAGCCCTAC CTGGATCTG TAGCCATAGC CTGGTTATD
161 CCGTACTGC CCGGCTCTT CCGGAAATC GTGATTCDD ACAGCATDC CAGTCAAT GGCCTCTDC TAGCCATAG 240
CGCTATATA ATCTAACAT GGGCCATCG TCACTCCCG CAGCCCTAC CTGGATCTG TAGCCATAGC CTGGTTATD
241 TCGTTGATG CAATTTTAT GGCACAGCT TTGCGAGCA CTTCGACG GCTTTCGCG CCGCCCTAGC CTCTCTGCT 320
CGCTATATA ATCTAACAT GGGCCATCG TCACTCCCG CAGCCCTAC CTGGATCTG TAGCCATAGC CTGGTTATD
321 CCGTACTGC CCGGCTCTT CCGGAAATC GTGATTCDD ACAGCATDC CAGTCAAT GGCCTCTDC TAGCCATAG 400
CGCTATATA ATCTAACAT GGGCCATCG TCACTCCCG CAGCCCTAC CTGGATCTG TAGCCATAGC CTGGTTATD
401 GCGCATGTA CCGGCTCTT GGTTCGCTT ATATCGGCA CATGCGGAT GGGGAGATC GGCCTCTDC TAGCCATAG 480
CGCTATATA ATCTAACAT GGGCCATCG TCACTCCCG CAGCCCTAC CTGGATCTG TAGCCATAGC CTGGTTATD
481 CTTCGGCTC ATGAGCTTT GTTTCGCTT GGTTCGCTT ATATCGGCA CATGCGGAT GGGGAGATC GGCCTCTDC 560
CGCTATATA ATCTAACAT GGGCCATCG TCACTCCCG CAGCCCTAC CTGGATCTG TAGCCATAGC CTGGTTATD
561 TGCATGCAC ATTCTTCGG GGGGCTGTC TCAAGGCTT CAGCTACTA CTGGGCTCT TCTTAATGA GAGTTCGCT 640
CGCTATATA ATCTAACAT GGGCCATCG TCACTCCCG CAGCCCTAC CTGGATCTG TAGCCATAGC CTGGTTATD
641 AAGGGAGAG GTGACCAAT GCGTTGAGG GCGTTCAAC CAGTCACTC CTTCGGTTC GCGGCGGGA TGCATGCT 720
CGCTATATA ATCTAACAT GGGCCATCG TCACTCCCG CAGCCCTAC CTGGATCTG TAGCCATAGC CTGGTTATD
721 CCGCAGCTT ATGACTGTT TCTTATCAT GGAAGCTGTA GAGCAGTGC CCGCAGCTC CTGGGCTCT TCTTAATGA 800
CGCTATATA ATCTAACAT GGGCCATCG TCACTCCCG CAGCCCTAC CTGGATCTG TAGCCATAGC CTGGTTATD
801 ACCGCTTTC CTGGAGGCG AGGATATCG GCGTTTCCT TGGGTAATC GGAATCTTC ACCGCTTTC TCAAGCTTC 880
CGCTATATA ATCTAACAT GGGCCATCG TCACTCCCG CAGCCCTAC CTGGATCTG TAGCCATAGC CTGGTTATD

```

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 Targeting Range
 Between F1c-B1c

2. Generate
Generate (1000 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: 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 CCGGTACTGC CCGGCTCTTT GCGGGATAAT GTCCATTCCG ACAGCATCGC CAGTCACTAT GCGCTGCTGC TAGGCTIATA 240
 241 TGGGTGATG CAATTTCTAT GCGCACCOST TCTGGAGACA CTGTCCGACC GCCTTGGCCG CCGCCDAGTC CTGCTDGCCT 320
 321 CGTACTTGG AGCCACTATC GACTACGCGA TCATGGCGAC CACACCGGTC CTGTGGATCC TCTAGCGCGG ACGCATCGTG 400
 401 GCGGCAACA CCGGCGCCAC AGGTGGGTT GCTGGGCGCT ATATGGCCGA CATCACGAT GGGGAGATC GGGCTDGCCT 480
 481 CTTCGGGCTC ATGACGCTTT GTTTCGGCT GGTATGTTG GCGCGCGCGG ACTGTTGGGC GCCATCTCCT 560
 561 TGCATGACC ATTCCTTGG GCGGCGGTTG TCAACGGCT CAACTACTA CTGGGCTGCT TCCTAATGCA GGAGTGGCAT 640
 641 AAGGAGAGC GTGACGCAAT GCCCTTGAAG GCCTTGAAC CAGTCAGCTC CTTCGGTGG GCGCGGCGCA TGAATATGCT 720
 721 GCGCCACTT ATGACGCTCT TCCTTATCAT GCAACTGTA GGACGGTGC CCGCAGCGCT CTGGGCTCAT TTGGGCGAGG 800
 801 ACCGCTTTC CTGGAGCGCG ACATGATCG GCCTGCTGCT TGGGTAATC GGAATCTGC ACCGCTTGC TCAAGCCCTC 880

Number of primer candidates: 1128
 1000 Primer set(s) were generated. F2=242, F3=593, B1=253, B2=213, B3=668, F1P=318, B1P=266

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 CACAGTTAAATTGCTAACGGAGTCAGGCACCGTGTATGAAATCTAACAAATGCGCTCATCGTCATCCTCGGCACCGTCACCCT
 (Complement) gtgtcaatttaacgattgcgtcagtcocgtgacacatactttagattgtttacgcgagtagcagtaggagccgtggcagtgagg
 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	TGCTAACGCAGTCAGGCA	AATGCGCTCATCGTCATCC
[2]	-2.01	TGCTAACGCAGTCAGGCA	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

Primer ID	dG(dimer)	Sequence	Position
[39]		caagsgtctctcttaggctgccaacaatsagcsaete	
[40]		caagsgtctctcttaggctgccaacaatsagcsaete	
[41]		actactttcgaocgatgctc	
[42]		actactttcgaocgatgctc	
[43]		actactttcgaocgatgctc	
[44]		actactttcgaocgatgctc	
[45]		aactaccgcaaggataaaca	
[46]		aactaccgcaaggataaaca	
[47]		aactaccgcaaggataaaca	
[48]		aactaccgcaaggataaaca	
[49]		aactaccgcaaggataaaca	
[50]		aactaccgcaaggataaaca	
[51]		aactaccgcaaggataaaca	
[52]		aactaccgcaaggataaaca	
[53]		aactaccgcaaggataaaca	
[54]		aactaccgcaaggataaaca	
[55]		aactaccgcaaggataaaca	
[56]		aactaccgcaaggataaaca	
[57]		aactaccgcaaggataaaca	
[58]		aactaccgcaaggataaaca	
[59]		aactaccgcaaggataaaca	

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 01		Header																																																																															
1. 2019年度決算		2019年度決算																																																																															
2. 2020年度決算		2020年度決算																																																																															
3. 2021年度決算		2021年度決算																																																																															
4. 2022年度決算		2022年度決算																																																																															
5. 2023年度決算		2023年度決算																																																																															
6. 2024年度決算		2024年度決算																																																																															
7. 2025年度決算		2025年度決算																																																																															
8. 2026年度決算		2026年度決算																																																																															
9. 2027年度決算		2027年度決算																																																																															
10. 2028年度決算		2028年度決算																																																																															
11. 2029年度決算		2029年度決算																																																																															
12. 2030年度決算		2030年度決算																																																																															
13. 2031年度決算		2031年度決算																																																																															
14. 2032年度決算		2032年度決算																																																																															
15. 2033年度決算		2033年度決算																																																																															
16. 2034年度決算		2034年度決算																																																																															
17. 2035年度決算		2035年度決算																																																																															
18. 2036年度決算		2036年度決算																																																																															
19. 2037年度決算		2037年度決算																																																																															
20. 2038年度決算		2038年度決算																																																																															
21. 2039年度決算		2039年度決算																																																																															
22. 2040年度決算		2040年度決算																																																																															
23. 2041年度決算		2041年度決算																																																																															
24. 2042年度決算		2042年度決算																																																																															
25. 2043年度決算		2043年度決算																																																																															
26. 2044年度決算		2044年度決算																																																																															
27. 2045年度決算		2045年度決算																																																																															
28. 2046年度決算		2046年度決算																																																																															
29. 2047年度決算		2047年度決算																																																																															
30. 2048年度決算		2048年度決算																																																																															
31. 2049年度決算		2049年度決算																																																																															
32. 2050年度決算		2050年度決算																																																																															
33. 2051年度決算		2051年度決算																																																																															
34. 2052年度決算		2052年度決算																																																																															
35. 2053年度決算		2053年度決算																																																																															
36. 2054年度決算		2054年度決算																																																																															
37. 2055年度決算		2055年度決算																																																																															
38. 2056年度決算		2056年度決算																																																																															
39. 2057年度決算		2057年度決算																																																																															
40. 2058年度決算		2058年度決算																																																																															
41. 2059年度決算		2059年度決算																																																																															
42. 2060年度決算		2060年度決算																																																																															
43. 2061年度決算		2061年度決算																																																																															
44. 2062年度決算		2062年度決算																																																																															
45. 2063年度決算		2063年度決算																																																																															
46. 2064年度決算		2064年度決算																																																																															
47. 2065年度決算		2065年度決算																																																																															
48. 2066年度決算		2066年度決算																																																																															
49. 2067年度決算		2067年度決算																																																																															
50. 2068年度決算		2068年度決算																																																																															
51. 2069年度決算		2069年度決算																																																																															
52. 2070年度決算		2070年度決算																																																																															
53. 2071年度決算		2071年度決算																																																																															
54. 2072年度決算		2072年度決算																																																																															
55. 2073年度決算		2073年度決算																																																																															
56. 2074年度決算		2074年度決算																																																																															
57. 2075年度決算		2075年度決算																																																																															
58. 2076年度決算		2076年度決算																																																																															
59. 2077年度決算		2077年度決算																																																																															
60. 2078年度決算		2078年度決算																																																																															
61. 2079年度決算		2079年度決算																																																																															
62. 2080年度決算		2080年度決算																																																																															
63. 2081年度決算		2081年度決算																																																																															
64. 2082年度決算		2082年度決算																																																																															
65. 2083年度決算		2083年度決算																																																																															
66. 2084年度決算		2084年度決算																																																																															
67. 2085年度決算		2085年度決算																																																																															
68. 2086年度決算		2086年度決算																																																																															
69. 2087年度決算		2087年度決算																																																																															
70. 2088年度決算		2088年度決算																																																																															
71. 2089年度決算		2089年度決算																																																																															
72. 2090年度決算		2090年度決算																																																																															
73. 2091年度決算		2091年度決算																																																																															
74. 2092年度決算		2092年度決算																																																																															
75. 2093年度決算		2093年度決算																																																																															
76. 2094年度決算		2094年度決算																																																																															
77. 2095年度決算		2095年度決算																																																																															
78. 2096年度決算		2096年度決算																																																																															
79. 2097年度決算		2097年度決算																																																																															
80. 2098年度決算		2098年度決算																																																																															
81. 2099年度決算		2099年度決算																																																																															
82. 2100年度決算		2100年度決算																																																																															
2019	2020	2021	2022	2023	2024	2025	2026	2027	2028	2029	2030	2031	2032	2033	2034	2035	2036	2037	2038	2039	2040	2041	2042	2043	2044	2045	2046	2047	2048	2049	2050	2051	2052	2053	2054	2055	2056	2057	2058	2059	2060	2061	2062	2063	2064	2065	2066	2067	2068	2069	2070	2071	2072	2073	2074	2075	2076	2077	2078	2079	2080	2081	2082	2083	2084	2085	2086	2087	2088	2089	2090	2091	2092	2093	2094	2095	2096	2097	2098	2099	2100

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 shows a software interface for primer analysis. It displays two primer sets, ID:1 and ID:2, with their respective parameters and sequences. Callouts point to specific fields: Tm value, primer length, 3' and 5' positions, ID number, 5' and 3' terminal stability, GC content, and sequence.

ID	label	5'pos	3'pos	len	Tm	5'dG	3'dG	GCrate	Sequence
1	F3	62	79	18	60.91	-4.49	-6.25	0.56	TGCTAACGCGAGTCAGGCA
	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
2	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
	F3	62	79	18	60.91	-4.49	-6.25	0.56	TGCTAACGCGAGTCAGGCA
	B3	250	268	19	59.11	-6.85	-4.56	0.53	GGGTGCGCATAGAAATTGC
	F1P		40						GCAGTACCGGCATAACCAAGCC-ATGCGCTCATCGTCATCC
	B1P		39						GCCTCTTGCGGGATATCGTCC-GCTAGCAGCACGCCATAG
2	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
	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

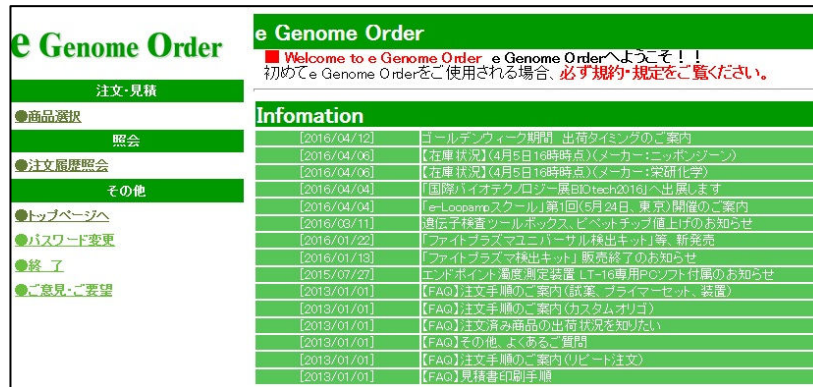


図 1.13 ログイン画面 (ログイン後、発注画面が表示されます)

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)

The screenshot shows the 'Basic Designing' step in the PrimerExplorer V5 software. The interface includes a 'Design Option' section with 'Default' selected. A message states: 'Number of Primer Candidates: F1=292, F2=348, F3=429, B1=318, B2=316, B3=395, FIP=652, BIP=593. 1000 Primer set(s) were generated.' The '1. Select Range' section has 'Ignore range' selected. The '2. Generate' section has a 'Generate' button and '1000 sets were generated.' The '3. Display' section has a 'Display' button and 'Page 2' selected. A message says: 'If you can move to "Basic Designing", please click below.' Below this is a 'Basic Designing' button. The 'Parameter Condition' section has 'AT rich' selected in a dropdown menu. The 'Parameter Condition' table is highlighted with a red box:

Parameter	Condition	F1c/B1c	F2/B2	F3/B3
Length	F1c/B1c	20	25	25
	F2/B2	18	25	25
	F3/B3	18	25	25
Tm	F1c/B1c	60	63	63
	F2/B2	55	58	58
	F3/B3	55	58	58

Annotations on the screenshot include:

- 'Generate'ボタンをクリックする (Click the 'Generate' button)
- 'Parameter Set' は「AT rich」が選択されている (The 'Parameter Set' is 'AT rich')
- 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 (The primer length is set long and the Tm value is set low)

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]	CCTTTCAGCTCGCGCCCC	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]

「Save Parameters」ボタンをクリックする

Length、Tm 値、GC rate (%)の赤枠

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)

設計条件を保存する

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

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。

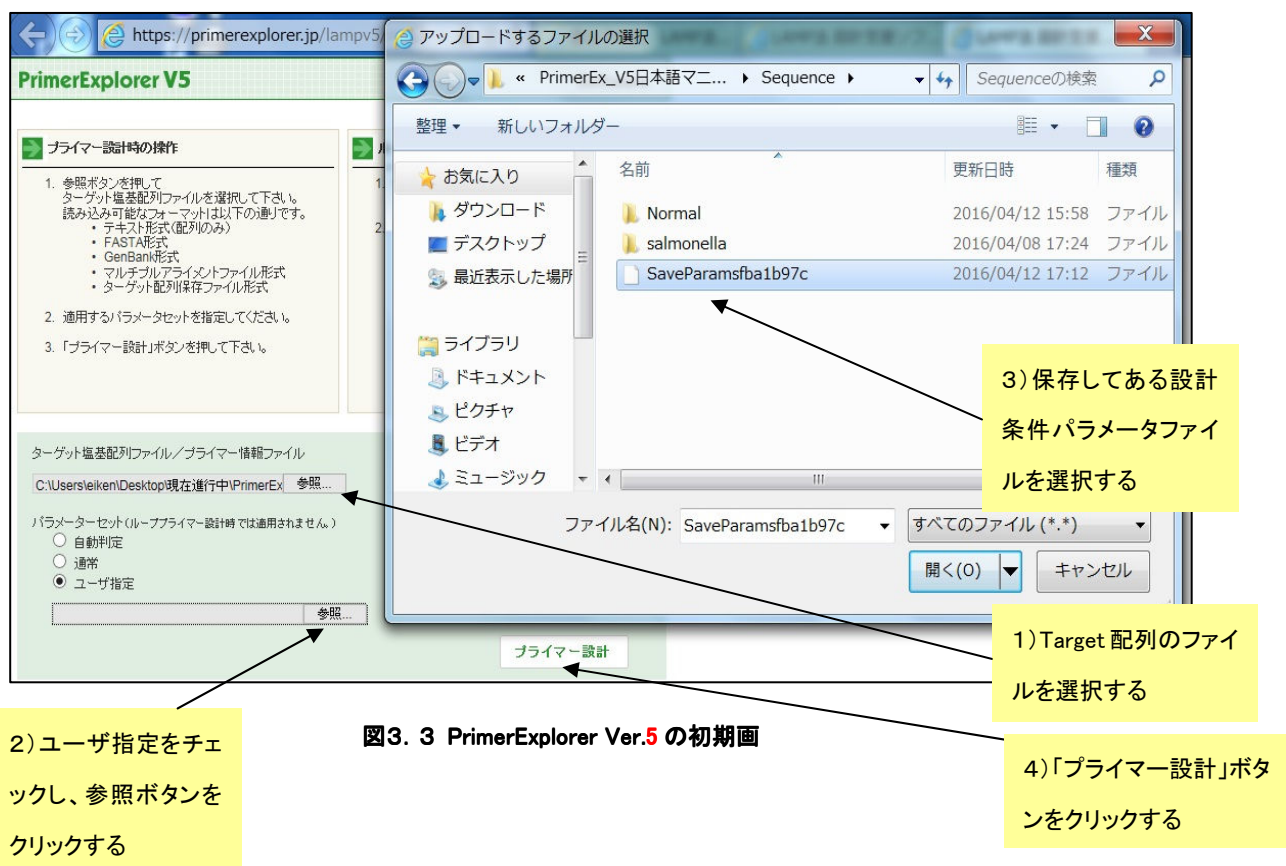


図3. 3 PrimerExplorer Ver.5 の初期画面

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

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)	agttgccggagttgatgatgaccgcagcaaggattacgtcctcagcgatttcctctctgcagctggctacgggaa
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)

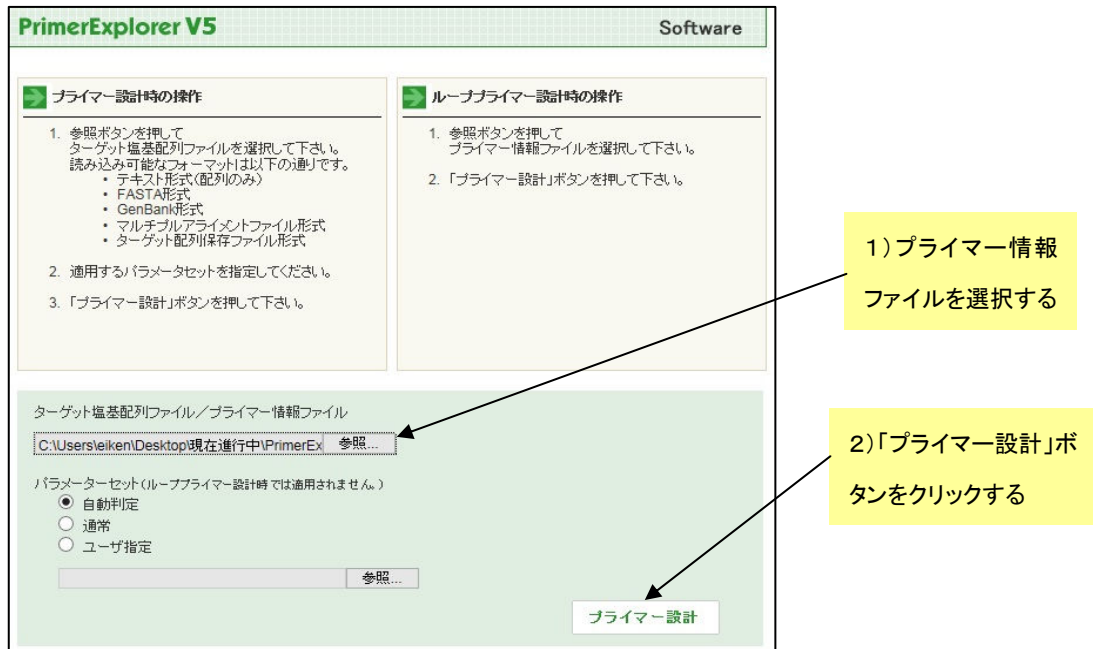


図 5.1 PrimerExplorer の初期画面

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。

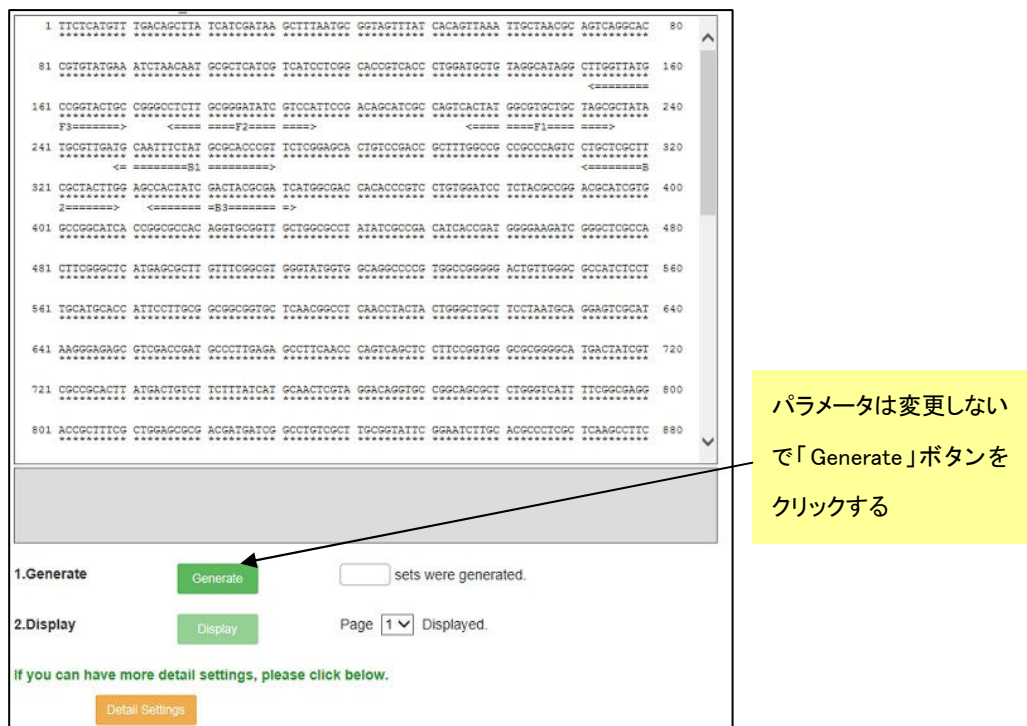


図 5.2 ループプライマー設計画面

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

Primer ID	dimer	Position	Sequence
[1]	-2.95	141	ggctgtcgtagcgggtca
[1]		191	TCGGAGCACTGTCCGAC

Forward 側のループプライマー

Backward 側のループプライマー

図5.3 ループプライマー設計画面(設計後)

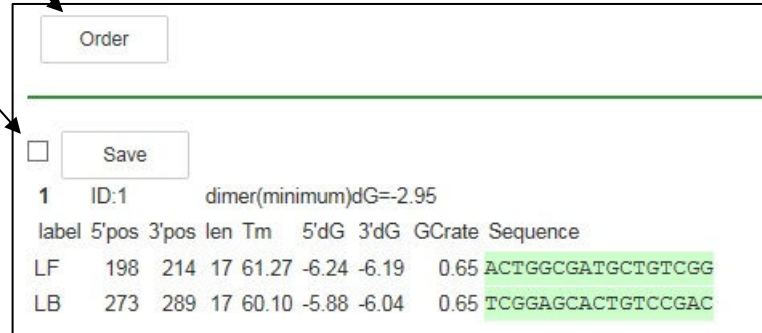
図5.3に結果が一覧表示されています。一番上に保存しておいたプライマー情報の領域が示され、その下にTarget 配列、一番下にループプライマーが表示されています。さらに、ループプライマーセットの詳しい情報を見るために、プライマーセットの左端にあるボックスをチェックしてから「Confirm」ボタンをクリックし、プライマー詳細表示画面を開きます。

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 is a 'Save' button with an unchecked checkbox. A table displays primer set information for 'ID:1' with a dimer minimum dG of -2.95. The table has columns for label, 5'pos, 3'pos, len, 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。

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	TGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCT	180
M13_3M1.nuc	121:	AAGAGT	CCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAC	TGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCT	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:	ACACCAACGTAACCTATCCCATTACGGTCAATCCGCGTTTGT	TCCCACGGAGAATCCGA		360
M13_3M1.nuc	301:	ACACCAACGTAACCTATCCCATTACGGTCAATCCGCGTTTGT	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) cgtccgtacgttogaacogtgaocggagcaaatgttgcagcactgacccttggaccocaaatggatgaaatggaaactcgtctgtagggaaagcggtgacccgattatcgcttctccggctggctacgssaaase
 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] ATCGCTTGCAGCACATC CCAGCTGGCGTAATAGCG
 [22] -2.37 [22] ATCGCTTGCAGCACATC CAGCACATCCCCCTTTC CAGCTGGCGTAATAGCGAA
 [23] -2.46 [23] ATCGCTTGCAGCACATC AGCTGGCGTAATAGCGAAGA
 [24] -2.46 [24] ATCGCTTGCAGCACATC GCTGGCGTAATAGCGAAGA
 [25] -2.37 [25] ATCGCTTGCAGCACATC GCTGGCGTAATAGCGAAGA

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

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

Target DNA GCAGGCATGCAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTCAACCTCGTGACTGGGAAACCCCTGGGTTACCCAACTTAATCGCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCC
 (Complement) cgtccgtacgttogaacogtgaocggagcaaatgttgcagcactgacccttggaccocaaatggatgaaatggaaactcgtctgtagggaaagcggtgacccgattatcgcttctccggctggctacgssaaase
 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) cgtccgtacgttogaacogtgaocggagcaaatgttgcagcactgacccttggaccocaaatggatgaaatggaaactcgtctgtagggaaagcggtgacccgattatcgcttctccggctggctacgssaaase
 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

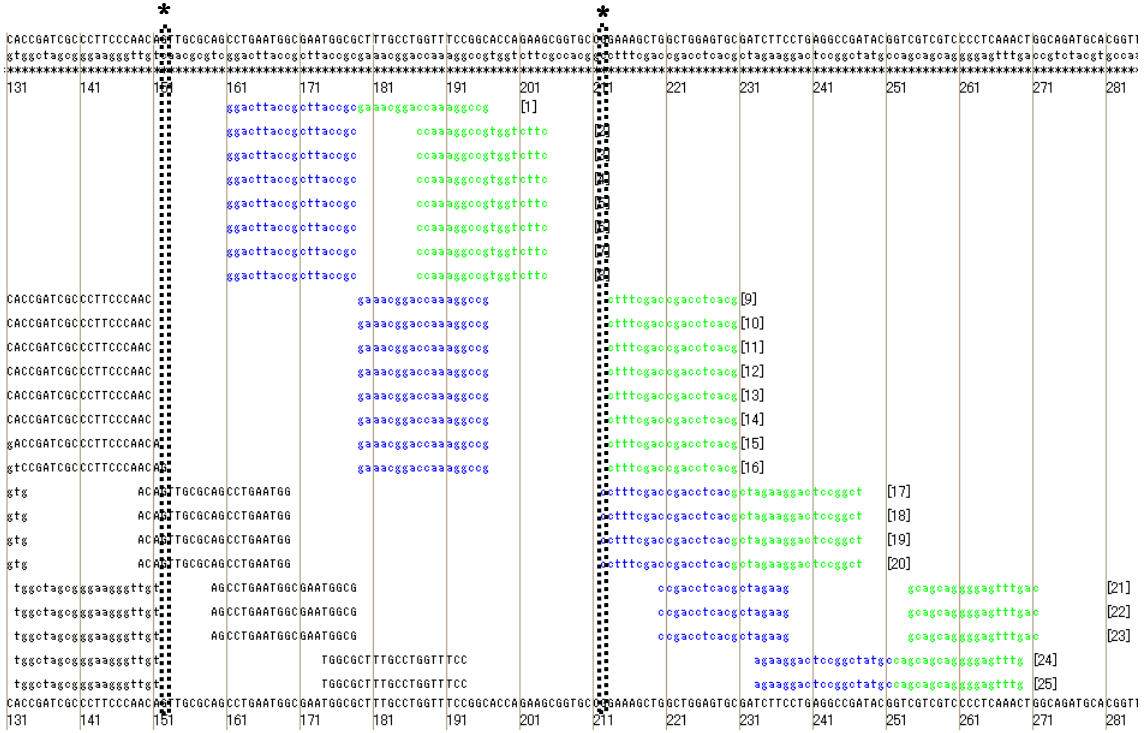


図 6.2 続き

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			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
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

2) 「Mutation」ボタンをクリックする

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

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

「Generate」ボタンをクリックする

ここではこの変異情報を用いる

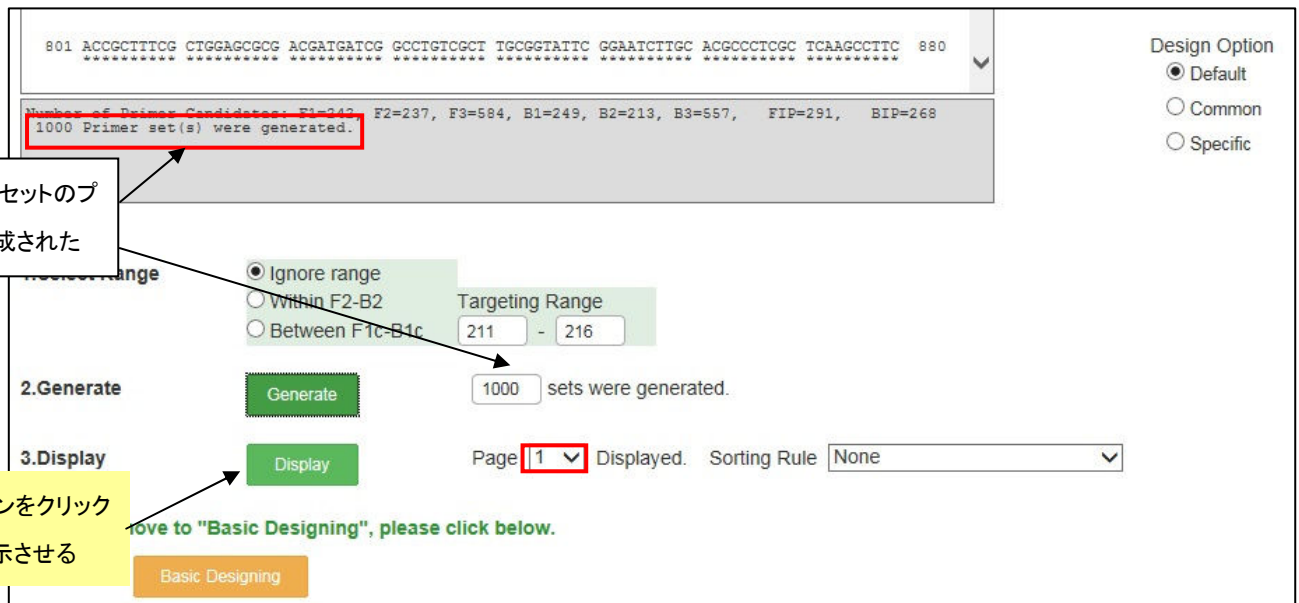


図 7. 4 設計後の画面

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	gtgtcaatttaacgatttgcgtcagtcogtggcacataacttagattgttacgcgagtagcagtaggagccgtggcagtggggaacctacgaacatccgataccgaaccaatacggccatgacgcccggagaa
[2] -2.01 [2]	TGCTAACGCACTCAGGCA	ATGCGCTCATCGTCATCC	gtgtcaatttaacgatttgcgtcagtcogtggcacataacttagattgttacgcgagtagcagtaggagccgtggcagtggggaacctacgaacatccgataccgaaccaatacggccatgacgcccggagaa
[3] -2.46		GCGCTCATCGTCATCC	gtgtcaatttaacgatttgcgtcagtcogtggcacataacttagattgttacgcgagtagcagtaggagccgtggcagtggggaacctacgaacatccgataccgaaccaatacggccatgacgcccggagaa
[4] -2.46		GCGCTCATCGTCATCC	gtgtcaatttaacgatttgcgtcagtcogtggcacataacttagattgttacgcgagtagcagtaggagccgtggcagtggggaacctacgaacatccgataccgaaccaatacggccatgacgcccggagaa
[5] -2.46		GCGCTCATCGTCATCC	gtgtcaatttaacgatttgcgtcagtcogtggcacataacttagattgttacgcgagtagcagtaggagccgtggcagtggggaacctacgaacatccgataccgaaccaatacggccatgacgcccggagaa
[6] -1.82			gtgtcaatttaacgatttgcgtcagtcogtggcacataacttagattgttacgcgagtagcagtaggagccgtggcagtggggaacctacgaacatccgataccgaaccaatacggccatgacgcccggagaa
[7] -1.82			gtgtcaatttaacgatttgcgtcagtcogtggcacataacttagattgttacgcgagtagcagtaggagccgtggcagtggggaacctacgaacatccgataccgaaccaatacggccatgacgcccggagaa
[8] -1.82			gtgtcaatttaacgatttgcgtcagtcogtggcacataacttagattgttacgcgagtagcagtaggagccgtggcagtggggaacctacgaacatccgataccgaaccaatacggccatgacgcccggagaa
[9] -2.06			gtgtcaatttaacgatttgcgtcagtcogtggcacataacttagattgttacgcgagtagcagtaggagccgtggcagtggggaacctacgaacatccgataccgaaccaatacggccatgacgcccggagaa
[10] -1.93			gtgtcaatttaacgatttgcgtcagtcogtggcacataacttagattgttacgcgagtagcagtaggagccgtggcagtggggaacctacgaacatccgataccgaaccaatacggccatgacgcccggagaa
[11] -1.97			gtgtcaatttaacgatttgcgtcagtcogtggcacataacttagattgttacgcgagtagcagtaggagccgtggcagtggggaacctacgaacatccgataccgaaccaatacggccatgacgcccggagaa
[12] -1.97			gtgtcaatttaacgatttgcgtcagtcogtggcacataacttagattgttacgcgagtagcagtaggagccgtggcagtggggaacctacgaacatccgataccgaaccaatacggccatgacgcccggagaa
[13] -1.97			gtgtcaatttaacgatttgcgtcagtcogtggcacataacttagattgttacgcgagtagcagtaggagccgtggcagtggggaacctacgaacatccgataccgaaccaatacggccatgacgcccggagaa
[14] -1.93			gtgtcaatttaacgatttgcgtcagtcogtggcacataacttagattgttacgcgagtagcagtaggagccgtggcagtggggaacctacgaacatccgataccgaaccaatacggccatgacgcccggagaa
[15] -2.36			gtgtcaatttaacgatttgcgtcagtcogtggcacataacttagattgttacgcgagtagcagtaggagccgtggcagtggggaacctacgaacatccgataccgaaccaatacggccatgacgcccggagaa
[16] -2.15			gtgtcaatttaacgatttgcgtcagtcogtggcacataacttagattgttacgcgagtagcagtaggagccgtggcagtggggaacctacgaacatccgataccgaaccaatacggccatgacgcccggagaa
[17] -2.01			gtgtcaatttaacgatttgcgtcagtcogtggcacataacttagattgttacgcgagtagcagtaggagccgtggcagtggggaacctacgaacatccgataccgaaccaatacggccatgacgcccggagaa
[18] -2.36			gtgtcaatttaacgatttgcgtcagtcogtggcacataacttagattgttacgcgagtagcagtaggagccgtggcagtggggaacctacgaacatccgataccgaaccaatacggccatgacgcccggagaa
[19] -2.46			gtgtcaatttaacgatttgcgtcagtcogtggcacataacttagattgttacgcgagtagcagtaggagccgtggcagtggggaacctacgaacatccgataccgaaccaatacggccatgacgcccggagaa
[20] -2.15			gtgtcaatttaacgatttgcgtcagtcogtggcacataacttagattgttacgcgagtagcagtaggagccgtggcagtggggaacctacgaacatccgataccgaaccaatacggccatgacgcccggagaa

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

Primer set: sorting rule [None]		Target DNA																			
(Complement)		gtgtcaatttaacgattgctgagtcggtgcaacatacttagattgttacggagtagcagtaggagcgtggcagtgggacctacgcacatccgtatccgaaaccaataaggccatgacggccggagaaagcccoctatagcaggttaaggctgtgtgtagcgtcagtgata																			
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					cggagaaagcccoctatagcagg						CTAT	
<input type="checkbox"/> [4]	-2.46					[4]	GCGTCATCGTCATCCCTC		CCCTGGATGCTGTAGGCA					cggagaaagcccoctatagcagg						CTAT	
<input type="checkbox"/> [5]	-2.46					[5]	GCGTCATCGTCATCCCTC		CTGGATGCTGTAGGCATAGG					cggagaaagcccoctatagcagg						CTAT	
<input type="checkbox"/> [6]	-2.23							[6]	ACCCCTGGATGCTGTAGGC		GCTTGGTATGCCGGTACTG									ggctgtgttagcgggtcagtgTAT	
<input type="checkbox"/> [7]	-2.49								[7]	CTGGATGCTGTAGGCATAGG		CTTGGTATGCCGGTACTGC								ggctgtgttagcgggtcagtgTAT	
<input type="checkbox"/> [8]	-2.49								[8]	GGATGCTGTAGGCATAGG		CTTGGTATGCCGGTACTGC								ggctgtgttagcgggtcagtgTAT	
<input type="checkbox"/> [9]	-2.16							[9]	ACCCCTGGATGCTGTAGGC		GGTATGCCGGTACTGCC									ggctgtgttagcgggtcagtgTAT	
<input type="checkbox"/> [10]	-1.82										[10]	TTGGTATGCCGGTACTGC		CTCTTTGCGGGATATCGTCCA						tgata	
<input type="checkbox"/> [11]	-1.82										[11]	TTGGTATGCCGGTACTGC		TCTTTGCGGGATATCGTCCA						a	
<input type="checkbox"/> [12]	-1.82										[12]	TTGGTATGCCGGTACTGC		TCTTTGCGGGATATCGTCCA						a	
<input type="checkbox"/> [13]	-2.16													[13]	GCGGGATATCGTCCATCCGACAGCATCGCCAGTAC						
<input type="checkbox"/> [14]	-2.33													[14]	GGGATATCGTCCATCCGAC	GCATCGCCAGTCACTAT					
<input type="checkbox"/> [15]	-2.16													[15]	TTGTCCATTCCGACAGCA	CAGTCACTAT					
<input type="checkbox"/> [16]	-2.33													[16]	GGGATATCGTCCATCCGAC	CAGTCACTAT					
<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

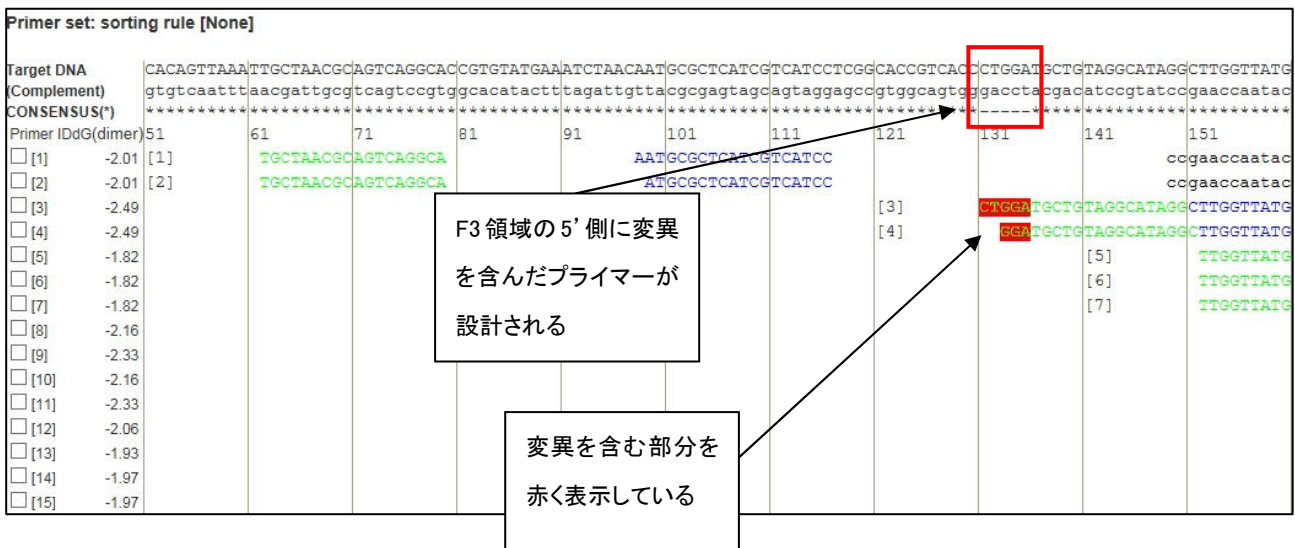
Peculiarity	Permission	
	F1c/B1c	F2/B2
high level		
↑	F1c 5'term	B1c 5'term
	F2 3'term	B2 3'term
	F3 3'term	B3 3'term
	F1c inner	B1c inner
	F2 inner	B2 inner
	F3 inner	B3 inner
	F1c 3'term	B1c 3'term
	F2 5'term	B2 5'term
↓	F3 5'term	B3 5'term
low level		

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]	CTGCA		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      GTTGATATTTAAATCATGTTGAGCTAGACCAAGATTCAGCACGTAAGCTCTAAGCCA 200
          ** **** *
          **** *

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

SeqA      TTGAGTTTGCCTTCGGTCTGGTTTCGCTTTGAAGCTCGAATTAACACGCGATATTTGAG 360
SeqB      TTGAGTTTGCCTTCGGTCTGGTTTCGCTTTGAAGCTCGAATTAACACGCGATATTTGAG 340
SeqC      TCGGAGTTAGCTTCGGTCTGGTTTCGCTTTGAAGCTCGAATTAACACGCGATATTTGAG 320
          *
          **** *

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

SeqA      CAGGGTAAAGACCTGATTTTGTATTTATGGTCATTCTCGTTTTCTGAACTGTTAAAGCA 480
SeqB      CAGGGTAAAGACCTGATTTTGTATTTATGGTCATTCTCGTTTTCTGAACTGTTAAAGCA 460
SeqC      CACGGTAAAGACCTGATTTTGTATTTATGGTCATTCTCGTTTTCTGAACTGTTAAAGCA 440
          ** **** *
          **** *

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

図 8.1 マルチアライメント

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 **Generate** 5 sets were generated.

- 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

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 つの共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。

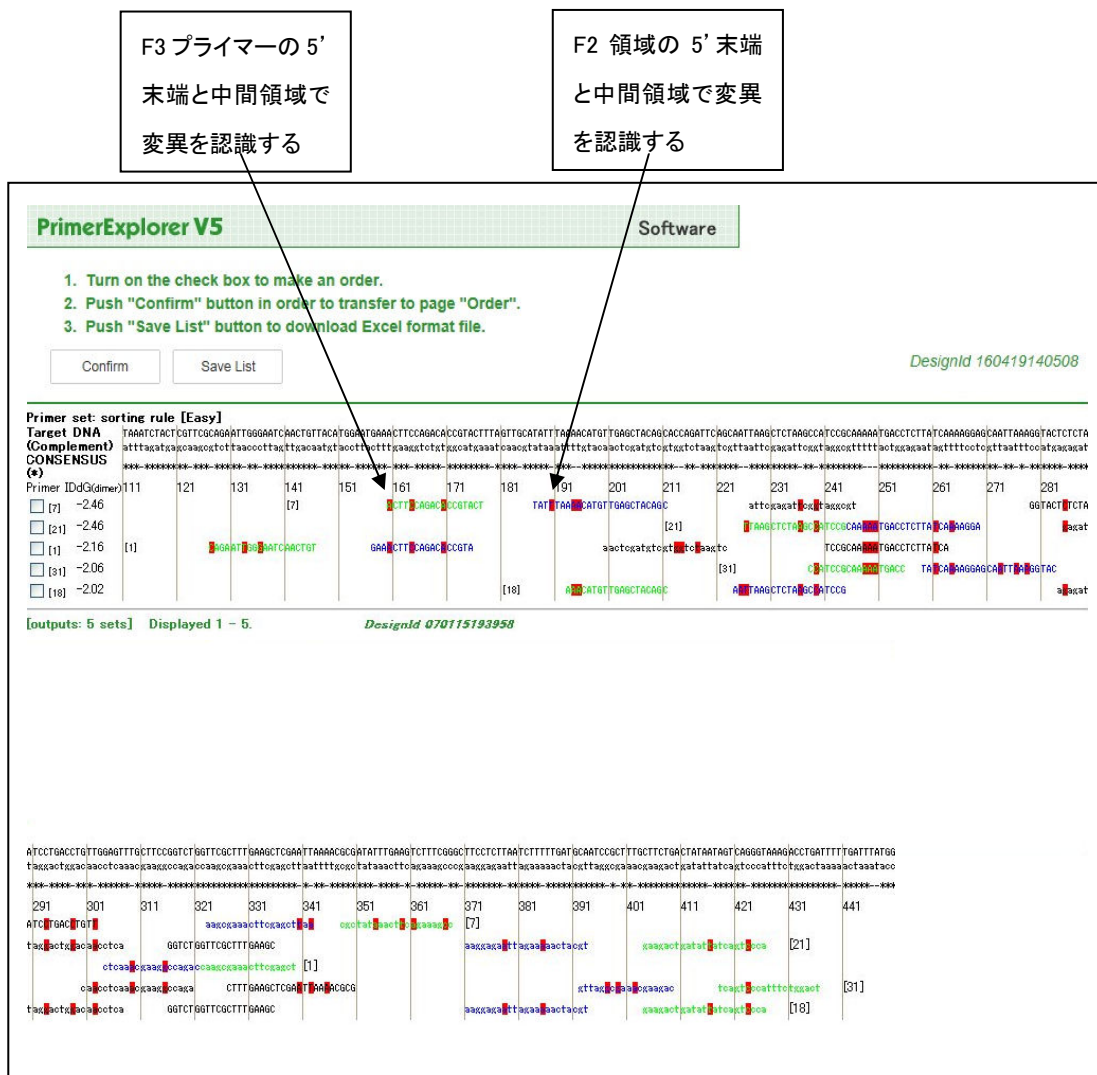


図 8.3 設計結果一覧画面

PrimerExplorer 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 TCGACCTCTTA 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

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。

Number of Primer Candidates: F1=292, F2=348, F3=429, B1=318, B2=316, B3=395, FIP=652, BIP=593
5 Primer set(s) were generated.

1.Generate **Generate** 5 sets were generated.

2) 「Generate」ボタンをクリックする

1) 「Specific」ボタンをクリックする

PrimerExplorer V4 Software

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

Confirm Save List DesignId: 070116123343 2437

Primer set: sorting rule [Easy]
Target DNA (Complement) CONSENSUS
Primer IDd3(amer) 101 111 121 131 141 151 161 171 181 191 201 211 221 231 241 251 261 271
[187] -2.46
[131] -1.62
[187] -2.16 [37]
[185] -2.05
[107] -2.18

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

図 9.2 設計結果一覧画面

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

PrimerExplorer 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
F1P		45						TGCGGAT GC TAGAGCTTA-TAT TAA CAIGTTGAGCTACAGC
B1P		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
F1P		45						GCGT TT A TCGAGCTTCAAAGC-C TCTAATC TGAC TGT G
B1P		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
F1P		46						FGCTGTAGCTCAACATG TTA A-GG AATCAACTGT ACATG A
B1P		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 AATGATGC ACCTTTTCAG CTCGGCCGC AAATGAAAT ATAGCTAAC AGTATATGA 90
81 CCAITTCGGA AATGTATCTA ATGGTCAAC TAAATCTACT CGTTCGCAGA 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 GTTTAAGCA 480
481 TTTCAGGGG ATTCA ..... 495
    
```

Number of Primer Candidates: F1=292, 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	B1c 5'term	F2 3'term	B2 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

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.

Confirm Save List DesignID 160419171519

Primer set sorting rule (None)

Target DNA
 (Complement)
 CGSENSISUS

Primer ID:G3dmer/11

Target DNA
 Primer ID:G3dmer/11

Target DNA
 Primer ID:G3dmer/11

Target DNA
 Primer ID:G3dmer/11

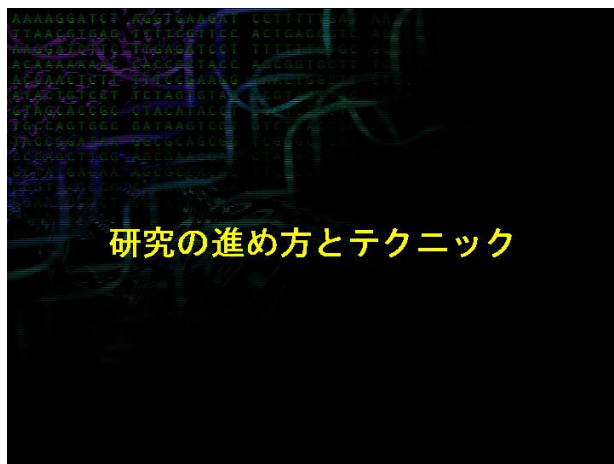
Target DNA
 Primer ID:G3dmer/11

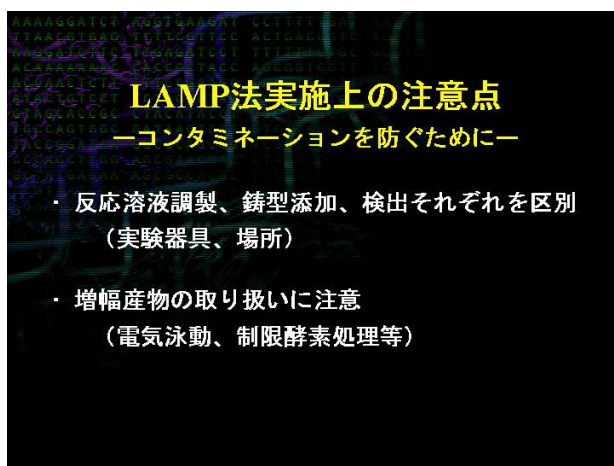
[Outputs 1000 sets] Displayed 1 - 100. DesignID 080216143229

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。

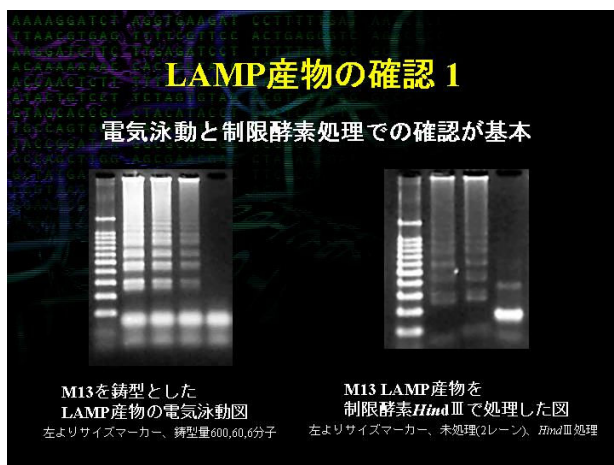
また、増幅産物の取り扱い時が最もコンタミネーションを起こしやすいので、電気泳動や制限酵素で目的の増幅産物を確認する際には十分に注意を払って下さい。



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。

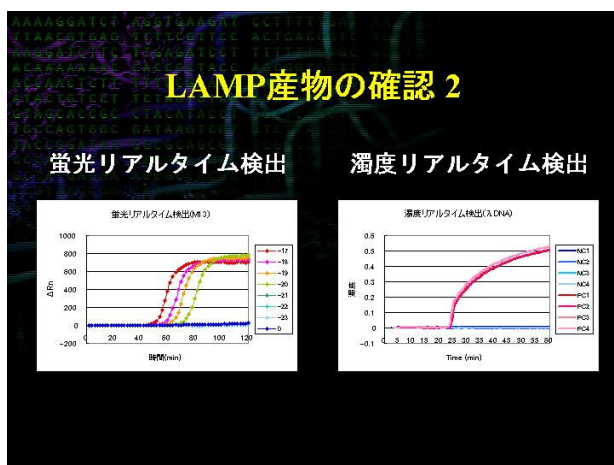
- ・ 酵素量、プライマー量 (特に Inner primer の量)
- ・ 反応温度 (63°Cを推奨していますが、60~65°Cで検討して下さい)
- ・ Inner primer の精製度 (はじめにプライマーセットをスクリーニングする際は OPC 精製で十分ですが、それ以後の検討では HPLC で精製されたものを使用して下さい)



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)
- 低濃度の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 については低濃度の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:

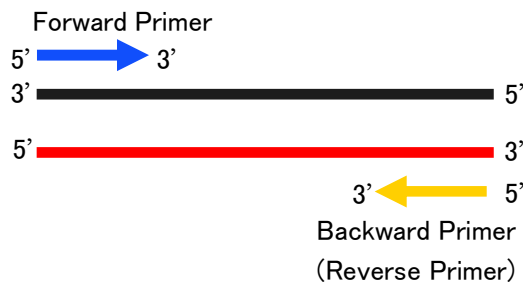
FASTA はデータベース検索により遺伝子やタンパク質の配列の類似性を調べることのできるコンピュータプログラムである。長い配列で類似性を保っているものを検索するのに適している。FASTA 形式は配列解析プログラムで最もよく使われる形式であり、以下のようなフォーマットである。

```
>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)
taaagaagtaagcctttatttccttgttttgca ← 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
taaagaagtaagcctttatttccttgttttgca
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。

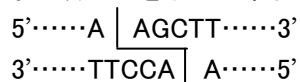
GenBank 形式:

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

HindIII:

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:

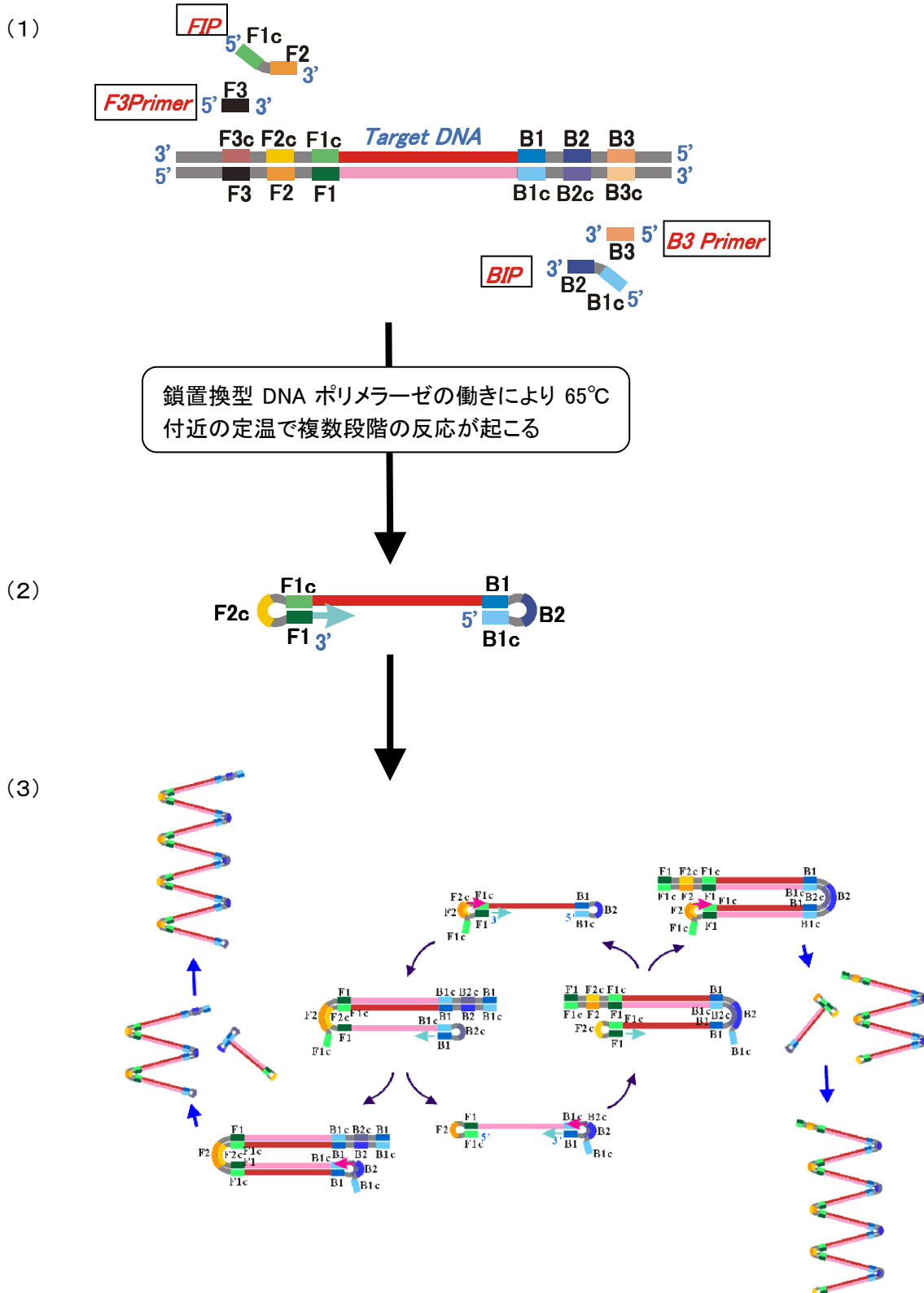
合成オリゴヌクレオチドの精製グレードの一つ。

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°C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、①2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⇒アニーリング⇒DNA合成というステップ無しに合成が進む②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。



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。

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

R: 気体定数 = 1.987 cal/°C/mol

ΔH: エンタルピー (kcal/mol)

ΔS: 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りで、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) DNA 2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。

T_m 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 T_m 値が高い。プライマーの結合能は一般的に T_m 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 基のみで存在する。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。

プレーンテキスト形式:

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 ttacaggcgg ggttttttctt gttgacaaga atcctcacia taccacagag
tctagactcg tgggtggactt ctctcaattt tctaggggga gcaccacacgt gtctctggccc
```

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 ΔG (自由エネルギー変化)を計算し、安定性を見ている。

