

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

HHH>í>ú>ü 2GeGwG2GIGŠGŠ

' WFp3úG F,>ø>í>ù>ü 2GeGwG2GIGŠF0;0EFy 4Ä4Bp
FÚG F,>ò>ß 8• æF,>ò>ß 8• æF,>ò>Ý 8• æF,>í>Ý 8• æF,>í>ß 8• æFøFÖ
FÖ >â FôFp8• æG" <#ÝFçFö (FçG FéF'>ì

ö •\$xFú >ø>í>ù>ü 2F=>ÿ 8@H >ô? ? ? >ì? ? ? ? ? >ì>ß ' 8@Fø >ú?!? ? ? >ì
? ? ? ? ? >ì>ß ' 8@H FpGeGwG2GIGŠG" QFÔG FéF'>ô? ? ? >ì? ? ? ? ? FyF,>ò>Ý? Fø >ò>PF,
>í>Ý? Fø >í>ß G"4) FçG FéF'>ì

FâG Fú >ò>Ý 8• æFø >ò>ß 8• æFp6ëFp8• æFú PFéG %&/ô6PFú >ò? ? #? ? ?

FpGyGŠGeGeGwG2GIGŠG"0; FçF,>í>Ý 8• æFø >í>ß 8• æFp6ëFp8• æFp

%&/ô6PFú >í? ? ? #? ? ? FpGyGŠGeGeGwG2GIGŠG"0; FçG FéF'

>ì

>ì

HHH>í>ú>ü 2GeGwG2GIGŠGŠ0;0EFpGkG2G•GVFyF,?? ÍF, >GeGwG2GIGŠ8• æFp Ž'f ó öF,>ó>âµFöF;FéS4Fp

>ø>í>ù>ü 2GeGwG2GIGŠ0;0EFpGkG2G•GVFyF,?? ÍF, >GeGwG2GIGŠ8• æFp Ž'f ó öF,>ó>âµFöF;FéS4Fp
>ì

HHH>í>ú>ü 2GeGwG2GIGŠGŠ0;0EFpGkG2G•GVFyF,?? ÍF, >GeGwG2GIGŠ8• æFp Ž'f ó öF,>ó>âµFöF;FéS4Fp

? ? Fp N'í Fy >ú? ? ? ? ? >ù>ú? ? ? ? ? 2FÜ ö •FúFúG G FéF'FâFp % 2Fy# ~ qG ÍFú3ÆFÔ3Æ Fp&0•G G FöFÔG F
? ? Í0£'i 9, 2 óFøFçFöFyF, 7 ð ØG G8GxGB ð ØFp s8jG" wFâG FéFÔFîG F, M 2 óF÷Fp'ì FÜ fG FçFÔFöFôG

G FéH G8GxGB ð ØG" >Ü>Ú>Ý @Û>ùF,GXGVGxG4GnG2G8G• ð ØG" >á>Û? >ùF,GIG>G[GEG4GnG2G8G• ð ØG" >à? >ùH F'>ì

FúFÚF, >8• æFp ? ÍFyF,>ò>Ý? FÚG G >í>Ý? 8• æF÷ >â>áb] S <H >â>âHZ>â>âB]H F,>ò>ß 8• æF,>í>ß >â>âB]ß 8• æF,>í>ß
S <H >â>âHZ>â>âB]H F,GyGŠGeGeGwG2GIGŠFy >â>áb] S <H >â>âHZ>â>âB]H FÜ0; FçG FéF'>ì

>ì

HHHÚ>ú>ü 2GeGwG2GIGŠ8• æFp Ž'f ó öFÜ0[ÓFâG G FéF'>ò>ß>Û>ì>ßF,>ò>ß>Û>ì>ßF,>ò>ß>Û>ì>ßF,>ò>ß>Û>ì>ßF,

>GeGwG2GIGŠ8• æFp Ž'f ó öFÜ0[ÓFâG G FéF'>ò>ß>Û>ì>ßF,>ò>ß>Û>ì>ßF,>ò>ß>Û>ì>ßF,>ò>ß>Û>ì>ßF,>ò>ß>Û>ì>ßF,
G >ò>Ý? >Û>ì>ßF? Fp >áAú Ž'fFp+-#âG6G[GyG<GŠFÜ? ? è WFúFúG G FÖFÜ0; FçG FéF'>ò>Ý? Fp >áAú Ž'fFy0 0 <Fú >
æFp>ßAú Ž'fFú%& \FéG FiG ó öFÜ5 0[FúFúG G FéF'H g!WHWF'>ì

FúFÚF,+~#âG6G[GyG<GŠFÜ0[ÓFâG G FéF'>ò>ß>Û>ì>ßF,>ò>ß>Û>ì>ßF,>ò>ß>Û>ì>ßF,>ò>ß>Û>ì>ßF,>ò>ß>Û>ì>ßF,
ÂFyF,+~#âG6G[GyG<H šÔCÓ>ó>ÖFyF,#Ö B"@Fp+-#âG6G[GyG<GŠFÜG o Â"@Fp+-#âG6G[GyG<GŠG" j ,FÔFiG FpF÷FéF
F÷FÔG FçFÜ `FâFâG G `FâFÔG FùG0GYGŠGxG•G> o ÁFÜ4 /œFçG FéH ' W W g!·H F'>ì

>ì

>ì

>ì

>ì

>ì

>ì

>ì

>ì

>ì

>ì

>ì

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

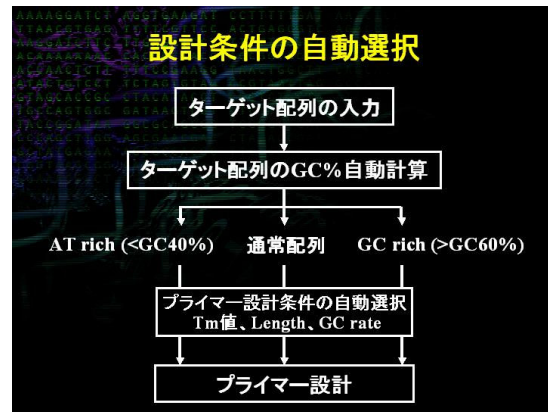
ユーザー自身がプライマー設計条件を入力してプライマーを設計します。デフォルトとして、通常配列(45%<GC<60%)を対象としたプライマー設計条件があらかじめ入力されています。ターゲット配列が AT rich(GC 含量<45%)または GC rich 配列(GC 含量>60%)の場合には、Tm 値、Length、GC 含量について以下の条件を設定してプライマーを設計します。

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

4.3 自動判定

自動判定の簡単な流れを右図に示します。

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



4.4 ターゲット領域全域にわたるプライマー設計

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

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。

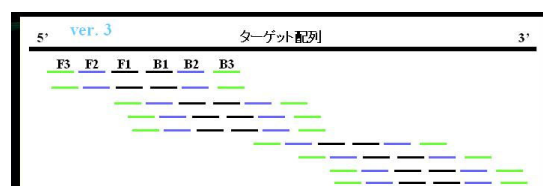
4.6 ループプライマーの設計

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)」

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！

4.11 プライマーセット設計結果画面の保存機能

プライマーの設計結果の一覧表を Excel 形式でファイルにダウンロードできます。ターゲット配列を基準として、設計したプライマーの位置が表示されます。

4.12 遺伝子配列情報の保存

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

4.13 設計条件の保存

設計条件の保存及び再読込が可能です。また、以前の配列情報を入力し、その時使用した設計条件の再読み込みをすることにより、迅速に以前のデータを提示できます。

4.14 末端のチェック

自動的に末端のチェックを行い、相補的な配列、特殊配列を含んだプライマーセットを自動的に排除します。相補的配列とはシメトリックな配列(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。