



# LAMP 法プライマー設計の手引き

## (PrimerExplorer V5)

栄研化学株式会社  
販売推進室

# 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(イージーモード)	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(イージーモード)	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(イージーモード)	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
<b>研究の進め方とテクニック</b>	
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
<b>用語集</b>	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

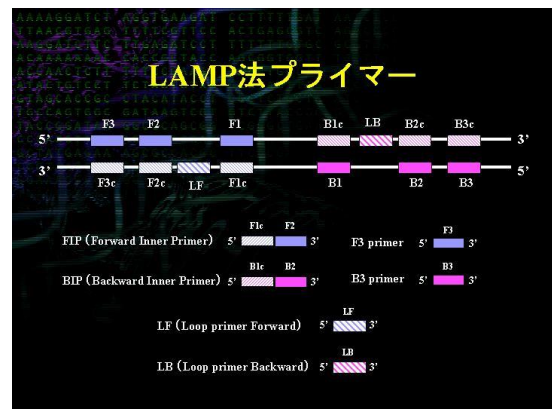
## PrimerExplorer V5 のご紹介

## 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。

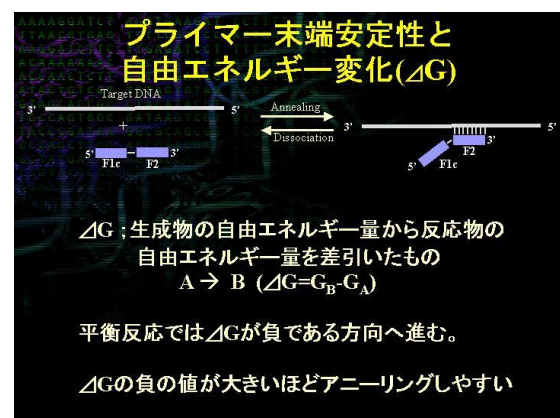
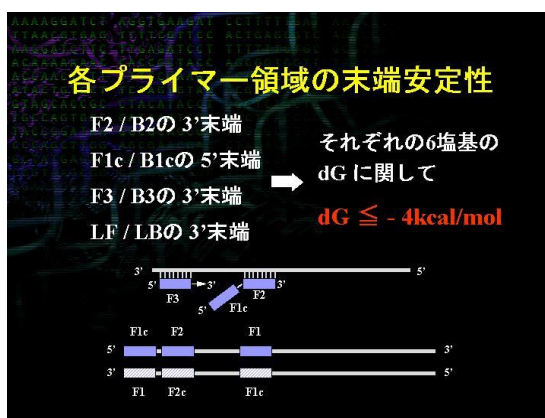
$T_m$  値計算実験条件としては、塩濃度やオリゴ濃度の影響を受けやすいため、一定条件での算出が望ましいとされています (オリゴ濃度を  $0.1 \mu\text{M}$ 、ナトリウムイオン濃度を  $50\text{mM}$ 、マグネシウムイオン濃度を  $4\text{mM}$ )。

なお、各領域の  $T_m$  値は、F1c および B1c 領域で  $65^\circ\text{C}$  前後 ( $64 \sim 66^\circ\text{C}$ )、F2 領域、B2 領域、F3 領域、B3 領域で  $60^\circ\text{C}$  前後 ( $59 \sim 61^\circ\text{C}$ )、ループプライマーは  $65^\circ\text{C}$  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  $-4\text{kcal/mol}$  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 ( $\Delta G$ ) 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 ( $\Delta G$ ) 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、 $\Delta G$  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

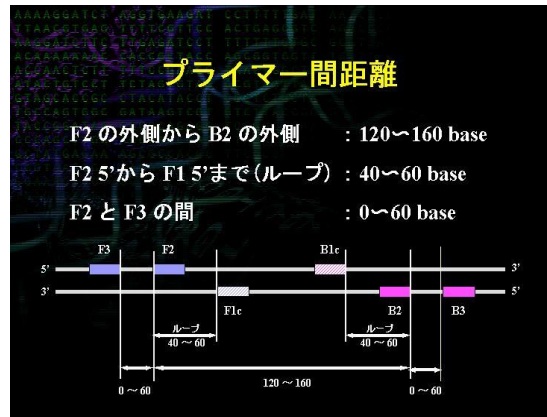
特に Inner primer に関しては、極端に二次構造をとらないように設計します。

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。

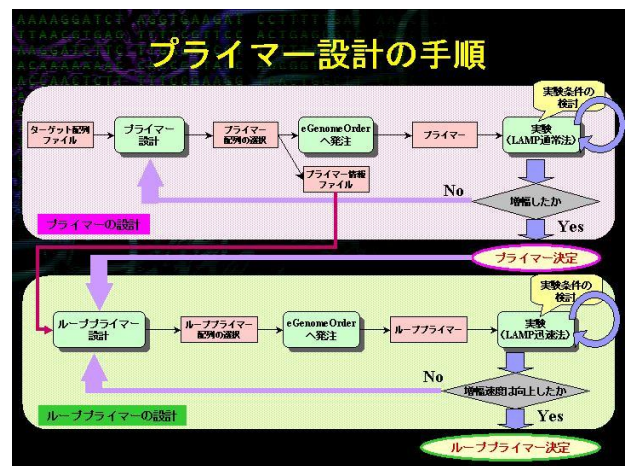
F2 領域の 5' 末端から F1 領域の 5' 末端まで(ループを形成する部分)は 40 から 60 base になるように設計します。F2 領域と F3 領域の間の距離は 0 から 60 base になるように設計します。



## 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、満足のいく結果が得られないならば再度設計をやり直します。

次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。もし満足のいく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必要不可欠なものではありません。



## 4. PrimerExplorer の機能

最新バージョンである Primer Explorer V5 と前バージョンである Primer Explorer V4 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

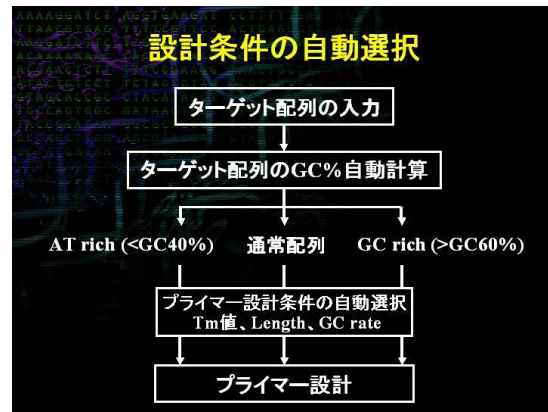
ユーザー自身がプライマー設計条件を入力してプライマーを設計します。デフォルトとして、通常配列(45%<GC<60%)を対象としたプライマー設計条件があらかじめ入力されています。ターゲット配列が AT rich(GC 含量<45%)または GC rich 配列(GC 含量>60%)の場合には、T<sub>m</sub> 値、Length、GC 含量について以下の条件を設定してプライマーを設計します。

	T <sub>m</sub> 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<sub>m</sub> 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 が組み合わせられます。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。

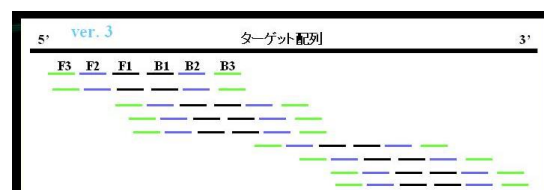
### 4.6 ループプライマーの設計

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に基づいて、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かられ、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入力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: AATGCTACTACTATTAGTAGAATTGATGCCACCTTTTCAGCTCGCGCCCAAAATGAAAAT 60
SeqB 1: -----AATGATGCCACCTTTTCAGCTTGGCTCCAAATGAACT 40
SeqC 1: -----CTCGGCCCACTTGAAAAT 20

SeqA 61: ATAGCTAAACAGGTTATTGACCAATTTGCAAAATGTATCTAATGGTCAAACTAAATCTACT 120
SeqB 61: ATAGCTAACAGCTTATTGACCAATTTGCAAAATGTATCTAATGTTCAAACTAAATCTACT 100
SeqC 61: ATGCTAAACAGGTTCTTGACCAATTTGCAAAATGTATCTAATGTTCAAACTAAATCTACT 80
```

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: AATGCTACTACTATTAGTAGAATTGATGCCACCTTTTCAGCTCGCGCCCAAAATGAAAAT 60
.....**-----**-----**-----**-----**
61: ATAGCTAAACAGGTTATTGACCAATTTGCAAAATGTATCTAATGGTCAAACTAAATCTACT 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

#### 4.11 プライマーセット設計結果画面の保存機能

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

#### 4.12 遺伝子配列情報の保存

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

#### 4.13 設計条件の保存

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

#### 4.14 末端のチェック

自動的に末端のチェックを行い、相補的な配列、特殊配列を含んだプライマーセットを自動的に排除します。相補的配列とはシンメトリックな配列(例えば CCCGGG や GAATTC)や、特殊配列(例えば、CCGGGG や AATTTT など同じ塩基を末端に含む配列)を意味し、プライマーダイマーの原因になるため、これらは設計の段階で排除されます。

また、ターゲット配列の相補性のチェックを行います。設計されたプライマー候補の末端とターゲット遺伝子配列を比較して、プライマー候補の末端配列が、ターゲット配列の増幅領域以外にも存在した場合、そのプライマーセットは排除されます。これにより非特異的な増幅を起こすプライマーセットが除かれます。

### 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

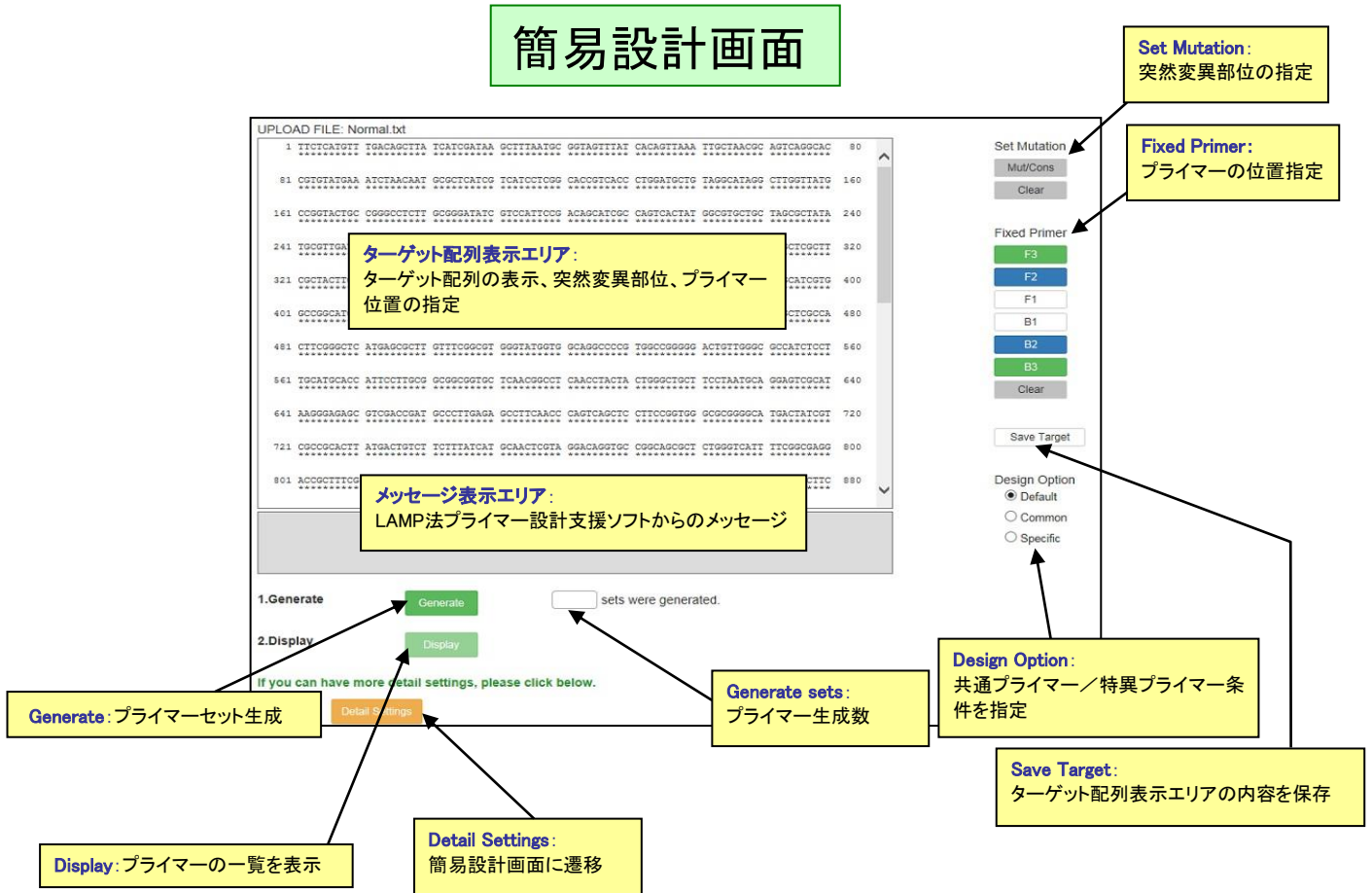
#### **4. 15 プライマーセット配列情報の保存機能**

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 Tm 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 TGGACGCTTA TCATCGATAA GCTTTAATGC GGTAGTITAT CACAGITAAA TTCTTAAGCC AGTCAGGCAC 80
61  GGTGTATGAA ATCTAACAAI GGCCTCATCG TCATCTCGSP GACGCTCAGC CTGSAIGCTG TAGGCATAGS CTTGCTTATD 160
161  CGGGTACTGC CGGGCCTGTT GCGGGATATC GTTCATCTCG ACACGATCGC CAGTCACIAT GCGCTGCTGC TAGCGCTATA 240
241  TCC
321  CCG
401  GCG
481  CTTCCGCTTC ATGAGCGCTI GTTTCGCGCT GGTATAGTGT GAGGCGCCGC TGGCGGGGGG ACTGTGAGGC GGCATCTCTI 560
561  TGCATCGACG ATTCCTTGGG GCGGGGTGTC TCAAGGCGCT GAACTACTA CTGGCTTCTI ICTTAATGCA GAGATCGCAT 640
641  AAGGGAGAC GTGACCGCAT GCTCTTASGA GCTTCAACGC CAGTCAGCTC CTTCGSPGTC GCGCGGGGCA TGACTATCGT 720
721  CGCGCACTI ATGACTGCTI ICTTATCAT GCAACTGCTA GAGACGGTGC CGGCAAGCGT CTGGCTCATI TTGGGGAGP 800
801  ACCGCTTTCG CTGGAGCGGC AGGATGATGC GCTGTGTCCT TCGGCTATTC GGAATCTTGC AGCGCCTGCG 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

**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]

**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"/>
low level ↓	F3 5'term <input type="checkbox"/>	B3 5'term <input type="checkbox"/>

**Set Mutation:**  
突然変異部位の指定

**Fixed Primer:**  
プライマーの位置指定

**Save Target:**  
ターゲット配列表示エリア内容を保存

**Design Option:**  
共通プライマー / 特異プライマー条件を指定

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

**Reset Parameters:**  
パラメータのリセット

**Length:** 各プライマーの長さの最短、最長を指定

**Tm:** 各プライマーのTmの最低、最高を指定

**GC rate:** 各プライマーのGC含量の許容範囲を指定

**dG threshold:**  
5'又は3'末端安定性、ダイマー形成能判定のためのdG閾値を指定

**Distance:** 各プライマー間距離について指定

**Limitations:**  
プライマーセットを生成する際の組み合わせ数、生成上限数を指定

**Mutation/Consensus:**  
変異部位の扱い(上から順に特異性が高い)  
各PrimerPieceの5'、3'、中間のそれぞれの部位に対して変異許容を指定可能

**Reset Parameters:**  
パラメータのリセット

**Select Range:** 増幅領域を指定

**Generate:** プライマーセット生成

**Display:** プライマー一覧を表示

**Basic Designing:** 簡易設計画面に遷移

**Parameter Conditions:** パラメータセットの変更

**Generate sets:** プライマー生成数

**Show Page:** 表示する頁を指定

# ループプライマー設計画面説明

## 簡易設計画面

The screenshot displays the 'UPLOAD FILE: PrimerInfo\_Normal' interface. It features a sequence viewer with DNA sequences and annotations. A yellow callout box labeled 'ターゲット配列表示エリア' (Target sequence display area) points to the sequence viewer, stating: '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 sections: '1.Generate' and '2.Display'. The '1.Generate' section includes a 'Generate' button, a 'Generate sets: プライマー生成数' (Generate sets: number of primer generated) field, and a 'Detail Settings' button. The '2.Display' section includes a 'Display' button, a 'Page 1' dropdown menu, and a 'Show Page: 表示する頁を指定' (Show Page: specify page to display) field. A 'Generate sets: プライマー生成数' field is also present. A yellow callout box labeled 'Generate: ループプライマー生成' (Generate: loop primer generation) points to the 'Generate' button. Another yellow callout box labeled 'Display: ループプライマーの一覧を表示' (Display: display list of loop primers) points to the 'Display' button. A yellow callout box labeled 'Detail Settings: 詳細設計画面に遷移' (Detail Settings: transition to detailed design screen) points to the 'Detail Settings' button. A yellow callout box labeled 'Generate sets: プライマー生成数' (Generate sets: number of primer generated) points to the 'Generate sets' field. A yellow callout box labeled 'Show Page: 表示する頁を指定' (Show Page: specify page to display) points to the 'Page' dropdown and 'Show Page' field.

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.Generate  
Generate  
Generate sets: プライマー生成数  
Detail Settings

2.Display  
Display  
Page 1 Displayed.  
Show Page: 表示する頁を指定

Generate: ループプライマー生成

Display: ループプライマーの一覧を表示

Detail Settings: 詳細設計画面に遷移

# 詳細設計画

UPLOAD FILE: PrimerInfo\_Normal

```

1 TTCTCATGTT TGACAGCTTA TCATCGATAA GCITTAATGC GGTAGTITAT CACAGTAAA TTGCTAACGC AGTCAGGCAC 80
81 CGTGTATGAA ATCTAACAAAT GGGCTCATCG TCAICCTCGG CACCGTCACC CTGGATGCTG TAGGCATAGG CTTGGTITATG 160
161 CCGGTACTGG CCGGCTCTTT GGGGGATAIC GTCCAITTCG ACAGCATCGC CAGTCACTAT GGCCTGCTGC TAGCGCTATA 240
F3===== <==== F2==== >==== <==== F1==== >====
241 TCGGTTGATG CAATTTCTAT GGGACCGGTG TCTCGAGGA CTGTCCGACC GCITTTGCCG CCGCCAGTTC CTGCTCGCTT 320
<==== S1 =====> <==== S =====>
321 CGCTACTTGG AGCCACTATC GACTACGGGA TCAITGGGAC CACACCGGTC CTGTGGATCC TCTACGGCGG ACGCATCGTG 400
Z=====
401 GCGGRCAT GCGGRCAT GCGGRCAT GCGGRCAT GCGGRCAT GCGGRCAT GCGGRCAT GCGGRCAT GCGGRCAT GCGGRCAT 480
481 CTTCGGGC CTTCGGGC CTTCGGGC CTTCGGGC CTTCGGGC CTTCGGGC CTTCGGGC CTTCGGGC CTTCGGGC CTTCGGGC 560
561 TGCATGCACC AITTCITGGG GGGGGGTTGC TCAACGGGCT GAACCTACTA CTGGGCTGCT TCTTAATGCA GGAGTGGCAT 640
641 AAGGGAGAGC GTGGACCGAT GCGGTTGAGA GCGTTCACCC CAGTCACTGC CTTCGGGTCG GCGCGGGGCA TGACTATCGT 720
721 CCGCCACTT ATGACTGCTT TCTTTAATCA TCAACTCTGA GGACAGTGC CCGCAGCGCT CTGGGTCATT TTGGGGAGG 800
801 ACCGCTTTCG CTGGAGCGCG AGGATGATCG GCGTGTGGCT TGCGGTAITC GGAATCTTGC ACGCCCTCGC TCAAGCCITC 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  
1.Generate →  → sets were generated. **Generate sets:** プライマー生成数

**Display:** プライマー一覧を表示  
2.Display →  → Page 1 Displayed. **Show Page:** 表示する頁を指定

**Basic Designing:** 簡易設計画面に遷移  
 → If you can move to "Basic Designing", please click below.

**Reset Parameters:** パラメタのリセット

**Parameter Condition**

Length	LF/LB	15	-	25	← <b>Length:</b> 各プライマーの長さの最短、最長を指定
Tm	LF/LB	60	-	66	← <b>Tm:</b> 各プライマーのTmの最低、最高を指定
GC rate(%)		40	-	65	← <b>GC rate:</b> 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			← <b>dG threshold:</b> 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			← <b>Limitations:</b> 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			← <b>Distance:</b> 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。

次に、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。

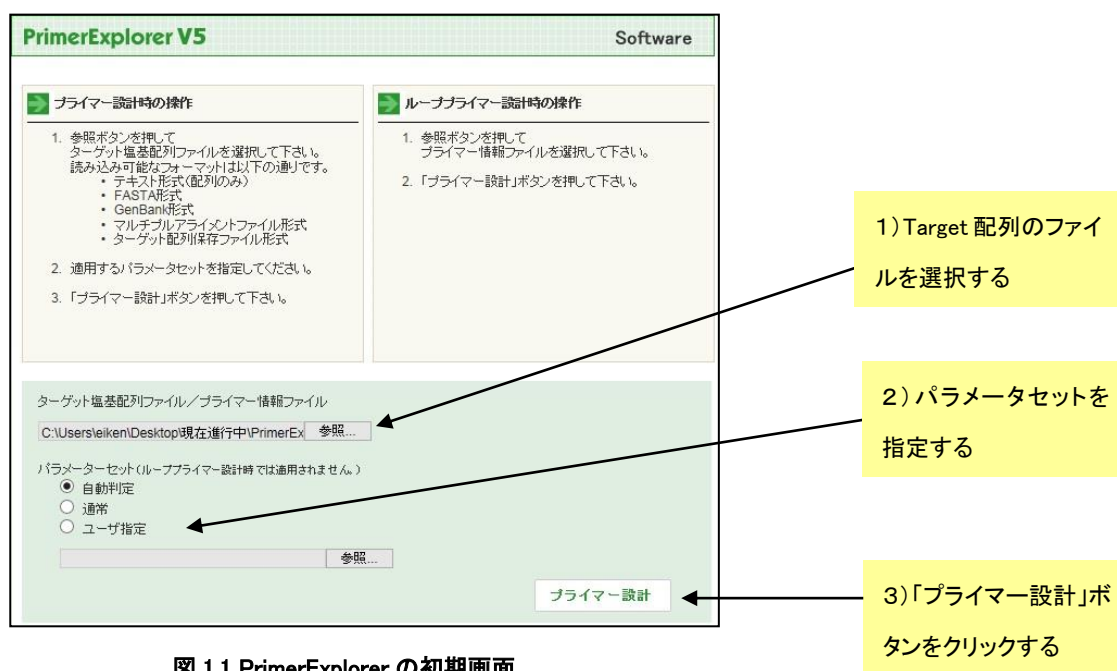


図 1.1 PrimerExplorer の初期画面

## 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 interface for primer design. At the top, there is a text area labeled 'UPLOAD FILE: Normal.txt' containing a DNA sequence with line numbers from 1 to 880. To the right of the sequence, there are controls for 'Set Mutation' (Mut/Cons and Clear buttons) and 'Fixed Primer' (F3, F2, F1, B1, B2, B3 buttons, and a Clear button). Below these is a 'Save Target' button and 'Design Option' radio buttons (Default, Common, Specific). At the bottom of the interface, there are three main buttons: '1.Generate' (with a 'Generate' button and a text field for the number of sets), '2.Display' (with a 'Display' button), and 'Detail Settings' (with a 'Detail Settings' button). 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。次に画面左端のチェックボタンをチェックし、「Confirm」ボタンを押します。チェックしたプライマーセットのプライマー詳細表示画面が現れます (図 1.4)。各項目に問題がないかチェックし、問題がなければ「Order」ボタンを押してプライマーを発注します。また各プライマーセットの「Primer Information」を押し、プライマーの情報を保存します。この情報はループプライマーの設計に利用します。「Save」ボタンを押すと各プライマーセットの塩基配列情報を Excel file の形で保存できます。



1. Push "Order" button in order to transfer to e Genome ORDER site.  
(Colored primers will be ordered.)
2. Push "Primer Information" button to download Primer Information format file for loop primer designing.
3. Push "Save" button to download the primer information in the screen display layout.

DesignId 160412090709

 Primer Information  Save

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

 Primer Information  Save

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-TGAATGGTCTTCGGTTTCCG
BIP			40					CGCAGGATGCTGCTGGCTAC-AATCACTCAGGGTCAATGCC
F2	1594	1613	20	59.76	-4.07	-5.30	0.50	TGAATGGTCTTCGGTTTCCG
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

 Primer Information  Save

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-CAAAGCGGTCGGACAGTG
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	CAAAGCGGTCGGACAGTG
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 TCAICGATAA GCITTAATGC GGTAGTTTAT CACAGTAAAA TTGCTAACGC AGTCAGGCAC 80

81 CGTGTATGAA ATCTAACAAI GCGCTCATCG ICAICCTCGG CACCGTCACC CTGGATGCTG TAGGCATAGG CTIGGITATG 160

161 CCGGTACTGC CCGGCTCTTT GCGGATAATC GTCCATTCGG ACAGCATCGC CAGTCACTAT GCGCTGCTGC TAGGCGTATA 240

241 TGGGTATGATG CAATTTCTAT GCGCACCGGT TCTGGGAGCA CTGTCCGACC GOTTITGGCG CCGCCAGTC CTGCTCGCTT 320

321 CGCTACTTGG AGCCACTATC GACTACGCGA TCAIGGCGAC CACACCCGTC CTGTGGATCC TCTACGCGCG AGGCATCGTG 400

401 GCGGCAICA CCGGCGCCAC AGGTGCGGTT GGTGGGCGCT ATATGCGCGA GAICACCGAT GGGGAAGATC GGGCTCGCCA 480

481 CTTGGGCTC ATGAGCGCTT GTTTCGGGTG GGTATGGTG GCAGGCCDGG TGGCGGGGGC AGTGTGGGC GCCATCTCTT 560

561 TGCATGACCC ATTCTTGGG GCGGCGTGG TCAAGCGCTT CAACCTACTA CTGGGCTGCT TCTTAAAGCA GGAFTGGCAT 640

641 AAGGAGAGC GTCCACCGAT GCCCTTGAGA GCCITCACC CAGTCAGCTC CTTCGGTGG GCGCGGGCCA TGAATACTGT 720

721 CCGCCACTT ATGACTGCTT TCTTATCAT GCAACTGTA GACAGGTGG CCGCAGCGCT CTGGGTCAIT TTGGGGAGG 800

801 ACCGCTTTC CTGGAGCGG ACGATGATG GCCITGCTGT TCGGTATTC GGAATCTTGC ACGCCCTGSC TCAAGGCTTC 880

1.Generate   sets were generated.

2.Display

**「Detail Settings」**

ボタンをクリックする

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

図 1.5 プライマー設計画面

UPLOAD FILE: Normal.txt

```

1 TCTCATGTT TGACAGCTTA TCAIDATAA GGTTAATGC GGTAGTTAT CAGGTTAAA TTGCTAACG AGTCAAGCAG 80
81 CGGTATARA ATCTAACAT GGGCCATCG TCATCTCGG CAGCCFACG CTGGGTCGTG TAGGCATAG CTGGTTATG 160
161 CGGCTACTCG CGGGCTCTT GCGGAAATC GTGATTCGD ACAGCATGC CAGTCACTAT GCGCTCTGCG TAGGCTATA 240
241 TCGTTGATG CAATTTTAT GGGACAGCTT TCTGGAGCA CTTCTCGAGC GGTTTGGCGG CGGGCCAGTC CTCTGCTCT 320
321 GCGTACTCG AGCACTATC GACTAGCGA TCGAGCGAC CAGACCGTTC CTGGGATCG TTATAGCGCG AGCATGCTCT 400
401 GCGGCTATC CGGGCCAGC AGTTCGGCT GGTGGGCTT AATGCGCGA CAGTCCGAT GGGGAGATC GGGCTCGCA 480
481 CTGGGCTCT ATGAGCTCT GTTTCGGCT GGTATGCTG GAGCGCGCG TGGCGGGCG ACTGTTCGCG GCGATCTCT 560
561 TGCATGACG ATTCCTTGG GGGGGGTCG TCAAGCGCT CAGCTACTA CTGGGCTCT TCTAATGCA GAGTTCGAT 640
641 AAGGGAGCG GTGACCAAT GCGTTGAGG GCGTTCAAGC CAGTCACTC CTTGCGTGG GCGCGGGCA TCACTATCG 720
721 CCGGCTACT ATGACTGTT TCTTATCAT GGAAGTCTA GAGCAGTGC CCGGCGCTT CTGGGCTCT TTGGCGTAG 800
801 ACCGCTTTC CTGGAGCGG AGCAATGTC GCGTCTGCT TGGGTTATC GGAATCTTC ACCGCTTTC TCAAGCTTC 880

```

Number of Primer Candidates: F1=51, F2=242, F3=593, B1=253, B2=219, B3=568, F1B=318, B1B=268  
1000 Primer set(s) were generated.

Set Mutation

Fixed Primer

Design Option  
 Default  
 Common  
 Specific

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

2. Generate  
 1000 sets were generated.

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

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

Parameter Condition:

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 checked="" type="checkbox"/> B2 3'term <input checked="" type="checkbox"/>
	F3 3'term <input checked="" type="checkbox"/> B3 3'term <input checked="" type="checkbox"/>
	F1c inner <input type="checkbox"/> B1c inner <input type="checkbox"/>
	F2 inner <input checked="" type="checkbox"/> B2 inner <input checked="" type="checkbox"/>
	F3 inner <input checked="" type="checkbox"/> B3 inner <input checked="" 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 checked="" type="checkbox"/>
↓	F3 5'term <input checked="" type="checkbox"/> B3 5'term <input checked="" type="checkbox"/>
low level	

「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 TTCTCAISIT TGACAGCTTA TCATCGATAA SCTTTAATGC GSTAGTTTAT CACAGTTAAA TTGCTAACGC AGTCAGGCAC 80  
 81 CGTGTATGAA ATCTAACAT GCCTCATGCG TCATCTCGCG CAGCGTCACC CTGGATGCTG TAGGCATAGG CTTGGTTATG 160  
 161 CGGCTACTGC CCGGCTCTTT GCGGGATAIC GTCCATTCCG ACAGCATCGC CAGTCACTAT GCGCTGCTGC TAGCGCTATA 240  
 241 TGGGTTGATG CAATTTCAT GCSCACCGST TCTGGAGACA CTGTCCGACC SCTTTGGCCG CCGCCDAGTC CTGCTDGCFT 320  
 321 CGCTACTTGG AGCCACTATC GACTAAGCBA TCATGGCGAC CACACCGGTC CTGTGGATCC TCTAAGCCGG ACSCATCGTG 400  
 401 GCGGSCATCA CCGGCGCCAC AGGTGCGGTT SCTGGCGCCT ATATCGCCGA CATCACCGAT GGGGAGATC GGCTDGCCTA 480  
 481 CTTCGGGCTC ATGACCGCTT GTTTCGGGCT GGGTATGATG GCGAGCCGCG TGGCCGCGGG ACTGTGGGGC GCCATCTCCT 560  
 561 TGCATGACCC ATTCCTTGGC GCGGCGGTCG TCAACGCGCT CAACTACTA CTGGGCTGCT TCCTAATGCA GGAGTGCAT 640  
 641 AAGGAGAGAC GTGACCGCAT GCCCTTGA GA CCTTCAGCC CAGTCAGCTC CTTCGCGTGG GCGCGGGGCA TGACTATCGT 720  
 721 CGCCGCACTT ATGACTGTCT TCATTATCAT GCAACTGTA GAGAGGCTGC CCGCAGCGCT CTGGTCAIT TTAGGCGAAG 800  
 801 ACCGCTTTCG CTGGAGCGCG AGATGATCG GCCTGTGCTT TCGGTAATC GGAATCTGC ACGCCCTCGC TCAGCGCTTC 880

Number of primer candidates: 1122  
 1000 Primer set(s) were generated. F2=242, F3=593, B1=253, B2=213, B3=568, F1P=318, B1P=268

Set Mutation  
 Mut/Cons  
 Clear

Fixed Primer  
 F3  
 F2  
 F1  
 B1  
 B2  
 B3  
 Clear

Save Target

Design Option  
 Default  
 Common  
 Specific

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

2. Generate  
 Generate 1000 sets were generated.

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

メッセージエリアに現在の進行状況が表示される

全部で1000セットのプライマーが生成された

図 1.7 設計画面

「Display」ボタンをクリックして結果を表示させる

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

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

Confirm Save List

Primer set: sorting rule [None]

Target DNA CACAGTTAAATTGCTAACGGAGTCAGGCACCGTGTATGAAATCTAACAATGCGCTCATCGTCATCCTCGGCACCGTCACCCT  
 (Complement) gtgtcaatttaacgattgcctcagtcocgtggcacatactttagattgtttacgcgagtagcagtaggagccgtggcagtgagg  
 CONSENSUS(\*)  
 Primer ID dG(dimer) 51 61 71 81 91 101 111 121 131

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

2) Confirm ボタンをクリックする

自由エネルギー変化値

F3 領域

F2 領域

caagsgtctctcttaggct gccaacaat sagcsaete [39]  
 caagsgtctctcttaggct gccaacaat sagcsaete [40]  
 ATTACGGTCAATCCGCC  
 ATTACGGTCAATCCGCC  
 ATTACGGTCAATCCGCC  
 ATTACGGTCAATCCGCC  
 taatgccaagttaggcs GTTCCACGGAGAATCCGACG actttcgaaccgatgcttc [41]  
 taatgccaagttaggcs GTTCCACGGAGAATCCGACG actttcgaaccgatgcttc [42]  
 taatgccaagttaggcs GTTCCACGGAGAATCCGACG actttcgaaccgatgcttc [43]  
 taatgccaagttaggcs GTTCCACGGAGAATCCGACG actttcgaaccgatgcttc [44]  
 taatgccaagttaggcs GTTCCACGGAGAATCCGACG aactaccgcaaggataacca [45]  
 taatgccaagttaggcs GTTCCACGGAGAATCCGACG aactaccgcaaggataacca [46]  
 taatgccaagttaggcs GTTCCACGGAGAATCCGACG aactaccgcaaggataacca [47]  
 taatgccaagttaggcs GTTCCACGGAGAATCCGACG aactaccgcaaggataacca [48]  
 taatgccaagttaggcs GTTCCACGGAGAATCCGACG aactaccgcaaggataacca [49]  
 taatgccaagttaggcs GTTCCACGGAGAATCCGACG aactaccgcaaggataacca [50]  
 ATTACGGTCAATCCGCCGTTGTTCACGGAGAATCCGACGGGGTGTACTCGCTCACA TTTAATGTTGATGAAAGCTGGCTACAGGAAAGCCAGACCGGAATTATTTTGTATGGCGTTCCTATTGGTTAAAAATGAG  
 1311 1321 1331 1341 1351 1361 1371 1381 1391 1401 1411 1421 1431 1441  
 taatgccaagttaggcs GTTCCACGGAGAATCCGACG actttcgaaccgatgcttc aactaccgcaaggataacca [45]  
 taatgccaagttaggcs TCCACGGAGAATCCGACGG actttcgaaccgatgcttc aactaccgcaaggataacca [51]  
 taatgccaagttaggcs TCCACGGAGAATCCGACGG actttcgaaccgatgcttc aactaccgcaaggataacca [52]  
 aatgccaagttaggcscaacaTCCACGGAGAATCCGACGG actttcgaaccgatgcttc aactaccgcaaggataacca [54]  
 atgccaagttaggcscaacaTCCACGGAGAATCCGACGG actttcgaaccgatgcttc aactaccgcaaggataacca [55]  
 agttaggcscaacaaggstg ATCCGACGGGGTGTACTCGC ccgatgctctccsgtct aactaccgcaaggataacca [56]  
 ttaggcscaacaaggstg ATCCGACGGGGTGTACTCGC ccgatgctctccsgtct aactaccgcaaggataacca [57]  
 ttaggcscaacaaggstg ATCCGACGGGGTGTACTCGC ccgatgctctccsgtct aactaccgcaaggataacca [58]  
 taggcscaacaaggstg ATCCGACGGGGTGTACTCGC ccgatgctctccsgtct aactaccgcaaggataacca [59]

B1c 領域

B2 領域

B3 領域

B3 領域の5'末端の位置は1440bpになっている

図 1.8b 結果の一覧表示画面-1 (2 ページ目)



The screenshot displays a software application window titled "Test". The window has a menu bar with "Test", "Export", and "Print" options. Below the menu bar, there is a toolbar with a search icon and a "Filter" button. The main area is a large table with the following columns: "No.", "Name", "Status", "Start Time", "End Time", "Duration", "Error Code", "Error Message", "Screenshot", "Log", "Report", and "Detail". The table is populated with multiple rows of test data. The "Status" column for many rows is highlighted in green, indicating a successful or passed state. Some rows have a small icon next to the status, possibly representing a warning or error. The table content is dense, showing various test item names and their corresponding results.

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)。

label	5'pos	3'pos	len	Tm	5'dG	3'dG	GCrate	Sequence
1 ID:1 dimer(minimum)dG=-2.01								
F3	62	79	18	60.91	-4.49	-6.25	0.56	TGCTAACGCAGTCAGGCA
B3	250	268	19	59.11	-6.85	-4.56	0.53	GGGTGCGCATAGAAATTGC
F1P		41						GCAGTACCGGCATAACCAAGCC-AATGCGCTCATCGTCATCC
B1P		39						GCCTCTTGCGGGATATCGTCC-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
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
2 ID:2 dimer(minimum)dG=-2.01								
F3	62	79	18	60.91	-4.49	-6.25	0.56	TGCTAACGCAGTCAGGCA
B3	250	268	19	59.11	-6.85	-4.56	0.53	GGGTGCGCATAGAAATTGC
F1P		40						GCAGTACCGGCATAACCAAGCC-ATGCGCTCATCGTCATCC
B1P		39						GCCTCTTGCGGGATATCGTCC-GCTAGCAGCACGCCATAG
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 $\Delta G$ (安定性)が $-4.0\text{kcal/mol}$ 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)

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

2) 「Save」ボタンをクリックして配列情報を保存する

1 ID:1 dimer(minimum)dG=-2.01									
label	5'pos	3'pos	len	Tm	5'dG	3'dG	GCrate	Sequence	
F3	62	79	18	60.91	-4.49	-6.25	0.56	TGCTAACGCGAGTCAGGCA	
B3	250	268	19	59.11	-6.85	-4.56	0.53	GGGTGCGCATAGAAATTGC	
FIP			41					GCAGTACCGGCATAACCAAGCC-AATGCGCTCATCGTCATCC	
BIP			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	
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	

2 ID:2 dimer(minimum)dG=-2.01									
label	5'pos	3'pos	len	Tm	5'dG	3'dG	GCrate	Sequence	
F3	62	79	18	60.91	-4.49	-6.25	0.56	TGCTAACGCGAGTCAGGCA	
B3	250	268	19	59.11	-6.85	-4.56	0.53	GGGTGCGCATAGAAATTGC	
FIP			40					GCAGTACCGGCATAACCAAGCC-ATGCGCTCATCGTCATCC	
BIP			39					GCCTCTTGCGGGATATCGTCC-GCTAGCAGCACGCCATAG	
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 1.11 選択プライマー表示画面

primerexplorer.jp から PrimerInfod71b88cf を開くか、または保存しますか?

ファイルを開く(O)    保存(S)    キャンセル(C)

図 1.12 プライマー情報の保存画面

## 2 AT rich 配列でのプライマー設計

AT rich な遺伝子配列を用いてプライマー設計を行います。使用するのはウイルス遺伝子の一部で、長さは1,140bp、GC 含量=34.5%です。

PrimerExplorer V5 の初期画面で Target 配列を読み込ませます。

Target配列ファイルを入力し、パラメータセット「自動判定」が選択されていることを確認した後、「プライマー設計」ボタンをクリックします。(図は省略します)

「Generate」ボタンをクリックする

「Parameter Set」は「AT rich」が選択されている

プライマーの長さが長めに、Tm 値が低めに設定されている

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

図 2.1 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、Tm 値が低めに設定されています(図2. 1参照)。

次に「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 Tm 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。

DesignId 160412160037

Primer set: sorting rule [None]

Primer ID	dG(dimer)	11	21	31	41	51	61	71	81	91	101
[1]	-1.83	[1]	TGATGCCACCTTTTCAGC			GCCCCAAATGAAAATATAGCT					accagtttg
[2]	-2.32			[2]		GCCCCAAATGAAAATATAGCT	AACAGGTTATTGACCATTTC				tttg
[3]	-2.32			[3]		GCCCCAAATGAAAATATAGCT	AACAGGTTATTGACCATTTC				ttg
[4]	-2.32			[4]		GCCCCAAATGAAAATATAGCT	ACAGGTTATTGACCATTTC				
[5]	-1.51			[5]		GCCCCAAATGAAAATATAGCT	AGGTTATTGACCATTTCGGA				
[6]	-1.51			[6]		GCCCCAAATGAAAATATAGCT	GGTTATTGACCATTTCGGA				
[7]	-1.51			[7]		GCCCCAAATGAAAATATAGCT	GGTTATTGACCATTTCGGA				
[8]	-1.69			[8]		CCAAATGAAAATATAGCTAAACAGG			CGAAATGTATCTAATGGTCAAA		
[9]	-1.54						[9]	GGTTATTGACCATTTCGGA		CTAATGGTCAAA	
[10]	-1.54						[10]	GGTTATTGACCATTTCGGA		TAATGGTCAAA	
[11]	-1.54						[11]	GGTTATTGACCATTTCGGA		TAATGGTCAAA	
[12]								GGTTATTGACCATTTCGGA		AATGGTCAAA	
[13]								GGTTATTGACCATTTCGGA		AATGGTCAAA	
[14]								GGTTATTGACCATTTCGGA		ATGGTCAAA	
[15]								GGTTATTGACCATTTCGGA		ATGGTCAAA	
[16]								GGTTATTGACCATTTCGGA		TGGTCAAA	
[17]	-1.29						[17]	GGTTATTGACCATTTCGGA		GGTCAAA	
[18]	-2.46						[18]	GGTTATTGACCATTTCGGA		GTCAA	
[19]	-2.46						[19]	GGTTATTGACCATTTCGGA		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<sub>m</sub> 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<sub>m</sub> 値が 5°C程度高めに設定します。緩い条件(各領域の T<sub>m</sub> 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<sub>m</sub> 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<sub>m</sub> 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<sub>m</sub> 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<sub>m</sub> 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<sub>m</sub> 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<sub>m</sub> 値が、デフォルトの T<sub>m</sub> 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<sub>m</sub> 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<sub>m</sub> 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<sub>m</sub> 値がデフォルトの T<sub>m</sub> 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<sub>m</sub> 値をさらに高く設定します。どの程度長さや T<sub>m</sub> 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<sub>m</sub> 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。

The screenshot shows the 'Basic Designing' interface with the following parameters and values:

Parameter	Sub-parameter	Value	Targeting Range
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	

Annotations in the image:

- A yellow callout box points to the 'Save Parameter' button with the text: 「Save Parameters」ボタンをクリックする
- A white callout box points to the input fields for Length, Tm, and GC rate with the text: 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)

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

設計条件を保存する

図3. 2 設計条件の保存



### 3. 4 保存した設計条件でのプライマー設計

PrimerExplorer V5 の初期画面(図3. 3)で、Target配列を入力します。次にパラメータセット欄でユーザ指定をチェックし、参照ボタンをクリックして保存してある設計条件パラメータファイルを選択します。

次に「プライマー設計」ボタンをクリックします。

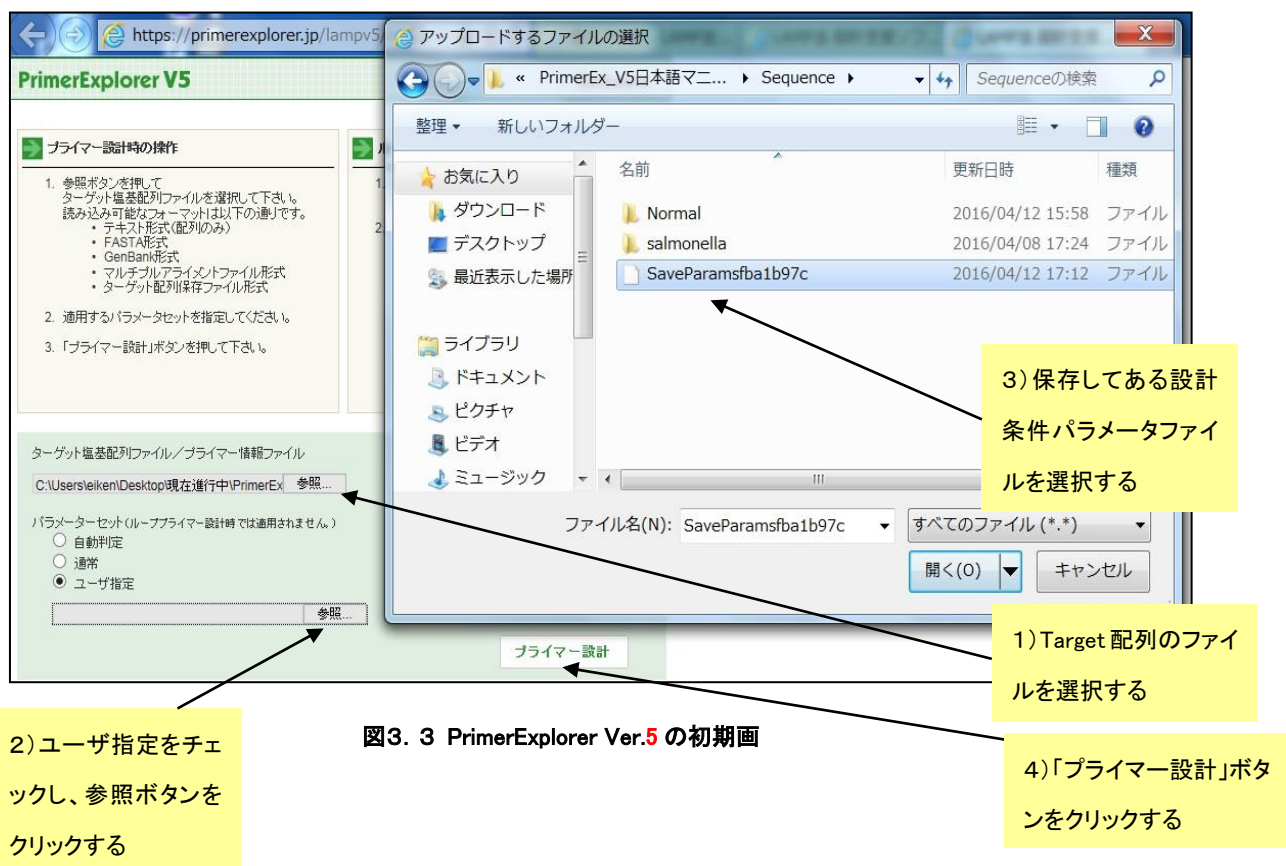


図3. 3 PrimerExplorer Ver.5 の初期画

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  
 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: **Custom** Save Parameter Reset Parameter

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  
 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: Normal, AT rich, GC rich, **Custom** Save Parameter Reset Parameter

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

1) 変更する場合は、新たな F2 領域を指定する

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

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。

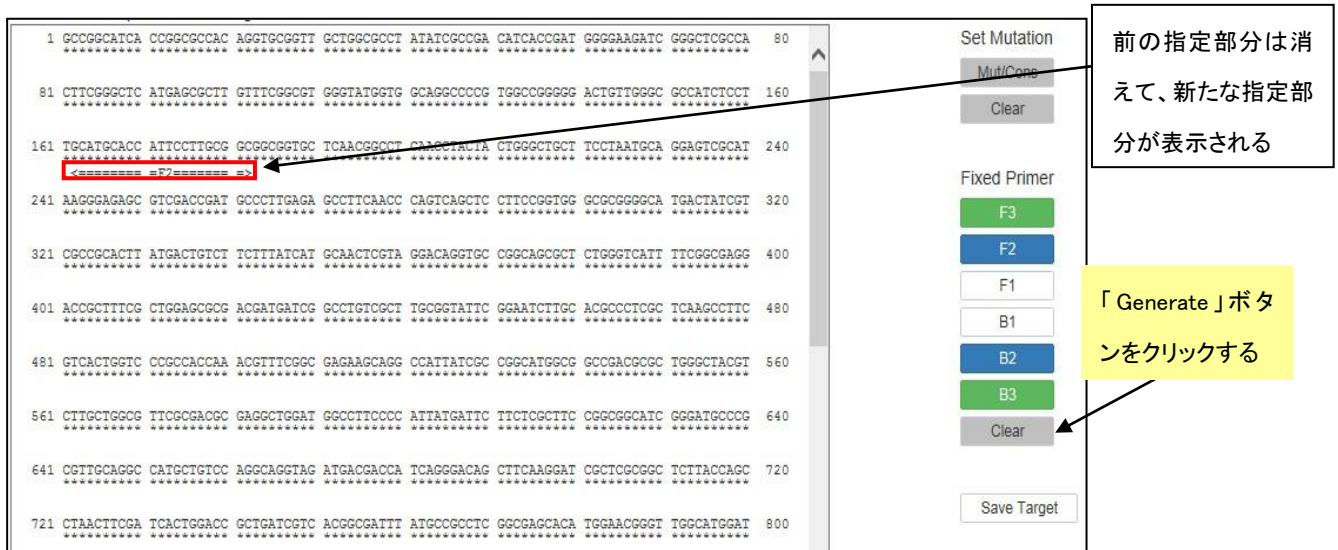


図4. 3 プライマー領域を再指定した後の画面

#### 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 (Complement)	TCAACGGCCTCAACTACTACTGCGCTGCTTCCTAATGCAGGAGTCGCATAAGGGAGAGCGTCGACCGATGCCCTT											
CONSENSUS(*)	agttgccggagtggatgatgaccgcagcaaggattacgtcctcagcgatttcctctcgcagctggctacgggaa											
Fixed Primer	*****											
Primer  DdG(dimer)	191	201	211	221	231	241	251	261				
<input type="checkbox"/> [1]	-1.63	[1]	CTACTGGGCTGCTTCCTAAT	GCAGGAGTCGCATA	AAGGGA							
<input type="checkbox"/> [2]	-2.46	[2]	CTACTGGGCTGCTTCCTAAT	CAGGAGTCGCATA	AAGGGAGA							
<input type="checkbox"/> [3]	-2.15	[3]	CTACTGGGCTGCTTCCTAAT	AGGAGTCGCATA	AAGGGAGAG							
<input type="checkbox"/> [4]	-2.13	[4]	CTACTGGGCTGCTTCCTAAT		TCGCATAAAGGGAGAGCGT							
<input type="checkbox"/> [5]	-2.45	[5]	CTACTGGGCTGCTTCCTAAT		TCGCATAAAGGGAGAGCGTC							
<input type="checkbox"/> [6]	-2.45	[6]	CTACTGGGCTGCTTCCTAAT		CGCATAAAGGGAGAGCGTC							
<input type="checkbox"/> [7]	-1.06	[7]	CTACTGGGCTGCTTCCTAAT	GCAGGAGTCGCATA	AAGGGA							
<input type="checkbox"/> [8]	-2.46	[8]	CTACTGGGCTGCTTCCTAAT	CAGGAGTCGCATA	AAGGGAGA							
<input type="checkbox"/> [9]	-2.41	[9]	CTACTGGGCTGCTTCCTAAT	AGGAGTCGCATA	AAGGGAGAG							
<input type="checkbox"/> [10]	-2.41	[10]	CTACTGGGCTGCTTCCTAAT		TCGCATAAAGGGAGAGCGT							
<input type="checkbox"/> [11]	-2.45	[11]	CTACTGGGCTGCTTCCTAAT		TCGCATAAAGGGAGAGCGTC							
<input type="checkbox"/> [12]	-2.45	[12]	CTACTGGGCTGCTTCCTAAT		CGCATAAAGGGAGAGCGTC							

図 4.5 結果の一覧画面表示

## ループプライマーの設計

### 5.1 プライマー情報ファイルのアップロード

PrimerExplorer V5 の初期画面に戻って、以前保存しておいた「プライマー情報ファイル」を読み込みます。「参照」ボタンをクリックしファイルを選択してから「プライマー設計」ボタンをクリックしてください。(図5.1参照)

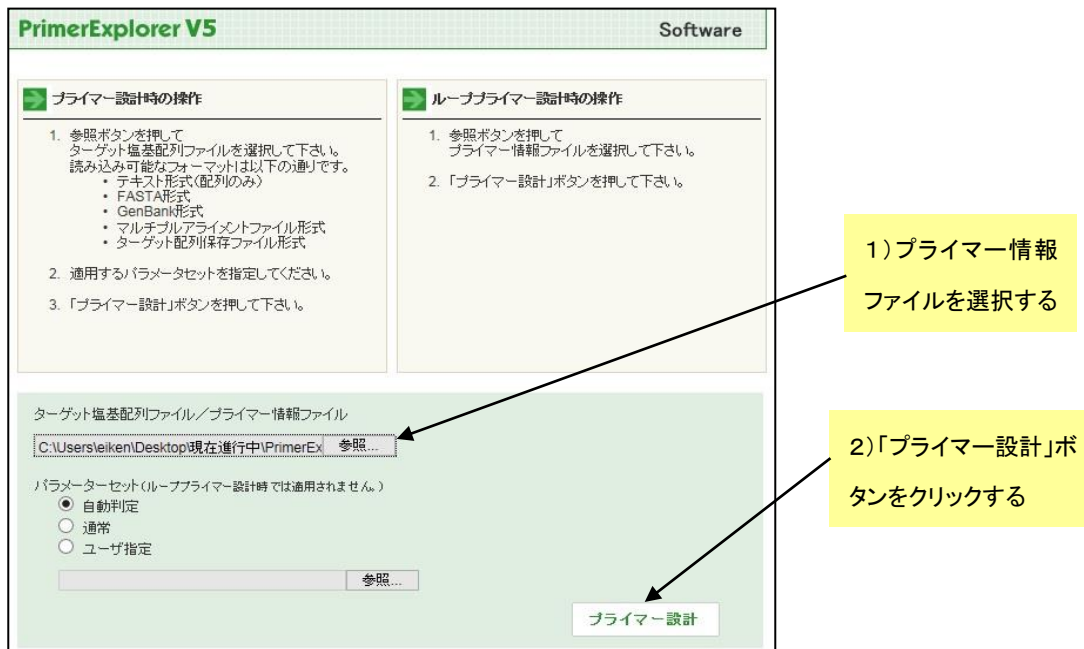


図 5.1 PrimerExplorer の初期画面

### 5.2 ループプライマーを設計する

プライマー情報ファイルを読み込ませると次ページの図5.2のようなループプライマー設計画面が表示されるので、パラメータをデフォルトのままの状態にして「Generate」ボタンをクリックします。

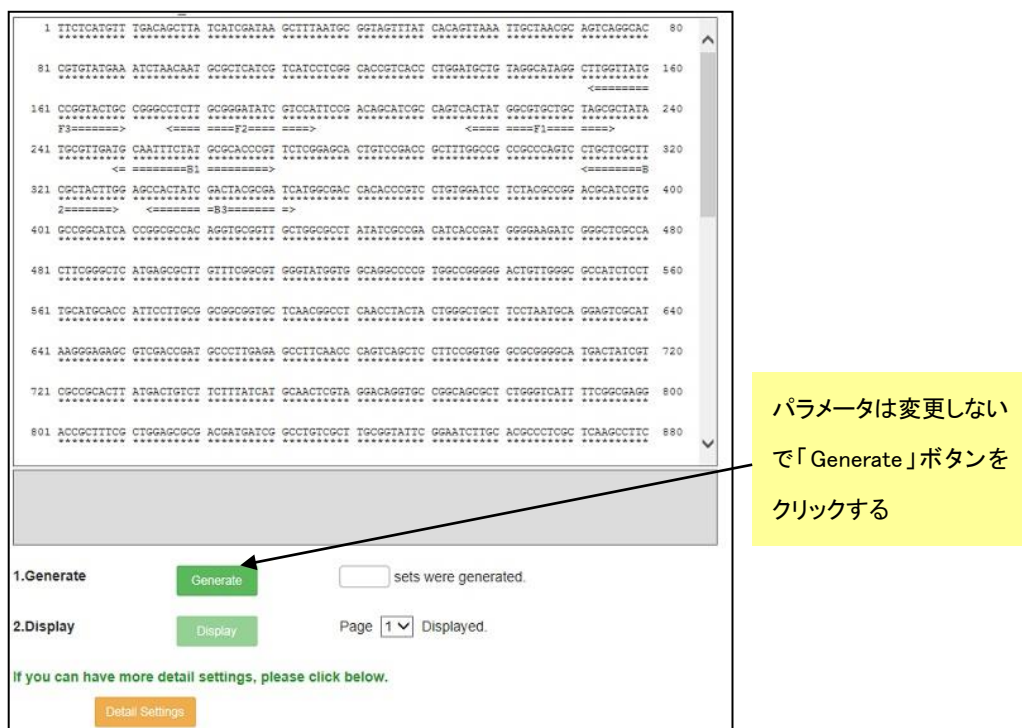


図 5.2 ループプライマー設計画面

1 セットのプライマーが生成されますので、続いて「Confirm」ボタンをクリックして結果を一覧表示させます(図5.3参照)

2) 「Confirm」ボタンをクリックする

1) ボックスをチェックする

保存しておいたプライマー情報の領域

Confirm Save List Designid 160413160245

Primer set

Target DNA  
(Complement)  
CONSENSUS(\*)

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

Forward 側のループプライマー

Backward 側のループプライマー

Designid 160413160245

図5.3 ループプライマー設計画面(設計後)

図5.3に結果が一覧表示されています。一番上に保存しておいたプライマー情報の領域が示され、その下にTarget配列、一番下にループプライマーが表示されています。さらに、ループプライマーセットの詳細な情報を見るために、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。

<input type="checkbox"/>	Save								
1	ID:1	dimer(minimum)dG=-2.95							
	label	5'pos	3'pos	len	Tm	5'dG	3'dG	GCrat	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



## 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' <sup>1)</sup>	中 <sup>2)</sup>	3' <sup>3)</sup>	5'	中	3'	5'	中	3'	5'	中	3'	5'	中	3'	5'	中	3'
共通プライマー <sup>4)</sup>	●	●		●	●			●	●		●	●	●	●		●	●	
特異的プライマー <sup>5)</sup>			●			●	●			●					●			●

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

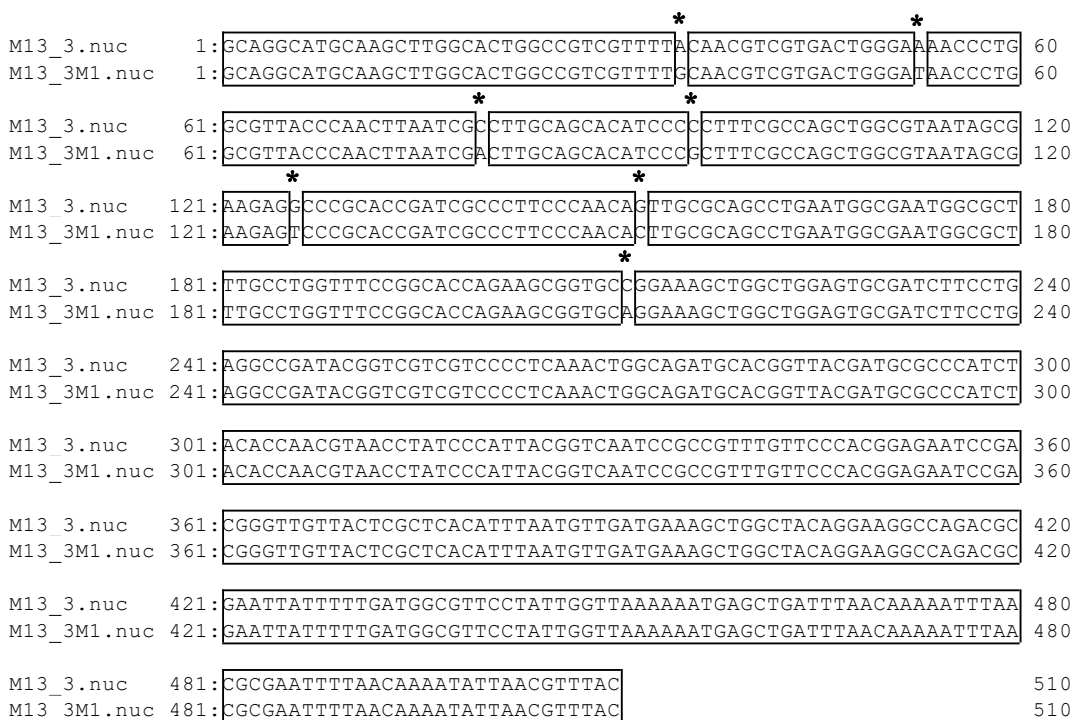


図 6.1 野生株と変異株のアライメント

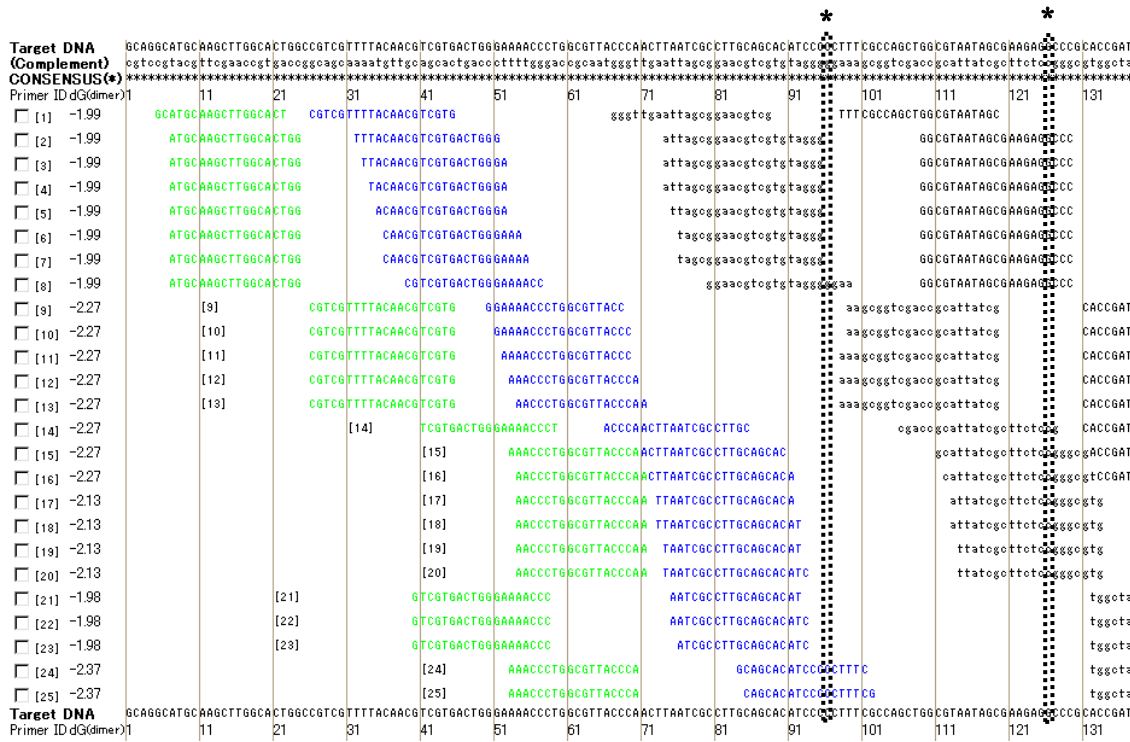
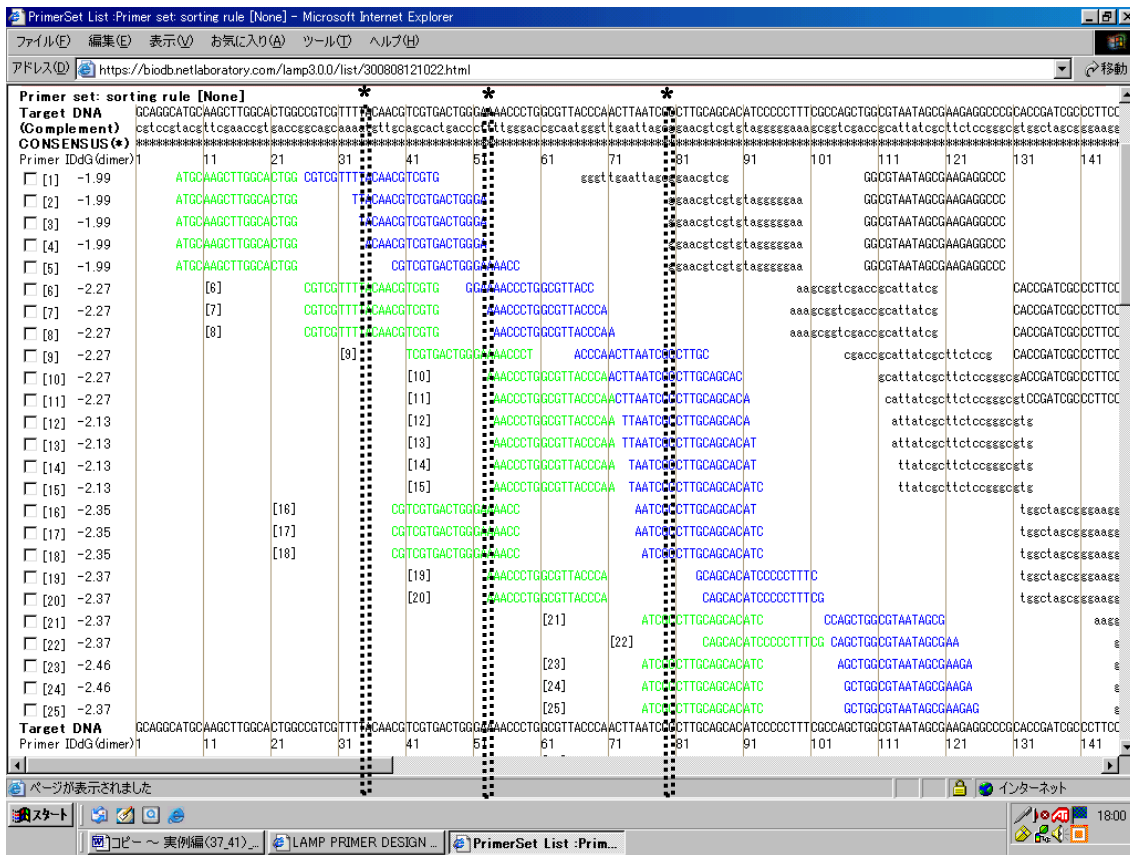


図 6.2 プライマーセットと変異部位

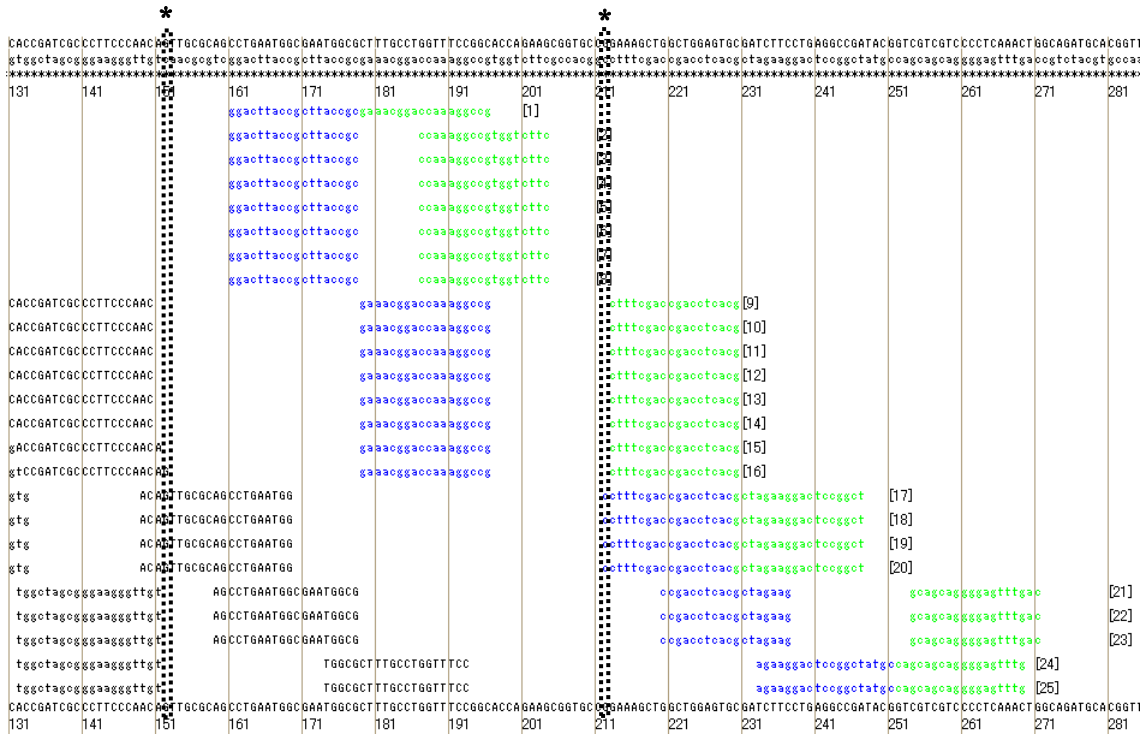


図 6.2 続き

表 6.2 プライマーセットの変異部位対応する位置

No	F3領域			F2領域			F1c領域			E1c領域			B2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
5				●															共通
6							●		●										特異的**
7							●		●										特異的
8							●		●										特異的
9			●		●														共通
10			●		●														共通
11			●		●														共通
12			●		●														共通
13			●		●														共通
14							●		●										特異的
15	●				●			●											特異的
16					●				●										特異的
17					●				●										特異的
18					●				●										特異的
19					●				●										特異的
20					●				●										特異的
21				●					●										特異的
22				●					●										特異的
23				●					●										特異的
24	●				●				●										特異的
25	●				●				●										共通

\*共通: 野生株と変異株を共通のプライマーで増幅するプライマーセット候補  
 \*\*特異的: 変異株を野生株から区別するプライマーセット候補

## 7 変異部位を考慮したプライマー設計

### 7.1 Target 配列のアップロード

本章では、野生株と変異株を共通のプライマーで増幅する、あるいは変異株のみを優先的に増幅検出する場合のプライマー設計方法について説明します。

PrimerExplorer V5 の初期画面を開いて、第1章で説明したのと同様の手順(p.18-23)で Target 配列ファイルを選択し、続いて「プライマー設計ボタン」をクリックします。(図は省略します)

### 7.2 Target 配列上に変異部位を入力して変異を含まないプライマーを設計する

変異部位を含まないプライマーの設計について説明します。プライマー設計画面(図 7.1)で Target 配列上の変異部位を指定した後に「Mutation」ボタンをクリックします。そうすると図 7.2のように変異の指定をした位置のスター(\*)がハイフン(-)に変わります。この状態で入力が完了したことになります。また、もしもこの変異の情報を消去したい場合は「Clear」ボタンをクリックします。

図 7.1 プライマー設計画面

1. Select Range

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

Targeting Range: 147 - 148

Set Mutation

- Mut/Cons
- Clear

Fixed Primer

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

Save Target

Design Option

- Default
- Common
- Specific

図 7.2 変異部位を入力した後の画面

1. Select Range

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

Targeting Range: 147 - 148

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.

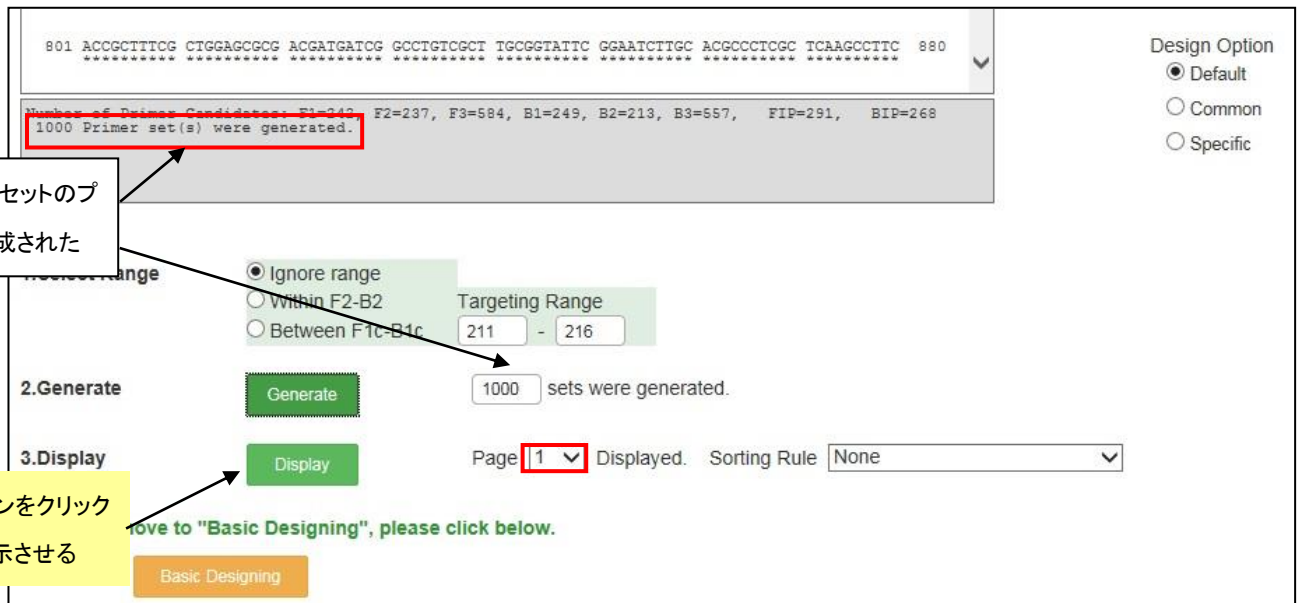


図 7. 4 設計後の画面

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 (Dimer)	Score	Primer 1	Primer 2	Primer 3	Primer 4	Primer 5	Primer 6	Primer 7	Primer 8	Primer 9	Primer 10	Primer 11	Primer 12	Primer 13	Primer 14	Primer 15	Primer 16	Primer 17	Primer 18	Primer 19	Primer 20
[1]	-2.01	TGCTAAAGCACTCAGGCA	AATGCGCTGATGCTCATCC																		
[2]	-2.01	TGCTAAAGCACTCAGGCA	ATGCGCTGATGCTCATCC																		
[3]	-2.46																				
[4]	-2.46																				
[5]	-2.46																				
[6]	-1.82																				
[7]	-1.82																				
[8]	-1.82																				
[9]	-2.06																				
[10]	-1.93																				
[11]	-1.97																				
[12]	-1.97																				
[13]	-1.97																				
[14]	-1.93																				
[15]	-2.36																				
[16]	-2.15																				
[17]	-2.01																				
[18]	-2.36																				
[19]	-2.46																				
[20]	-2.15																				

この部分に変異がある

この部分を超えるようにしてプライマーセットが生成される



図 7. 6 変異を導入しない場合の設計プライマーセット

Primer set: sorting rule [None]		Target DNA																			
(Complement)		gtgtcaattbaacgattgctcagtcogtggcaacatacttagattggtacggagtagcagtaggagcgttggcagtgggacctacgacatccgtatccggaaccaatacggccatgacggcccgagaaagcccoctatagcaggttaaggctgtctgtagcgtcagtgata																			
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]		TGCTAACGCASTCAGGCA				AATGOGTCATCGTCATCC					cogaaccaatacggccatgacg		GCCCTTTGCGGGATATCGTCC							gata
<input type="checkbox"/> [2]	-2.01 [2]		TGCTAACGCASTCAGGCA				ATGGOTCATCGTCATCC					cogaaccaatacggccatgacg		GCCCTTTGCGGGATATCGTCC							gata
<input type="checkbox"/> [3]	-2.46					[3]	GOGTCATCGTCATCC		CGTCACCCTGGATGCTGTA					cggagaaagcccoctatagcagg							CTAT
<input type="checkbox"/> [4]	-2.46					[4]	GOGTCATCGTCATCC		CCCTGGATGCTGTAGGCA					cggagaaagcccoctatagcagg							CTAT
<input type="checkbox"/> [5]	-2.46					[5]	GOGTCATCGTCATCC		CTGGATGCTGTAGGATAGG					cggagaaagcccoctatagcagg							CTAT
<input type="checkbox"/> [6]	-2.23							[6]	ACCTGGATGCTGTAGGC		GCTTGGTTATGCCGACTG										ggctgtgttagcgggtcagtgTAT
<input type="checkbox"/> [7]	-2.49								[7]	CTGGATGCTGTAGGATAGG		CTTGGTTATGCCGACTG									ggctgtgttagcgggtcagtgTAT
<input type="checkbox"/> [8]	-2.49								[8]	GGATGCTGTAGGATAGG		GCTTGGTTATGCCGACTG									ggctgtgttagcgggtcagtgTAT
<input type="checkbox"/> [9]	-2.16							[9]	ACCTGGATGCTGTAGGC		GGTTATGCCGACTG										ggctgtgttagcgggtcagtgTAT
<input type="checkbox"/> [10]	-1.82									[10]	TTGGTTATGCCGACTG				CTCTTTCGCGGATATCGTCCA						tgata
<input type="checkbox"/> [11]	-1.82										[11]	TTGGTTATGCCGACTG			TCTTTCGCGGATATCGTCCA						a
<input type="checkbox"/> [12]	-1.82										[12]	TTGGTTATGCCGACTG			TCTTTCGCGGATATCGTCCA						a
<input type="checkbox"/> [13]	-2.16													[13]	GGGGATATCGTCCATCCGACAGCATCGCCAGTCC						
<input type="checkbox"/> [14]	-2.33													[14]	GGGATATCGTCCATCCGAC		GCATCGCCAGTCCAGTAT				
<input type="checkbox"/> [15]	-2.16													[15]	TTGTCATCCGACAGCA		CAGTCCAGTAT				
<input type="checkbox"/> [16]	-2.33													[16]	GGGATATCGTCCATCCGAC		CAGTCCAGTAT				
<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

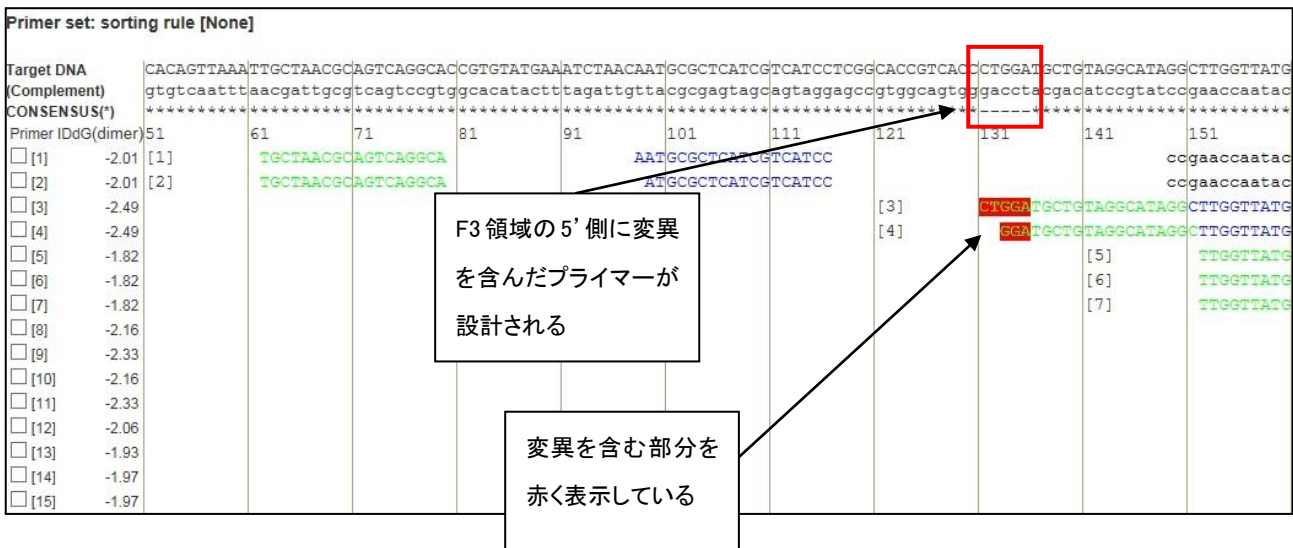
Peculiarity	Permission	
	F1c 5'term	B1c 5'term
high level	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
↑	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>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

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)	gtgtcaatttaacgattgcgtcagtcctgtgcacatacttagattgttacgcgagtagcagtaggagccgtggcagtgggacctaagacatccgtatccgaaccaatac														
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			CTGCTAGGCTAGG		ccgaaccaatac				
<input type="checkbox"/> [3]	-2.46				[3]	GCGCTCATCGTCATCC			CTGCTAGGCTAGG						
<input type="checkbox"/> [4]	-2.49							[4]	CTGCTAGGCTAGG		CTTGTTATG				
<input type="checkbox"/> [5]	-2.49							[5]	CTGCTAGGCTAGG		CTTGTTATG				
<input type="checkbox"/> [6]	-1.82									[6]	TTGTTATG				
<input type="checkbox"/> [7]	-1.82									[7]	TTGTTATG				
<input type="checkbox"/> [8]	-1.82									[8]	TTGTTATG				
<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      AATGCTACTACTATTAGTAGAATTGATGCCACCTTTTCAGCTCGCGCCCAATGAAAA 60
SeqB      -----AATTGATGCCACCTTTTCAGCTTCGCTCCAAATGAACAT 40
SeqC      -----CTCGCGCCCACTTGAAAA 20
          ** **** * ** **

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

SeqA      CGTTGCGAGAATTGGGAATCAACTGTTACATGGAATGAACTCCAGACACCGTACTTTA 180
SeqB      CGATGCGAGAATCGGAAATCAACTGTTACATGGAATGAACTCCAGACGCGTACTTCA 160
SeqC      CGTTGGAAGAATTGGCAATCAACTGTAACATGAACTTCGACACCGTACTTTA 140
          ** * ** ** ** * ** ** ** ** ** * ** ** ** ** * ** ** ** ** * **

SeqA      GTTGCATATTTAAACATGTTGAGCTAGACACCAGATTCAGCAATTAAGCTCTAAGCCA 240
SeqB      GTTGCATATGTAACCATGTTGAGCTAGACACGAGTTTCAGCAATTAAGCTCTAAGCCA 220
SeqC      GTTGCATATTTAAATCATGTTGAGCTAGACACAGATTCAGCACGTAAGCTCTAAGCCA 200
          *** ** ** ** * ** ** ** ** ** * ** ** ** ** * ** ** ** ** * **

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

SeqA      TTGAGTTTGCCTCCGGTCTGGTTCGCTTTGAAGCTCGAATTAACACGCGATATTTGAAG 360
SeqB      TTGAGTTTGCCTCCGGTCTGGTTCGCTTTGAAGCTCGAATTAACACGCGATATTTGAAG 340
SeqC      TCGGAGTTAGCTTCCGGTCTGGTTCGCTTTGAAGCTCGAATTAACACGCGATATTTGATG 320
          * ** ** ** * ** ** ** ** ** * ** ** ** * ** ** ** * ** **

SeqA      TCTTTCGGGCTTCTCTTAATCTTTTGTGCAATCCGCTTTGCTTCTGACTATAATAGT 420
SeqB      TCTTTCGGGCTTCTCTTAATCTTTTGTGCAATCCGCTTTGCTTCTGACTATAATAGT 400
SeqC      CCTTTCAGGCTTCTCTGAATCTTTTGTGCAATCCGCTTTGCTTCTGACTATAATAGT 380
          ***** ** ** ** * ** ** ** * ** ** ** * ** ** ** * **

SeqA      CAGGGTAAAGACGTATTTTGTATTTGATGCAATCCGCTTTGCTTCTGACTATAATAGT 480
SeqB      CAGGGTAAAGACGTATTTTGTATTTGATGCAATCCGCTTTGCTTCTGACTATAATAGT 460
SeqC      CACGGTAAAGACGTATTTTGTATTTGATGCAATCCGCTTTGCTTCTGACTATAATAGT 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。

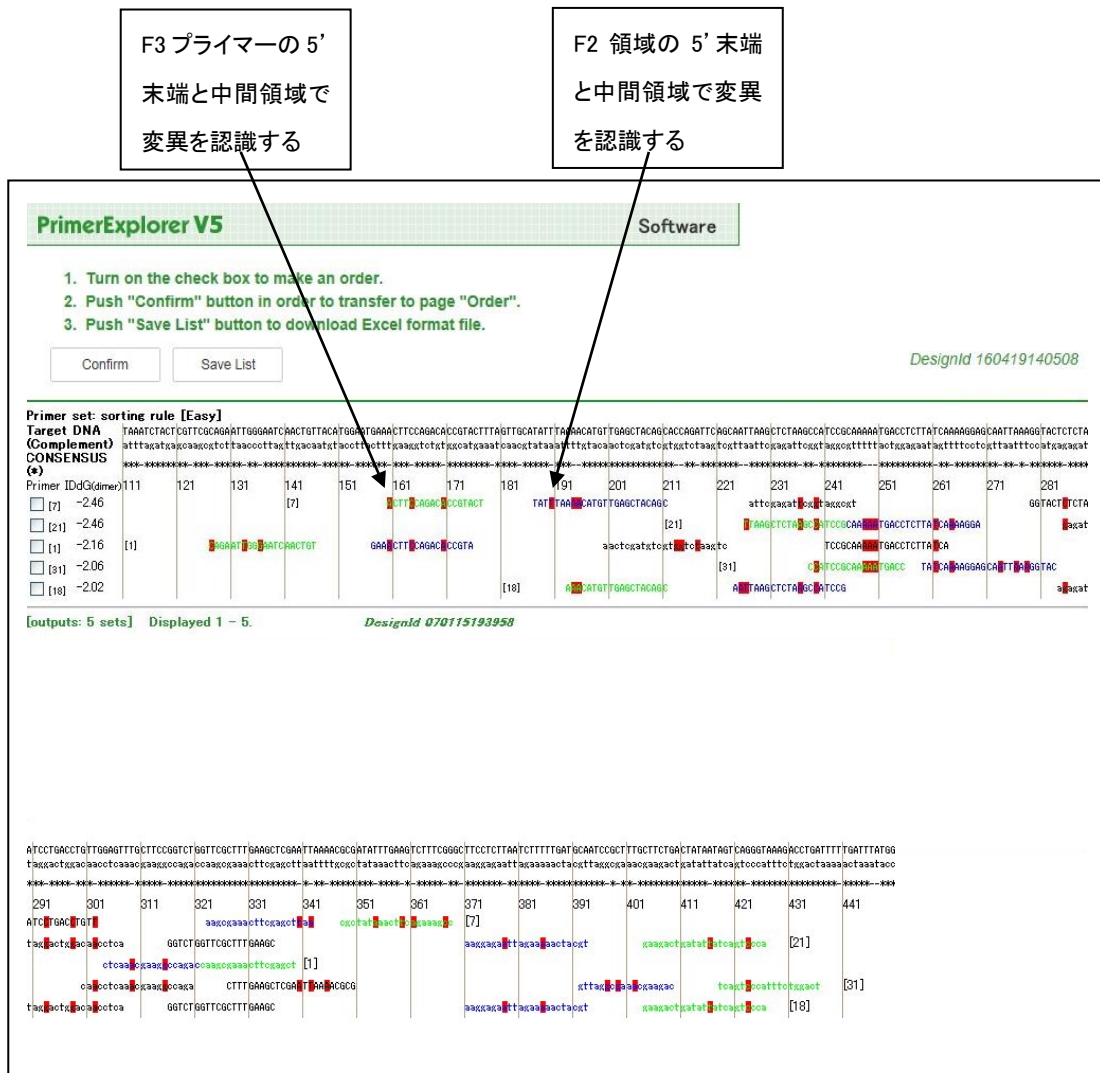


図 8.3 設計結果一覧画面

**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.

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 GAAAG C TCAA TATCGC
FIP			45					TGCGGAT GC TAGAGCTTA-TAT TAA CATGTTGAGCTACAGC
BIP			44					GGTACT TCTAATC TGAC TGT T TCGAGCTTCAAGCGAA
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	T TCGAGCTTCAAGCGAA
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	TAGGCTCTA GC ATCCG
B3	404	426	23	56.19	-5.84	-4.35	0.39	ACC TGACTA TATAGTCAGAG
FIP			48					ACTCC ACA GTCA GATTAGA CA TCGACCTCTTA CA AAGGA
BIP			43					GGTCTGGTTCGCTTTGAGC-TGCATCAA GAGATT GAGGAA
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 GAGGAA
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	TGAGCTTCAAGCGAAC
FIP			42					CTGAA CT T TCGCTGTAGCTCAA-GAA CTT CAGAC CCGTA
BIP			41					TCCGCAAA T GACCTCTTA CA-CAGACC GAGC 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 T TCGCTGTAGCTCAA
B2	304	321	18	57.09	-5.35	-4.01	0.56	CAGACC GAGC AACTC
B1c	241	263	23	60.17	-6.94	-3.15	0.39	TCCGCAAA T GACCTCTTA 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。

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 (4)

Primer ID	Gd(ame)	Gd
[67]	-2.46	
[131]	-1.62	
[37]	-2.16	
[95]	-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

---

Primer Information Save

**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	CCGTA	CTT	AGT	T	CA			
B3	348	368	21	56.71	-5.30	-5.16	0.43	C	GAAAG	C	TCAA	TAT	CGC			
FIP	45															
									TGCGGAT	GC	TAGAGCTTA	TAT	TAA	CA	TGT	TGAGCTACAGC
BIP	43															
									T	A	GGTACT	TCTAATC	TGAC	T	TCGAGCTTCAAAGCGAA	
F2	187	211	25	57.98	-1.98	-4.98	0.32	TAT	TAA	CATGTTGAGCTACAGC						
F1c	227	246	20	60.67	-6.94	-4.32	0.50	TGCGGAT	GC	TAGAGCTTA						
B2	323	340	18	56.33	-5.04	-5.93	0.44	TCGAGCTTCAAAGCGAA								
B1c	275	299	25	60.01	-3.69	-5.25	0.40	T	A	GGTACT	TCTAATC	TGAC	T			

---

Primer Information Save

**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	AAGGAGCA	TT	A	GGT					
B3	446	466	21	55.17	-4.02	-4.13	0.38	CAG	AAACGAGATGACCA								
FIP	45																
									GCGT	TT	A	TCGAGCTTCAAAGC	CT	TCTAATC	TGAC	TGT	G
BIP	46																
									A	G	CTTTC	GG	TTCTCT	AATC	CA	AAATCAGGCTTTACC	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	AAATCAGGCTTTACC								
B1c	358	382	25	62.64	-4.24	-2.75	0.44	A	G	CTTTC	GG	TTCTCT	AATC				

---

Primer Information Save

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

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

F3	113	131	19	55.44	-2.98	-5.26	0.42	A	TCTACTCG	TCG	AGAA						
B3	304	321	18	57.09	-5.35	-4.01	0.56	CAGACC	GAAGC	AACTC							
FIP	46																
									TCGCTG	TAGCTCAACATG	TTA	A	GG	AA	CAACTGT	ACATG	A
BIP	46																
									AG	TT	CAGCA	TAAGCTCTA	GC	GTCA	SATTAGA	AGTACC	T
F2	134	154	21	57.29	-4.85	-4.91	0.43	GG	AA	CAACTGT	ACATG	A					
F1c	189	213	25	60.35	-5.90	-2.09	0.36	TCGCTG	TAGCTCAACATG	TTA	A						
B2	277	297	21	55.25	-5.35	-4.08	0.43	GTC	A	GATTAGA	AGTACC	T					
B1c	214	238	25	60.09	-3.90	-4.42	0.40	AG	TT	CAGCA	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 AATGCTACTA CTATTAGTAG AATTGATGCG ACCITTTTCAG CTCGGCCGCC AAATGAAAT ATAGCTAAGC AGGTTATTC 90
.....
81 CCAITTCGCA AATGTATCTA ATGGTCAAGC TAAATCTACT CGTTCGCGA AITGGGAATC AACTGTITACA TGGATGAAA 160
.....
161 CTTCCAGACA CCGTACTTTA GTTGCATAT TAARCAATGT TGAGCTACAG CACCAGATTC ACCAATTAAG CTCTAAGCCA 240
.....
241 TCGCCAAAAA TGACCTCTTA TCAAAAGGAG CAATTAAGG TACTCTCTAA TCGTACCTTG TTGGAGTTTG CTTCGGTCTC 320
.....
321 CGTTGGCTTT GAGCTGCGA TTAAGCGCG AATTTGAGC TCTTTGGGCG TTGCTCTTAA TCTTTTGTAT CGAATCGGCT 400
.....
401 TTGCTCTGTA CTATAATAGT CAGGTAAGC ACCGTATTTT TGAITTAGG TCATCTCGT TTGTGAAGT GTTAAAGCA 480
.....
481 TTTGAGGGGG ATTCA ..... 495
    
```

Number of Primer Candidates: F1=292, F2=346, F3=429, B1=316, B2=316, B3=355, FIP=652, BIP=593  
982 Primer set(s) were generated.

Set Mutation

Fixed Primer

Design Option  
 Default  
 Common  
 Specific

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

2. Generate  
 982 sets were generated.

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

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

Parameter Condition AT rich

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

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

「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。

The screenshot displays a primer design tool interface. At the top, there are three instructions:
 

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

Below the instructions are two buttons: "Confirm" and "Save List". A design ID "DesignID 160419171519" is visible in the top right.

The main section is titled "Primer set sorting rule (None)". It shows the "Target DNA" sequence:
 

```

    CTATTAGTAGAATTTGATCCCTTTTCAGCTCCGCCCGCCAAATGAAAATATAGCTAACAGCGTTATGACCTTTGGAAATGTACTATGATGAACTTAATCTCTCTCTCTGCGAAATTCAGCTGTACAGTGGAA
    (Complement) GTATTCATCAGTAACCTGAAGCCACCAAGTTCACAGCGCGGCTTACCTTTATCGACTTTTACAGTCAATTTGAGTACCTTGGTATTTGAAGTTCGACCTCCTTTGACATGATTTTCAGTTCG
    CONSENSUS
    )
    
```

Below the sequence, there are three sections of primer lists, each with a "Primer ID" and a "Primer" label, followed by a grid of checkboxes and primer sequences aligned to the target DNA.
 

- Primer ID: G3dmer/11**: Lists primers [1] through [17].
- Primer ID: G3dmer/21**: Lists primers [26] through [44].
- Primer ID: G3dmer/11**: Lists primers [61] through [80].

At the bottom of the interface, it shows "DesignID 080215142229" and "Outputs: 1000 sets | Displayed 1 - 100".

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



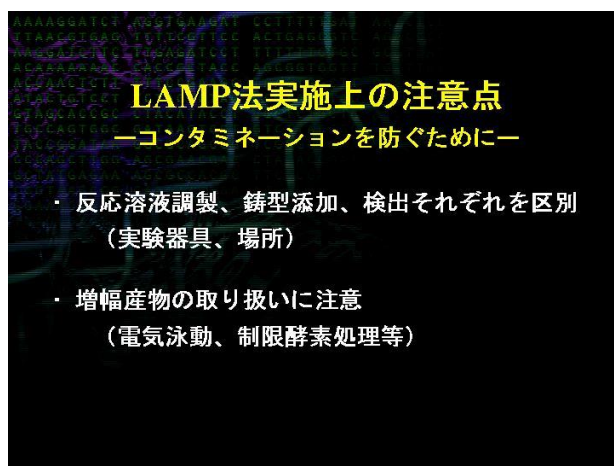
---

---

---

---

---



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ください。

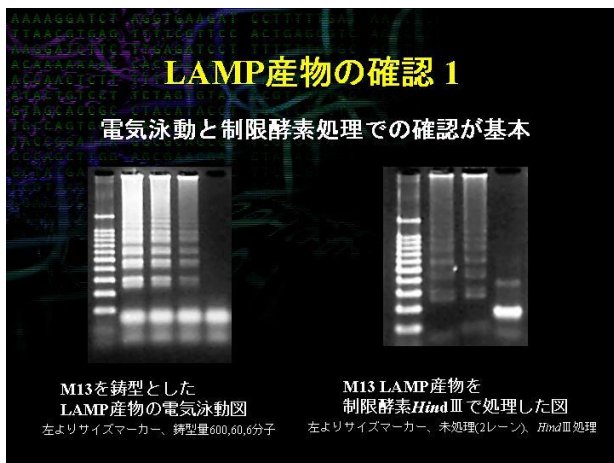
また、増幅産物の取り扱い時が最もコンタミネーションを起こしやすいので、電気泳動や制限酵素で目的の増幅産物を確認する際には十分に注意を払ってください。



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。

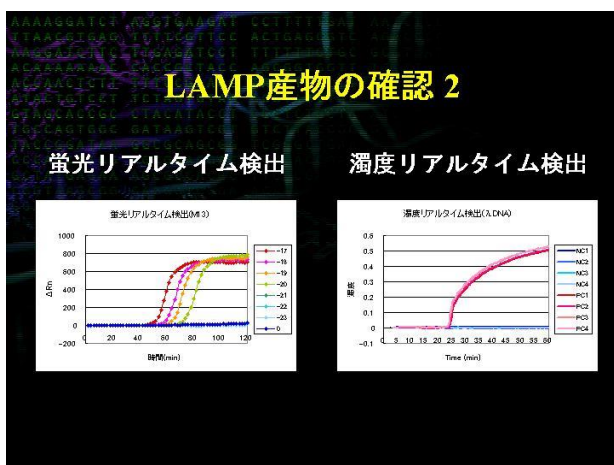
- ・ 酵素量、プライマー量 (特に Inner primer の量)
- ・ 反応温度 (63°Cを推奨していますが、60~65°Cで検討してください)
- ・ Inner primer の精製度 (はじめにプライマーセットをスクリーニングする際は OPC 精製で十分ですが、それ以後の検討では HPLC で精製されたものを使用してください)



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。鋳型量依存的に増幅速度が変化しました。

右側の図は  $\lambda$  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ください。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  $-20^{\circ}\text{C}$  保存、プライマーは原液を  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存してください。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 中で保存してください。特にターゲットの鋳型 DNA については低濃度のも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:

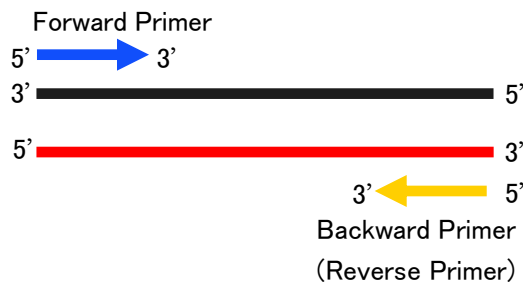
FASTA はデータベース検索により遺伝子やタンパク質の配列の類似性を調べることのできるコンピュータプログラムである。長い配列で類似性を保っているものを検索するのに適している。FASTA 形式は配列解析プログラムで最もよく使われる形式であり、以下のようなフォーマットである。

```
>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。

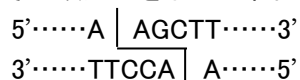
### GenBank 形式:

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。

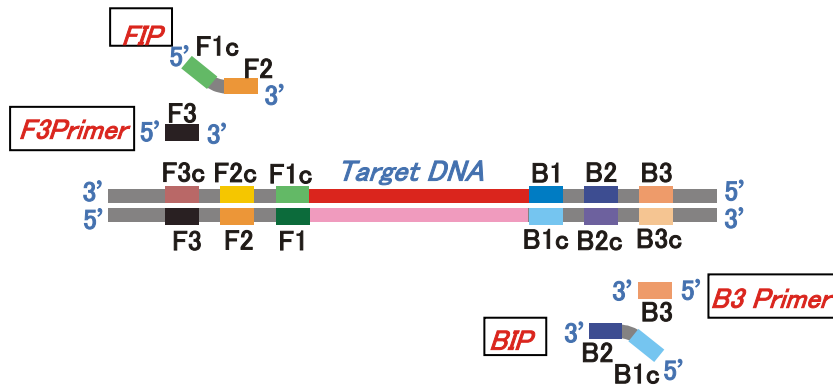
### LAMP 法:

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。

(1)

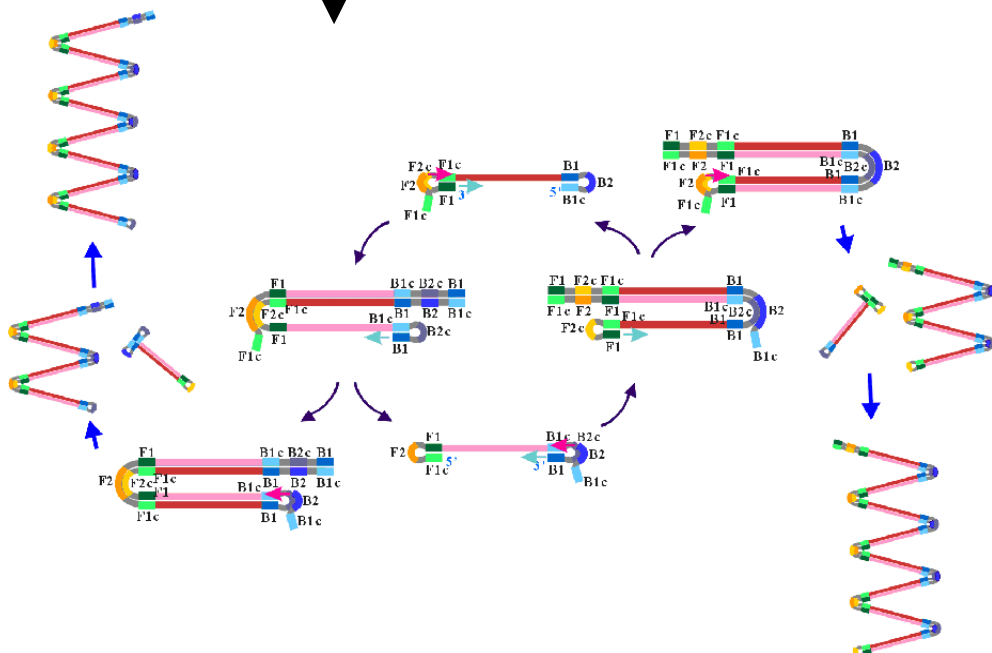


鎖置換型 DNA ポリメラーゼの働きにより 65°C 付近の定温で複数段階の反応が起こる

(2)



(3)



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。

#### 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

$\Delta H$ : エンタルピー(kcal/mol)

$\Delta S$ : エントロピー(eu)

C: オリゴヌクレオチド濃度(M)

[Na<sup>+</sup>]: 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)DNA2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(Mg<sup>2+</sup>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<sub>m</sub> 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<sub>m</sub> 値が高い。プライマーの結合能は一般的に T<sub>m</sub> 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 基のままで存在する。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 ggtttttctt gttgacaaga atcctcacia taccacagag
tctagactcg tgggtggactt ctctcaattt tctaggggga gcacccacgt gtcctggccc
```

#### 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  $\Delta G$ (自由エネルギー変化)を計算し、安定性を見ている。

