



LAMP 法プライマー設計

よくある質問集

栄研化学株式会社
マーケティング推進室

LAMP 法について

Q. PCR では、プライマー、Tm 値等の条件は問題なく、通常なら増幅できると思われるという条件でも、何故か増幅されないということがある。LAMP ではそのようなことはないか？

A. 本ソフトで設計されたプライマーセットで、常に増幅を保証するものではありません。増幅されない場合で、プライマーの設計に問題があると推測される場合、条件を変更して、再設計するか、設計する領域を変更してみてください。

Q. 設計したプライマーで増幅を行った際に、陰性検体で増幅される等、非特異反応が認められた。原因は何か？

A. 原因としては、1)コンタミネーションを起こしている、または2)プライマーダイマーによる増幅が起きている可能性が考えられます。

1)の場合には、次亜塩素酸ナトリウム水溶液による清掃を行い試薬、器具等をすべて新しくすることで改善される可能性があります。

2)の場合には、増幅条件の再検討、またはプライマーの再設計を行う必要があります。

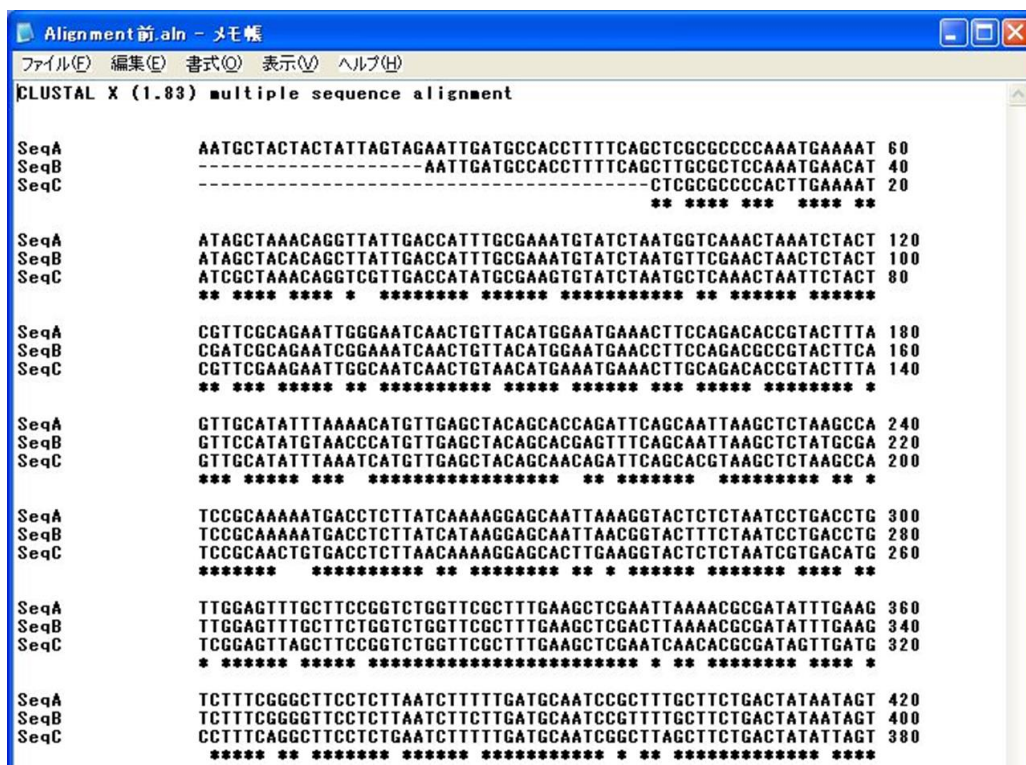
ターゲット配列の表示・選択について

Q. ターゲット配列エリアが表示されません。

A. PrimerExplorer サイト「[PrimerExplorer V5 操作説明](#)」の動作環境を参照してご利用の PC の設定を確認してください。

Q. Target 配列ファイルが読み込まれません。

A. 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。また、アライメント解析ファイルの場合、以下の例のように右端に塩基番号が記載されていないと自動読み込みされませんのでご注意ください。



```
Alignment前.aln - ノート帳
ファイル(F) 編集(E) 書式(O) 表示(V) ヘルプ(H)
CLUSTAL X (1.83) multiple sequence alignment

SeqA      AATGCTACTACTATTAGTAGAATTGATGCCACCTTTTCAGCTCGCGCCCAATGAAAAT 60
SeqB      -----AATTGATGCCACCTTTTCAGCTTGCCTCCAAATGAACAT 40
SeqC      -----CTCGCGCCCACTTGAAAAT 20
          ** **** ** *

SeqA      ATAGCTAAACAGGTTATTGACCATTTGCCAAATGTATCTAATGGTCAAACTAAATCTACT 120
SeqB      ATAGCTACACAGCTTATTGACCATTTGCCAAATGTATCTAATGTTCAAACTAACTACT 100
SeqC      ATCGCTAAACAGGTCGTTGACCATATGCCAAGTGTATCTAATGCTCAAACTAATCTACT 80
          ** **** ** * *****

SeqA      CGTTCGCAGAATTGGGAATCAACTGTTACATGGAATGAACTTCCAGACACCGTACTTTA 180
SeqB      CGATCGCAGAATCGGAAATCAACTGTTACATGGAATGAACTTCCAGACCGCTACTTCA 160
SeqC      CGTTCGAAGAAATGGCAATCAACTGTAAATGAACTTCCAGACACCGTACTTTA 140
          ** ** ***** ** *****

SeqA      GTTGCATATTTAAACATGTTGAGCTACAGCACCAGATTCAGCAATTAAGCTCTAAGCCA 240
SeqB      GTTCCATATGTAACCCATGTTGAGCTACAGCACCAGATTTAGCAATTAAGCTCTAAGCCA 220
SeqC      GTTGCATATTTAAACATGTTGAGCTACAGCAACAGATTCAGCAGCTAAGCTCTAAGCCA 200
          ** **** ** * *****

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

SeqA      TTGGAGTTTGCTTCGGTCTGGTTCGCTTTGAAGCTCGAATTAACCGGATATTTGAAG 360
SeqB      TTGGAGTTTGCTTCGGTCTGGTTCGCTTTGAAGCTCGAATTAACCGGATATTTGAAG 340
SeqC      TCGGAGTTAGCTTCGGTCTGGTTCGCTTTGAAGCTCGAATCAACCGGATATTTGATG 320
          ***** ** *****

SeqA      TCTTTCCGGGCTTCTCTTAATCTTTTGTGCAATCCGCTTTGCTTCTGACTATAAAGT 420
SeqB      TCTTTCCGGGCTTCTCTTAATCTTTTGTGCAATCCGCTTTGCTTCTGACTATAAAGT 400
SeqC      CCTTTCCGGGCTTCTCTTGAATCTTTTGTGCAATCCGCTTCTGACTATAAAGT 380
          ***** ** *****
```

- Q. アライメント解析ファイルについて、塩基番号が記載されているものの読み込まれません。
A. 塩基配列が長い場合、エラーとなることがございます。
そのような際には、以下を参考に【加工前】のファイルを【加工後】ファイルのように編集することで読み込まれることがあります。
- 1.配列情報の削除・・・SeqB、SeqCの列を全て削除する
 - 2.不要情報の削除・・・各列の先頭にある「SeqA」という単語を削除
 - 3.アライメント情報の処理・・・「.(ピリオド)」を「-(ハイフン)」に変換
「(空白)」を「-(ハイフン)」に変換

【加工前】

```
加工前.txt - メモ帳
ファイル(F) 編集(E) 書式(O) 表示(V) ヘルプ(H)
SeqA 1:AATGCTACTACTATTAGTAGAATTGATGCCACCTTTTCAGCTCGCGCCCAATGAAAAAT 60
SeqB 1:-----T.....T.....T.....C... 40
SeqC 1:-----CT..... 20
.....**,**,**,**,**,**,**

SeqA 61:ATAGCTAAACAGGTTATTGACCAATTTGCGAAATGTATCTAATGGTCAAACATAACTACT 120
SeqB 41:.....C...C.....T...G.....C..... 100
SeqC 21:..C.....CG.....A.....G.....C.....T..... 80
.....**,**,**,**,*.....**,**,**,**,**,**,**,**,**,**,**,**,**,**,**

SeqA 121:CGTTCGACAGAAATGGGAATCAACTGTTACATGGAATGAAACTCCAGACCCGACTTTA 180
SeqB 101:..A.....C...A.....C.....G.....T.....G.....C..... 160
SeqC 81:.....A.....C.....A.....A.....G.....G.....A..... 140
.....**,**,**,**,**,*.....**,**,**,**,**,**,**,**,**,**,**,**,**,**,**

SeqA 181:GTTGCATATTTAAACATGTTGAGCTACAGCACCCAGATTAGCAATTAAGCTCTAAGCCA 240
SeqB 161:..C.....G...CC.....G...T.....T.....G..... 220
SeqC 141:.....T.....A.....C.....CG..... 200
.....**,**,**,**,*.....**,**,**,**,**,**,**,**,**,**,**,**,**,**,**

SeqA 241:TCCGCAAAAATGACCTCTTATCAAAAAGGAGCAATTAAGGTAAGTCTCTAATCCTGACCTG 300
SeqB 221:.....C.....T.....C.....T..... 280
SeqC 201:.....CTG.....A.....C.....G.....G.....A..... 260
.....**,**,**,*.....**,**,**,**,**,**,**,**,**,**,**,**,**,**,**

SeqA 301:TTGGAGTTTGGCTTCGGTTCGGTTTCGCTTTGAAAGCTCGAATTAAGGCGGATTTTGAAG 360
SeqB 281:.....T.....C..... 340
SeqC 261:..C.....A.....C.....C...C.....G...T... 320
.....*.....**,**,**,**,*.....**,**,**,**,**,**,**,**,**,**,**,**,**,**,**

SeqA 361:TCTTCGGGCTTCCTCTTAATCTTTTGTGCAATCCGCTTTGCTTCTGACTATAATAGT 420
SeqB 341:.....G.....T..... 400
SeqC 321:C.....A.....G.....G.....A.....T..... 380
.....**,**,**,*.....**,**,**,**,**,**,**,**,**,**,**,**,**,**,**

SeqA 421:CAGGGTAAAGACCTGATTTTGTATTTAGTTCATTCTGTTTCTGAACTGTTTAAAGCA 480
SeqB 401:.....AG.....G.....A..... 460
SeqC 381:..C.....A.....G..... 440
.....**.....**,**,**,**,*.....**,**,**,**,**,**,**,**,**,**,**,**,**,**,**
```

【加工後】

```
加工後.txt - メモ帳
ファイル(F) 編集(E) 書式(O) 表示(V) ヘルプ(H)
1:AATGCTACTACTATTAGTAGAATTGATGCCACCTTTTCAGCTCGCGCCCAATGAAAAAT 60
-----**,**,**,**,**,**,**

61:ATAGCTAAACAGGTTATTGACCAATTTGCGAAATGTATCTAATGGTCAAACATAACTACT 120
**-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*

121:CGTTCGACAGAAATGGGAATCAACTGTTACATGGAATGAAACTCCAGACCCGACTTTA 180
**-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*

181:GTTGCATATTTAAACATGTTGAGCTACAGCACCCAGATTAGCAATTAAGCTCTAAGCCA 240
***-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*

241:TCCGCAAAAATGACCTCTTATCAAAAAGGAGCAATTAAGGTAAGTCTCTAATCCTGACCTG 300
*****--*****-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*

301:TTGGAGTTTGGCTTCGGTTCGGTTTCGCTTTGAAAGCTCGAATTAAGGCGGATTTTGAAG 360
*-*****-*****-*****-*****-*****-*****-*****-*****-*****

361:TCTTCGGGCTTCCTCTTAATCTTTTGTGCAATCCGCTTTGCTTCTGACTATAATAGT 420
-*****-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*

421:CAGGGTAAAGACCTGATTTTGTATTTAGTTCATTCTGTTTCTGAACTGTTTAAAGCA 480
**-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*

481:TTTGAGGGGGATTCA 495
**-*-*-*-*-----
```

- Q. 加工したアライメント解析ファイルでも読み込まれません。
A. 下記のいずれかの理由が考えられます。
- ・塩基配列内に「-(ハイフン)」がある
 - ・塩基配列内にミックス塩基(N、S等)がある
- どちらも該当箇所を A、T、G、C のいずれかの塩基に置き換えることで正しく読み込まれます。

- Q. 遺伝子配列のどこを選択して良いかわかりません。
A. 特に増幅領域に指定がないのであれば、遺伝子配列を3等分し、前半、中程、後半で、それぞれ設計し、1セットずつ選択して試してみるのがいいかと思われます。実験結果から、最も反応性の高いプライマーセット(領域)を絞り込み、この絞り込んだ領域の中からより優れたプライマーセットを選択します。実際に複数のプライマーセット候補で試験をしてみなければ反応性の良し悪しは分かりませんので、実験を行うなかで最も反応性の良いプライマーセットを見つけます。
PCR で使用されている領域は、LAMP プライマーでも反応性の良いプライマーを設計できる場合がありますので、論文等からの情報があれば参考にすることができます。

Q. 表示されたプライマーセットの「ID」は何を意味していますか。

A. プライマーセットの ID は、設計されたプライマーセットの順序に従って割り当てられます。

配列の制限について

Q. 増幅する配列に何か制限はありますか？

A. 塩基組成に極端な偏りがある場合、増幅が困難な場合があります。

Q. 何 base 位まで増やすことができますか？

A. 増幅領域(F2 から B2 まで)の距離として、500base 程度までは増幅可能な場合があります。ただし、増幅領域が長くなると増幅速度が遅くなりますので 120~180base 程度が標準的です。

Q. 認識部位はそれぞれ何 base ぐらいを目安にデザインすれば良いですか？

A. デフォルトの値を参考に設定してください。通常各領域とも 20mer 程度です。

Q. プライマー候補が多すぎる、または少なすぎる。

A. 「[LAMP 法プライマー設計の手引き\(PrimerExplorer V5\)](#)」の 26 ページ以降を参照の上、設計条件を変更してください。

クローニングする場合

Q. 配列既知の cDNA のクローニングする場合に使用できますか？

A. Targeting Range を between F1c-B1c に設定し、クローニングしたい配列を指定すると、F1-B1 内にその配列が入るように設計可能です。但し、増幅長に制限がありますのでご注意ください。

Q. クローニングの際に制限酵素部位を挿入したい。

A. クローニングの際に制限酵素部位を挿入したい場合は、プライマー設計後、F1c と F2 の間、及び B1c-B2 の間に制限酵素配列を挿入します。制限酵素配列挿入により、増幅効率が変わる場合があります。

その他の質問

Q. ループプライマーは設計できますか？

A. ループプライマーの設計機能はバージョン 2 以降で対応しています。

Q. ループプライマーが片方しか生成されません。

A. ループプライマーは必ずしもペアで用意する必要はありません。片方のループプライマーだけでも試してみて効果があれば使うことができます。

Q. SNPs 用のプライマーは設計できますか？

A. 現在のバージョンでは SNPs 用のプライマーの設計はサポートしていません。