

# LAMP 法プライマ - 設計の手引き

(PrimerExplorer Ver. 3)

栄研化学株式会社  
研究開発統括部



# 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 Ver.3 のご紹介

1. LAMP 法プライマ -	3
2. LAMP 法プライマ - 設計のポイント	3
2.1. Tm 値	3
2.2. 各プライマ - 領域の末端安定性	3
2.3 GC 含量	4
2.4 二次構造	4
2.5 プライマ - 間の距離	4
3. プライマ - 設計の手順	4
4. PrimerExplorer での設計	5
4.1 通常法(Ver.2 及び Ver.3 対応)	5
4.2 自動判定(Ver.3 対応)	5
5. プライマー設計の機能	5
5.1 変異部位を考慮した設計(Ver.2 及び Ver.3 対応)	5
5.2 プライマー領域を指定した設計(Ver.2 及び Ver.3 対応)	6
5.3 ループプライマーの設計(Ver.2 及び Ver.3 対応)	6
5.4 ターゲット領域全域にわたるプライマー設計(Ver.3 対応)	6
5.5 末端のチェック(Ver.3 対応)	6
5.6 設計条件の保存(Ver.3 対応)	6

## LAMP 法プライマ - 設計支援ソフトによるプライマ - 設計の実例

1. M13 を鋳型 (Target) としてのプライマ - の設計	7
1.1 Target 配列のアップロード	7
1.2 プライマ - の設計	8
1.3 結果の表示	10
1.4 プライマ - セットの選択	11
2. AT rich 配列でのプライマ - 設計	14
3. 設計条件 (パラメータ) の変更	16
3.1 設計条件の変更と保存	16
3.2 保存した設計条件でのプライマー設計	18
4. プライマー領域を指定した設計	20
4.1 Target 配列上でプライマー領域を指定する	20
4.2 プライマー領域を指定して設計する	21
5. ル - ププライマ - の設計	24
5.1 プライマー情報ファイルのアップロード	24

5.2 ループプライマーを設計する	24
5.3 ループプライマーセットの候補を絞り込む	27
6. 変異部位を考慮したプライマー設計	28
6.1 Target 配列のアップロード	28
6.2 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	28
6.3 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。	31

## プライマー設計の応用例

1. プライマー設計の注意点	37
1.1 生成されるプライマーセット数が多い場合	37
1.2 生成されるプライマ - セット数が少ない場合	37
2. 野生株と変異株に対するプライマー設計	38
2.1 野生株と変異株を共通プライマーで増幅検出する場合	38
2.2 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)	39

## 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 - ションを防ぐために -	42
実験条件	42
LAMP 産物の確認 1	43
LAMP 産物の確認 2	43
試薬の取り扱い	43

用語集	44
-----	----

LAMP 法プライマ - 設計支援ソフトによる

# LAMP 法プライマ - 設計のポイント 及び

PrimerExplorer Ver. 3 のご紹介

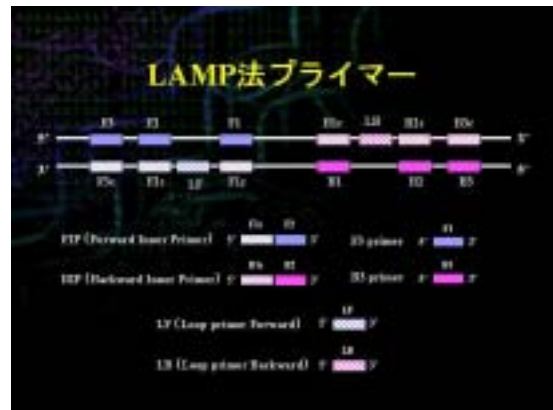


## 1. LAMP 法プライマー

右図の通り、LAMP 法プライマーの設計は Target 配列の 5 側から、F3 領域、F2 領域、F1 領域、B1 領域、B2 領域、B3 領域という 6 つの領域を利用して実施します。

基本的な LAMP 法では 4 種類 (Inner primer 2 種類と Outer primer 2 種類) のプライマーを使います。Inner primer は、F1c と F2、B1c と B2 を連結します。

さらに F1 領域と F2 領域の間の領域に対する相補鎖に Forward 側のループプライマーを設定し、B1 領域と B2 領域の間の領域の相補鎖に Backward 側のループプライマーを設定します。



## 2. LAMP 法プライマー設計のポイント

LAMP 法プライマー設計のポイントは、 $T_m$  値、各プライマー領域の末端安定性、GC 含量、二次構造の 4 つです。

### 2.1. $T_m$ 値

$T_m$  の推算式は Nearest-Neighbor 法が基本になります。この方法は現在最も実測値に近い近似法と言われています。

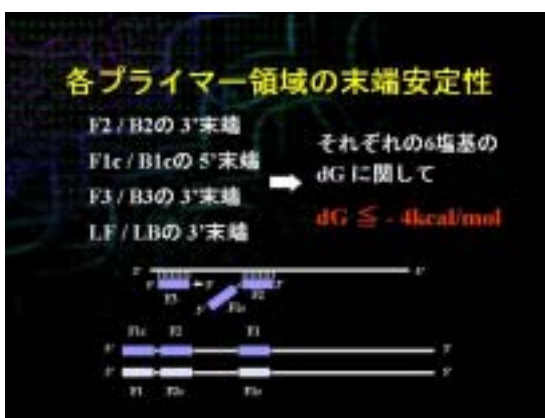
$T_m$  値計算実験条件としては、塩濃度やオリゴ濃度の影響を受けやすいため、一定条件での算出が望ましいとされています (オリゴ濃度を 0.1  $\mu\text{M}$ 、ナトリウムイオン濃度を 50mM、マグネシウムイオン濃度を 4mM)。

なお、各領域の  $T_m$  値は、F1c および B1c 領域で 65 前後 (64 ~ 66)、F2 領域、B2 領域、F3 領域、B3 領域で 60 前後 (59 ~ 61)、ループプライマーは 65 前後 (64 ~ 66) 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。

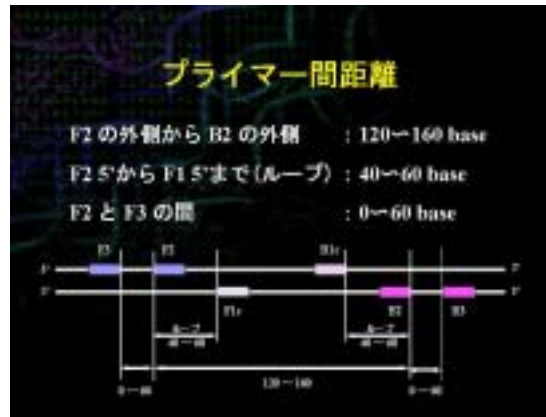
### 2.4 二次構造

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。

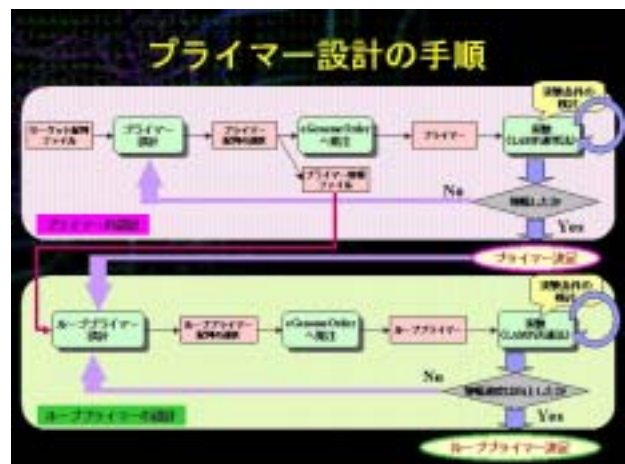
F2 領域の 5'末端から F1 領域の 5'末端まで(ループを形成する部分)は 40 から 60 base になるように設計します。F2 領域と F3 領域の間の距離は 0 から 60 base になるように設計します。



## 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、満足の結果が得られないならば再度設計をやり直します。

つぎにループプライマーを設計したい場合には、決定した LAMP 法プライマーの情報ファイルを用いてループプライマーを設計します。実際に反応を行い、増幅速度が向上したならばループプライマーとして決定します。もし満足の結果が得られないならば再度設計をやり直します。なおループプライマーは LAMP にとって必要不可欠なものではありません。



## 4. PrimerExplorer での設計

現在の Primer Explorer は、2種類のバージョンが存在してあります。2種類のバージョンの持つ機能を以下に示します。

機能 \ バージョン	Primer Explorer Ver.2	Primer Explorer Ver.3
通常法		
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	×	
末端のチェック	×	
設計条件の保存・再利用	×	

\* プライマー領域及びその中の 5'末端、中間、3'領域の位置

次に、個々の機能について、ご紹介します。

### 4.1 通常法 (Ver.2 及び Ver.3 対応)

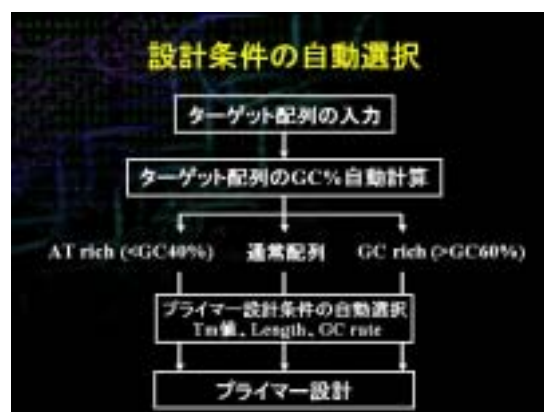
ユーザー自身がプライマー設計条件を入力してプライマーを設計します。デフォルトとして、通常配列(45%<GC<60%)を対象としたプライマー設計条件があらかじめ入力されています。ターゲット配列が AT rich(GC 含量 < 45%)または GC rich 配列(GC 含量 > 60%)の場合には、Tm 値、Length、GC 含量について以下の条件を設定してプライマーを設計します。

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

### 4.2 自動判定 (Ver.3 対応)

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、Tm 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。Ver.2 ではターゲット配列が AT または GC rich の場合にはデフォルトの設計条件では設計が困難な場合があり、Tm 値、Length、GC rate(含量)を入力しなければなりません。



## 5. プライマー設計の機能

### 5.1 変異部位を考慮した設計 (Ver.2 及び Ver.3 対応)

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くれ、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。Ver. 3 では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。

## 5.2 プライマー領域を指定した設計(Ver.2 及び Ver.3 対応)

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。

## 5.3 ループプライマーの設計(Ver.2 及び Ver.3 対応)

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。

## 5.4 ターゲット領域全域にわたるプライマー設計(Ver.3 対応)

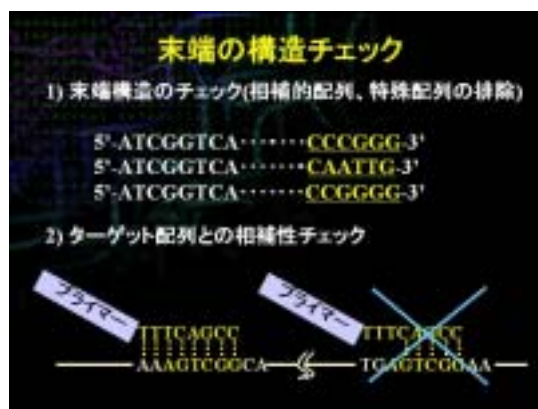
ターゲット領域全域にわたってプライマーが設計されることが可能になりました。まず設計の際に、ターゲット領域全域から FIP-BIP 及び F3、B3 領域が設計されます。次に各々の FIP-BIP 領域に対して、それぞれ一組の F3、B3 領域が選択、組み合わせられプライマーセットが設計されます。FIP-BIP と F3、B3 領域の組み合わせは5'末端から始まり3'末端まで続きます。その後、再び5'末端から始まり3'末端へと設計が進み、一つの FIP-BIP に対して最高で3種類の F3-B3 が組み合わせられます。このため、同じ FIP-BIP 領域をもつプライマーセット数の減り、様々なプラ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



## 5.5 末端のチェック(Ver.3 対応)

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。



## 5.6 設計条件の保存(Ver.3 対応)

Ver.2 では設計条件の保存ができませんでした。そのため、設計ごとにパラメーターを設定しなければなりません。この Ver. 3 では、設計条件の保存及び再読み込みが可能になりました。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るようになりました。

LAMP 法プライマ - 設計支援ソフトによる

## プライマ - 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.3)の初期画面(図1.1)で Target 配列を読み込ませます。

まず、「参照」ボタンをクリックして Target 配列のファイルを選択します。入力する Target 配列の長さは 2kbp 以下に設定します。また、読み込み可能なファイル形式はプレーンテキスト形式(配列のみ)、FASTA 形式、GenBank 形式の 3 種類です。

つぎに、パラメータセット(プライマー設計条件)を以下の 3 つから選択します。

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。

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の“Normal”時のパラメータが示されています。

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 (Ver.3)の初期画面

The screenshot shows the web interface of PrimerExplorer V3. The browser window title is 'PrimerExplorer V3 [3.0.0] for Members - Microsoft Internet Explorer'. The URL is 'https://society.netlaboratory.com/member/bsc/lamp/index.html'. The page content includes a navigation menu on the left, a main header for 'NetLaboratory LAMP Primer Explorer', and a central area with a news section and a form for primer design. Three yellow callout boxes with arrows point to specific elements:

- 1) Target 配列のファイルを選択する (Select the target sequence file)
- 2) パラメータセットを指定する (Specify the parameter set)
- 3) 「プライマー設計」ボタンをクリックする (Click the 'Primer Design' button)

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。

続いて「プライマー設計」ボタンをクリックします。

## 1.2 プライマーの設計

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。

表示されたプライマー設計画面(図1.2)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1.3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。(図1.2)

図1.2 プライマー設計画面

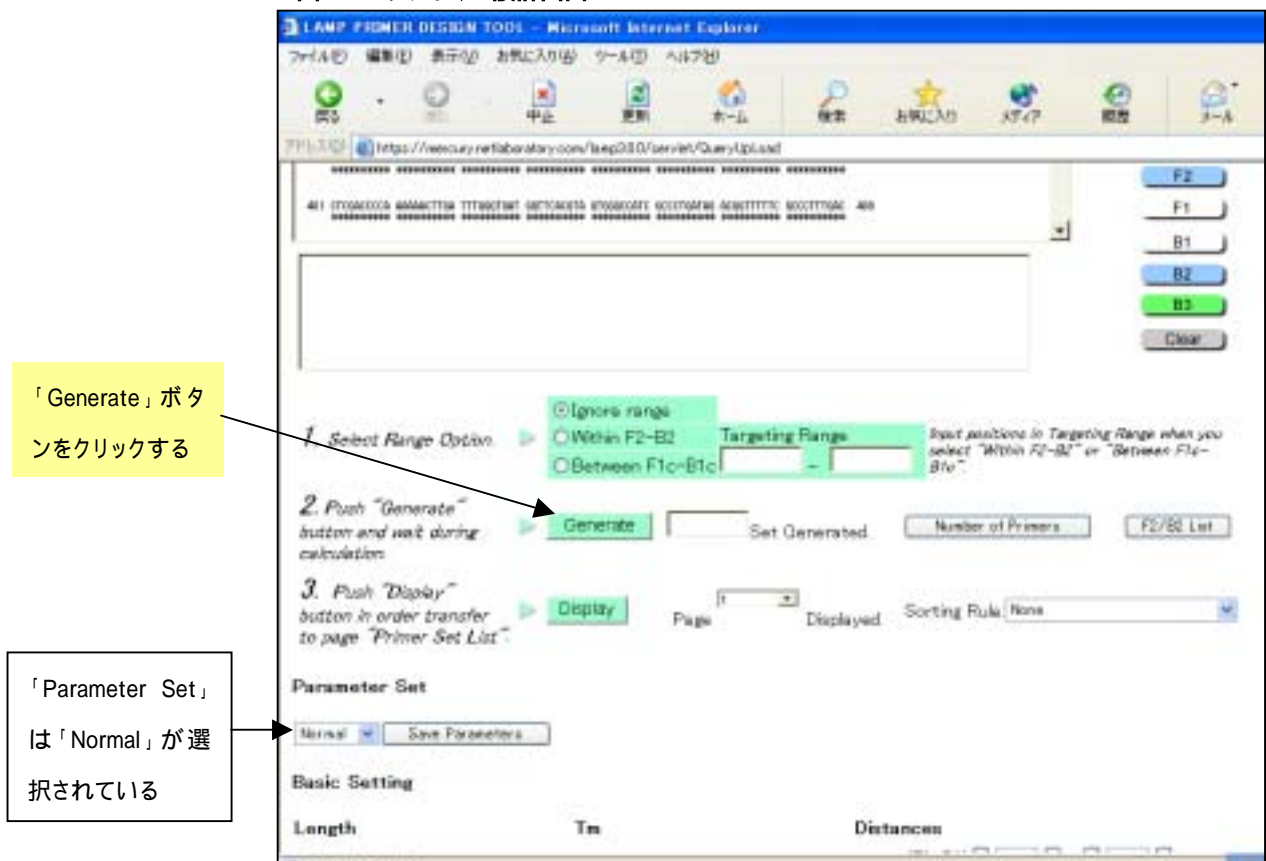


図1.3 Normal のパラメータ条件

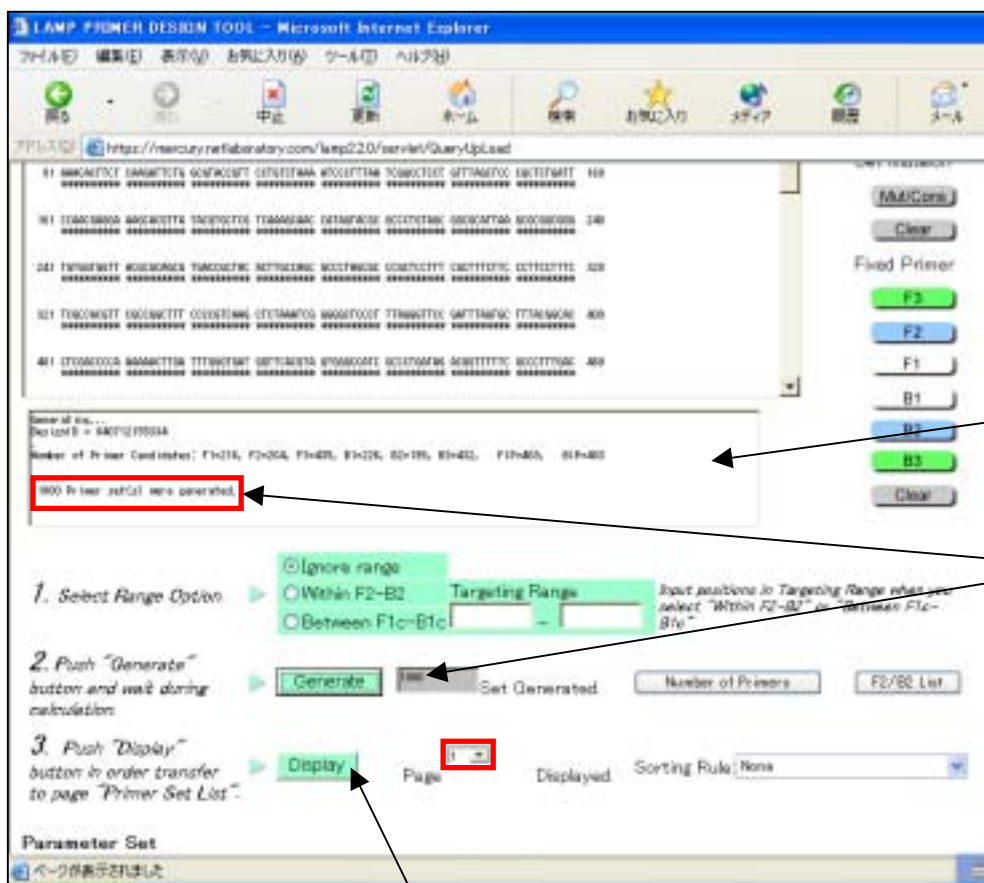
Length		Tm		Distances	
F1c/B1c	20	F1c/B1c	54	(F2-B2)	120
F2/B2	18	F2/B2	59	Loop/F1c-F2	40
F3/B3	18	F3/B3	59	F2-F3	0
				F1c-B1c	0
					100

設計が始まると図1.4のように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。

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。

図1.4 Normal のパラメータ条件で設計後の画面



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

「Display」ボタンをクリックして結果を表示させる

### 1.3 結果の表示

結果の一覧表示画面(図1.5a、5b)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 - 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ダイマ - 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。

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)。(図1.5b参照)

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。

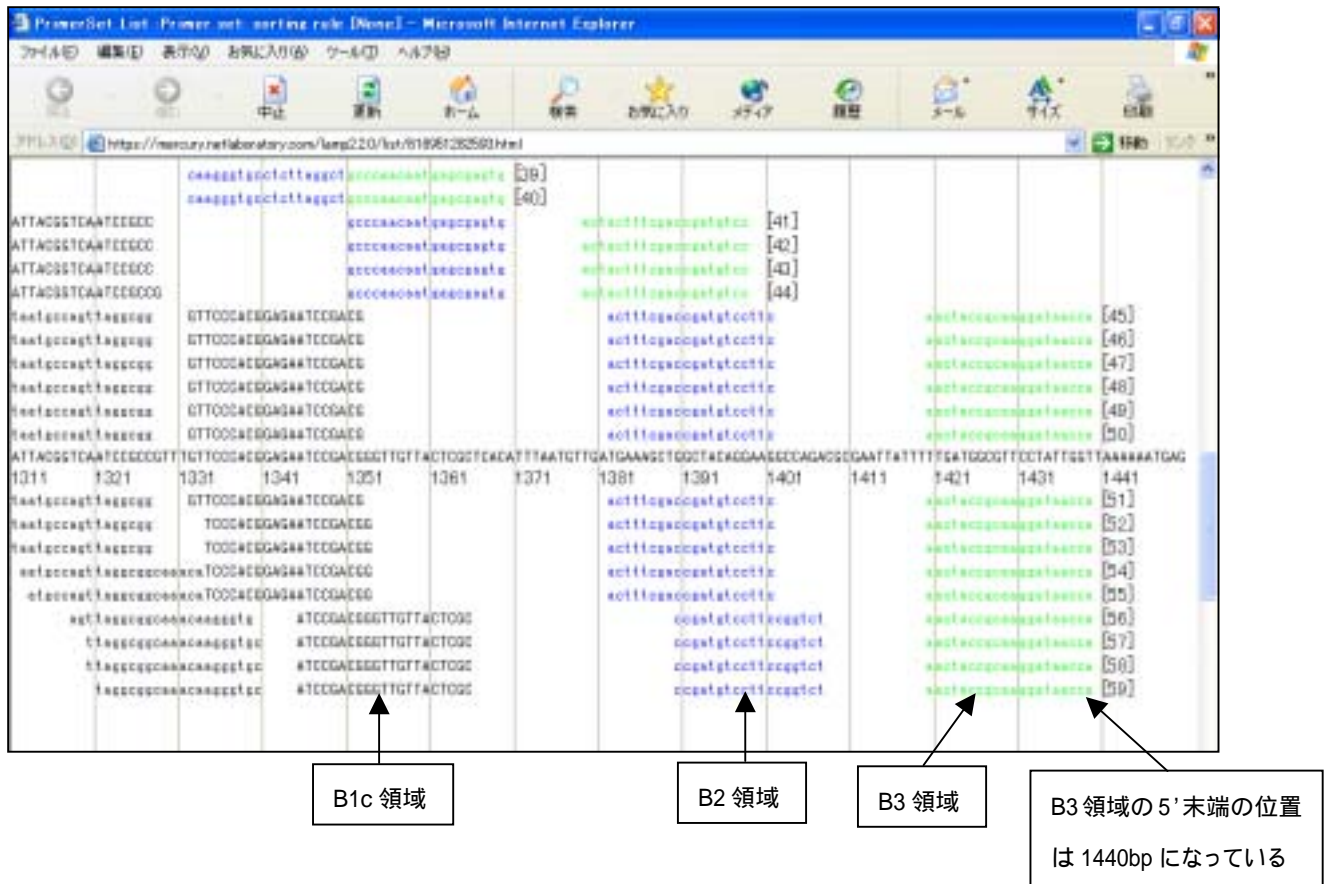
図1.5a 結果の一覧表示画面 - 1 (1ページ目)

The screenshot shows a web browser window displaying a 'PrimerSet List' for 'Primer set: sorting rule: Dbase2'. The table lists primer sets with columns for ID, free energy change, and target regions. Annotations include:

- ID Number:** Points to the 'Primer ID' column.
- 自由エネルギー変化値:** Points to the free energy change values.
- F3領域:** Points to green text in the 'Target DNA' row.
- F2領域:** Points to blue text in the 'Target DNA' row.
- F1c領域:** Points to black text in the 'Target DNA' row.
- 2) Details ボタンをクリックする:** Points to a 'Details' button.
- 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:** Points to a checkbox in the 'Primer ID' column.

Primer ID	Free Energy Change	Target DNA
[1]	-2.38	ATTTGGGTGATGAGAGACTTTTACTCGGTGGGCTEAC
[2]	-2.38	TTTGGGTGATGAGAGACTTTTACTCGGTGGGCTEAC
[3]	-2.36	AGACCCGATGGCAGGACGAGT
[4]	-2.36	AGACCCGATGGCAGGACGAGT
[5]	-2.13	GGGTACTGTTCTTGCT
[6]	-2.13	GGGTACTGTTCTTGCT
[7]	-2.46	
[8]	-2.30	
[9]	-2.46	
[10]	-2.43	
[11]	-2.43	
[12]	-2.43	
[13]	-2.43	
[14]	-2.40	
[15]	-1.93	
[16]	-1.87	

図1.5b 結果の一覧表示画面 - 2 (1 ページ目)



#### 1.4 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プライマーセットを 10~15 種類ほど選択して、詳細情報を比較することにより適当なプライマーを選択します。もしも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。

ここでは「Target配列を増幅するためには、どの領域を使っても構わない」と前提します。

プライマーセットの一覧表示画面(図1.5a)において、出来るだけ全長にわたってプライマーセットを選択します。例としてID Number 1、5、8、9、10、14、15、17、19、32の10種類を選択します。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1.6 プライマー詳細表示画面

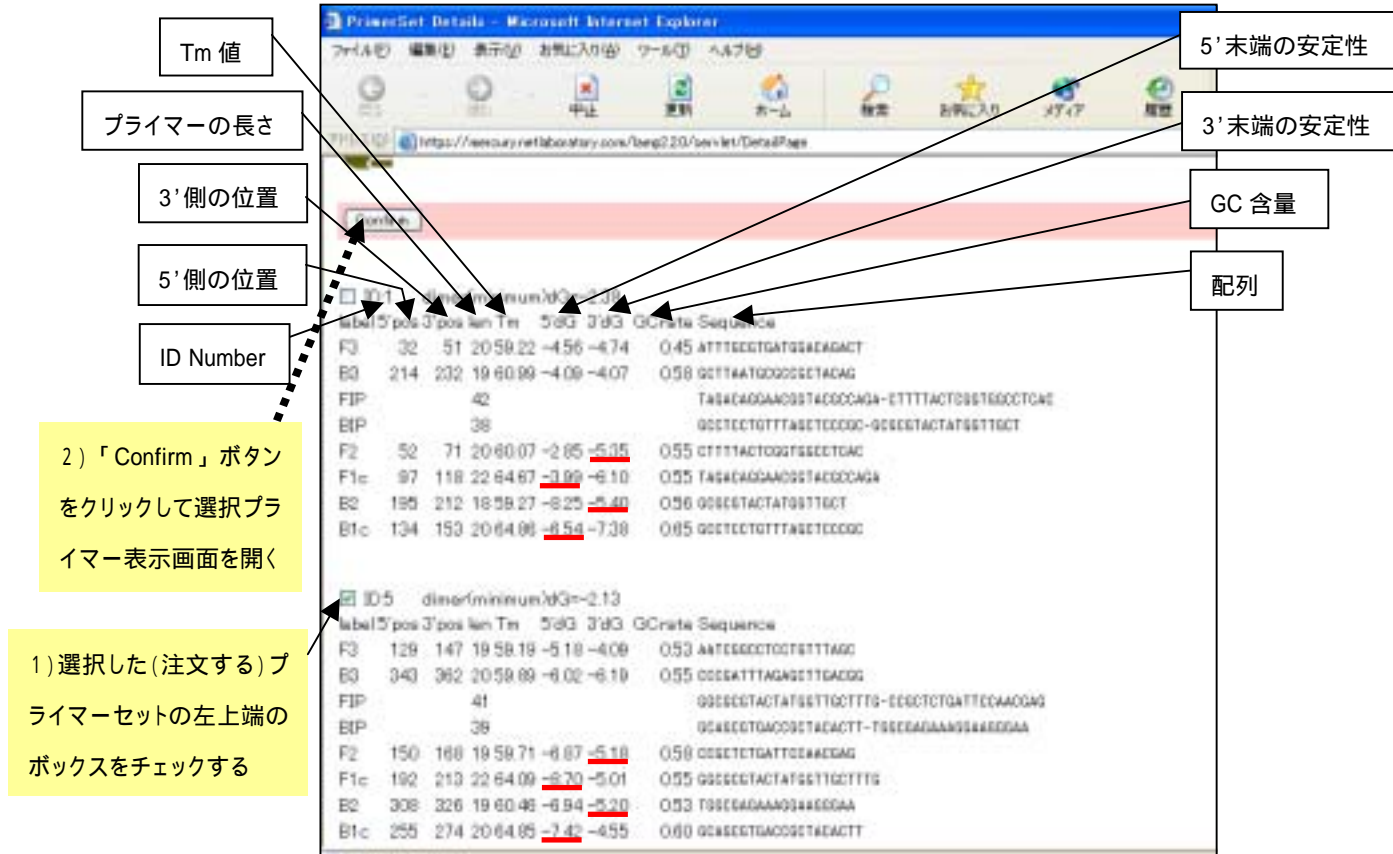


図1.6の画面で各プライマーセットのF2領域の3'末端、F1c領域の5'末端、B2領域の3'末端、B1c領域の5'末端の安定性をチェックします。これらはプライマーが遺伝子増幅を始める際の基点となりますので、末端の安定性が重要になります。具体的には各 G(安定性)が -4.0kcal/mol 以下であるかどうかを調べます。例えば、G = -6.5kcal/mol の末端の方が G = -4.0kcal/mol の末端よりも安定です。

例では、ID Number 1 ではF1cの5'末端の安定性が -3.99 となっており、末端の安定性が不適となるため除きます。残りのセットについてはどれを選んでも構いませんが、出来れば末端の安定性度が高いプライマーセットを選びます。ここではID Number 5, 8, 10, 14, 17 を選択しました。

つぎに、選択したプライマ - を確認する画面に移ります。ID Number 5, 8, 10, 14, 17 のそれぞれのボックスをチェックしてから、「Confirm」ボタンをクリックします。

選択したID Number5, 8, 10, 14, 17 のプライマーの情報が選択プライマー表示画面(図1.7a)に再度表示されます。ここで選択したプライマーの条件を確認します。

ID Number の下に「Primer Information」ボタンがありますが、これは選択したプライマ - セットに対するル - プライマ - を設計する際に使用するものです。ル - プライマ - 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 - 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 - 情報ファイル」を保存してください。(図1.7b参照)

プライマーを発注する画面に進むためには「Order」ボタンをクリックします。(図1.7c参照)

図1.7a 選択プライマー表示画面

- 2) 「Order」ボタンをクリックして注文画面に進む
- 1) ループプライマーを設計する際に使うプライマー情報を保存するために「Primer Information」ボタンをクリックする

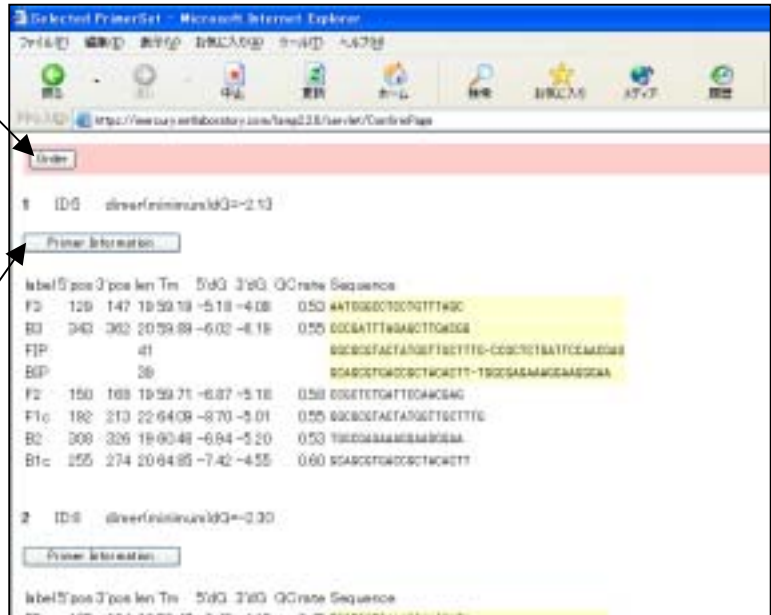


図1.7b プライマー情報の保存画面

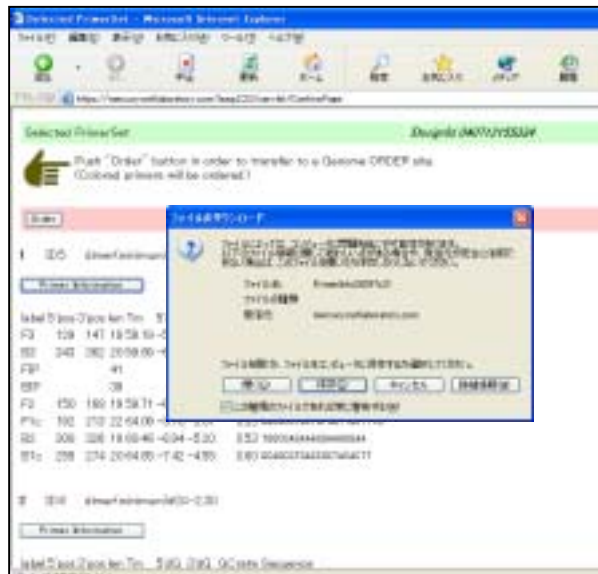


図1.7c ログイン画面(ログイン後、発注画面が表示されます)



## 2 AT rich 配列でのプライマー設計

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

PrimerExplorer (Ver.3) 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)

図2.1 プライマー設計画面

「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	Tm	Distances
F1c/B1c 20	F1c/B1c 80	(F2-B2) 128
F2/B2 16	F2/B2 85	Loop(F1c-F2) 88
F3/B3 18	F3/B3 85	F2-F3 8
		F1c-B1c 8

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)。

つぎに「Generate」ボタンをクリックしてプライマー設計を行います。

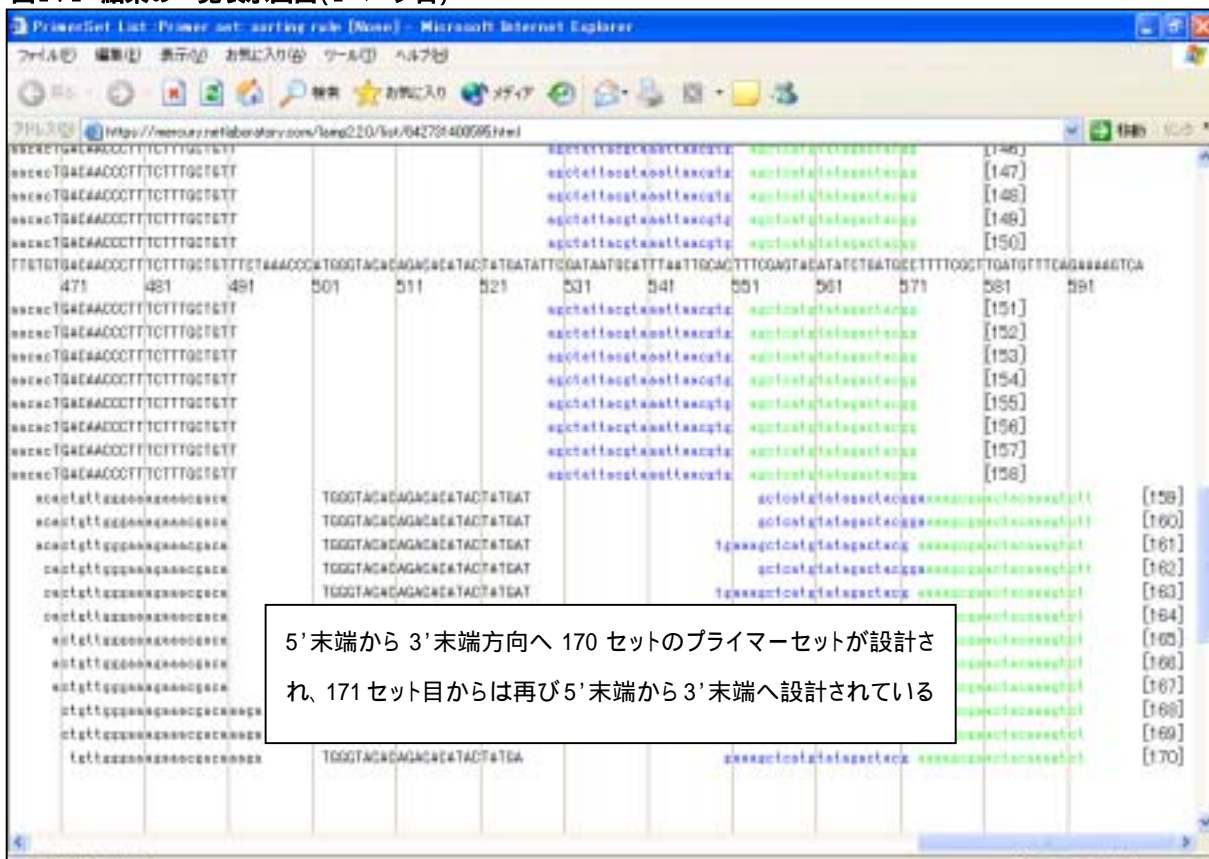
その結果、1,000 候補のプライマーが設計されます。(図は省略します)

続いて「Display」ボタンをクリックして、設計結果を表示させます。

5'末端から3'末端方向へ向かって170セットのプライマーセットが設計され、171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.11~13参照)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 程度異なることを確認します。

図2.2 結果の一覧表示画面(2ページ目)



< 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

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。

#### 3.1 設計条件の変更と保存

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。

図3.1 設計条件の変更(プライマー設計画面)

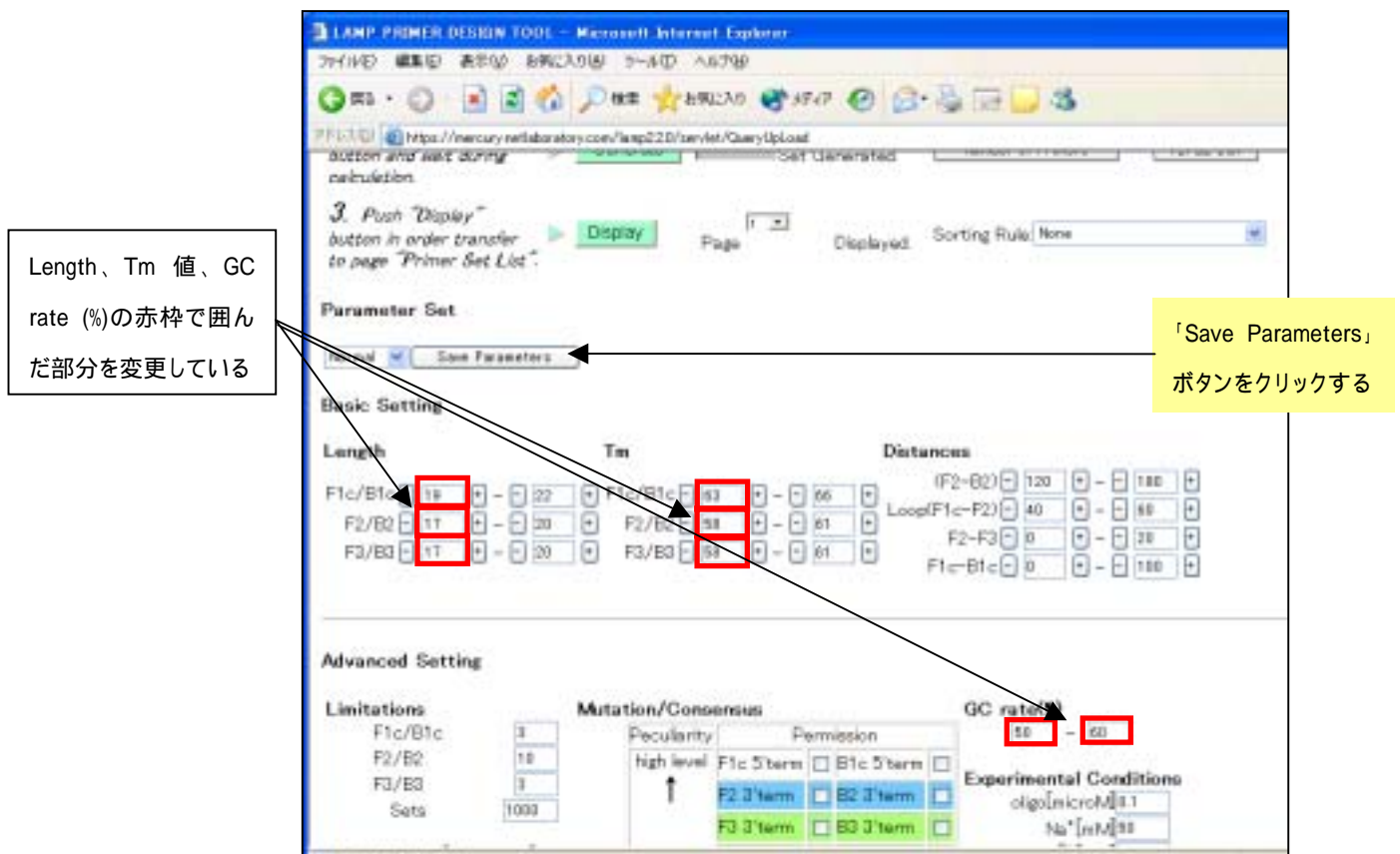
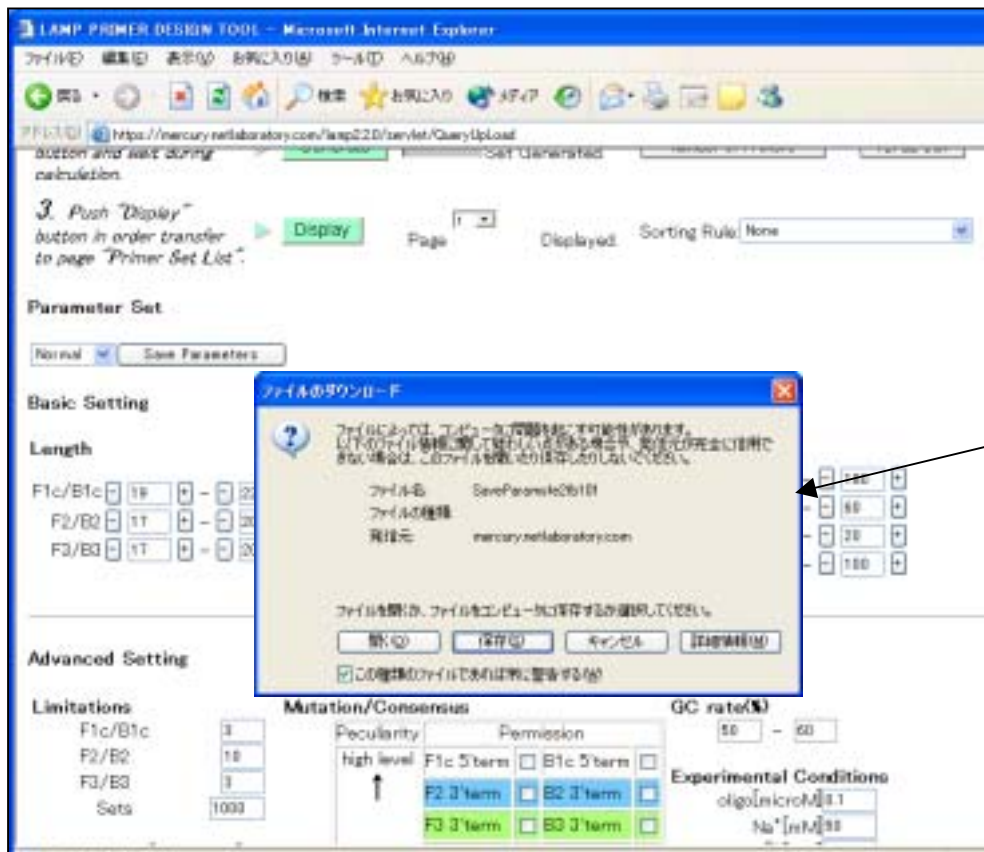


図3.2 設計条件の保存



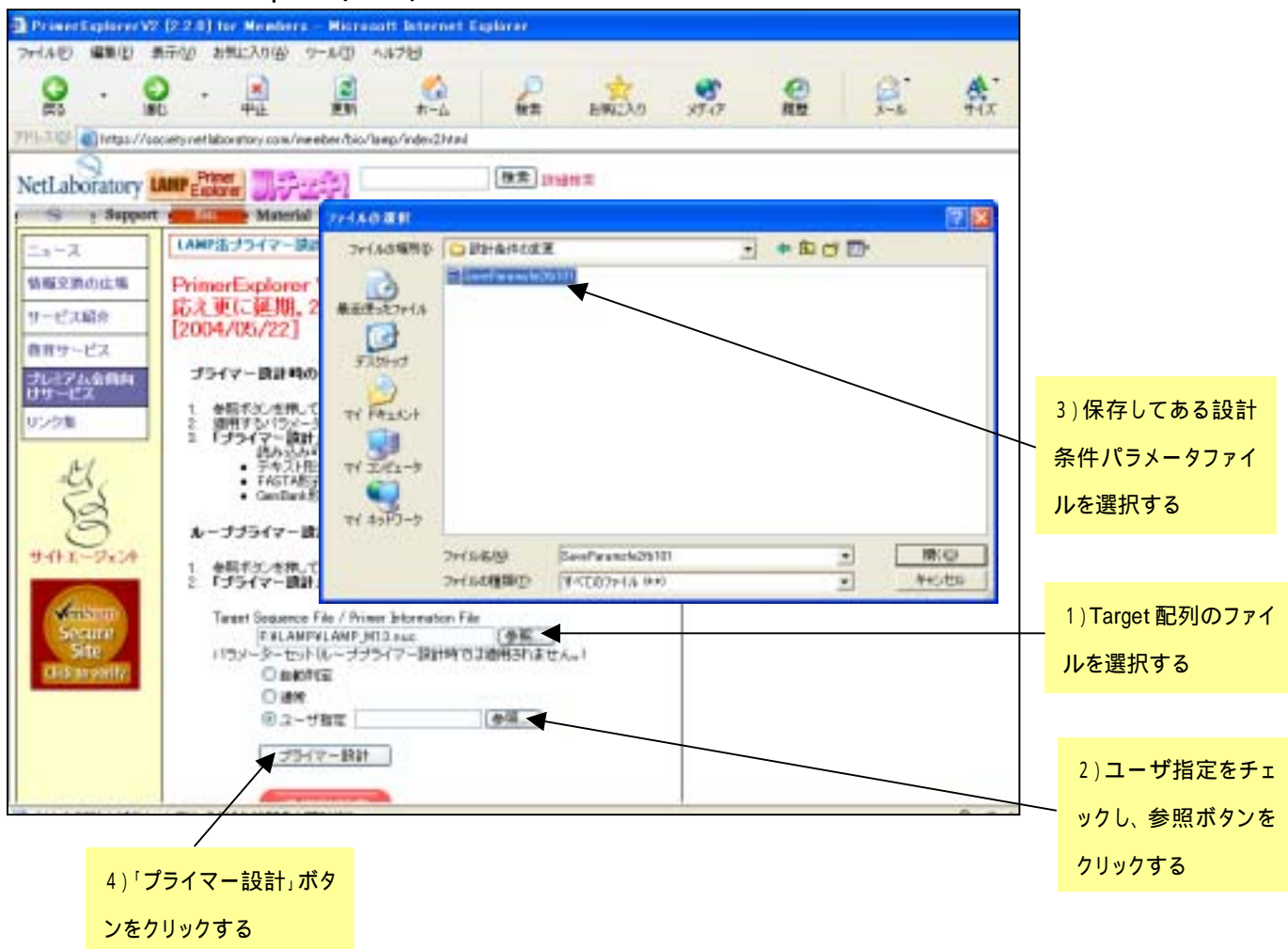
保存場所とファイル名を指定して設計条件を保存する

### 3.2 保存した設計条件でのプライマー設計

PrimerExplorer (Ver.3)の初期画面(図3.3)で、Target配列を入力します。次にパラメータセット欄でユーザ指定をチェックし、参照ボタンをクリックして保存してある設計条件パラメータファイルを選択します。

つぎに「プライマー設計」ボタンをクリックします。

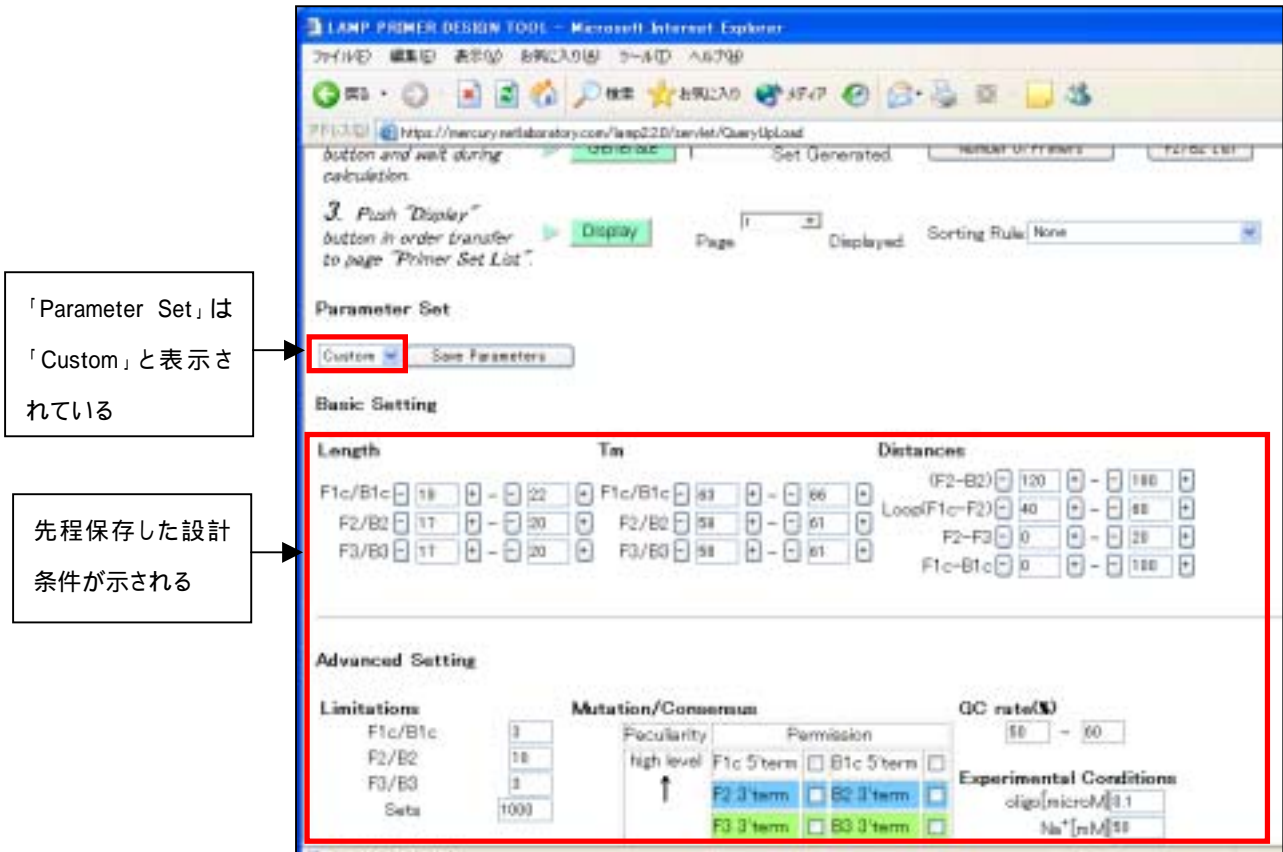
図3.3 PrimerExplorer (Ver.3)の初期画面



表示されたプライマー設計画面(図3.4)では、先程保存した(図3.2)設計条件が示されます。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(p.11~13 参照)でプライマーを設計、選択します。

図3.4 プライマー設計画面

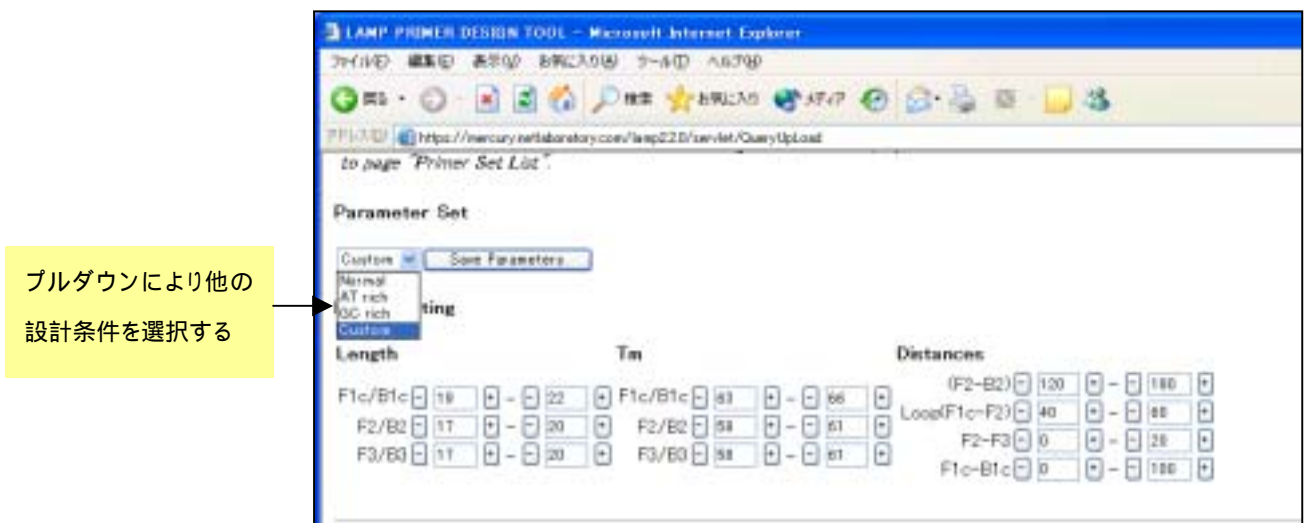


「Parameter Set」は「Custom」と表示されている

先程保存した設計条件が示される

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)

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

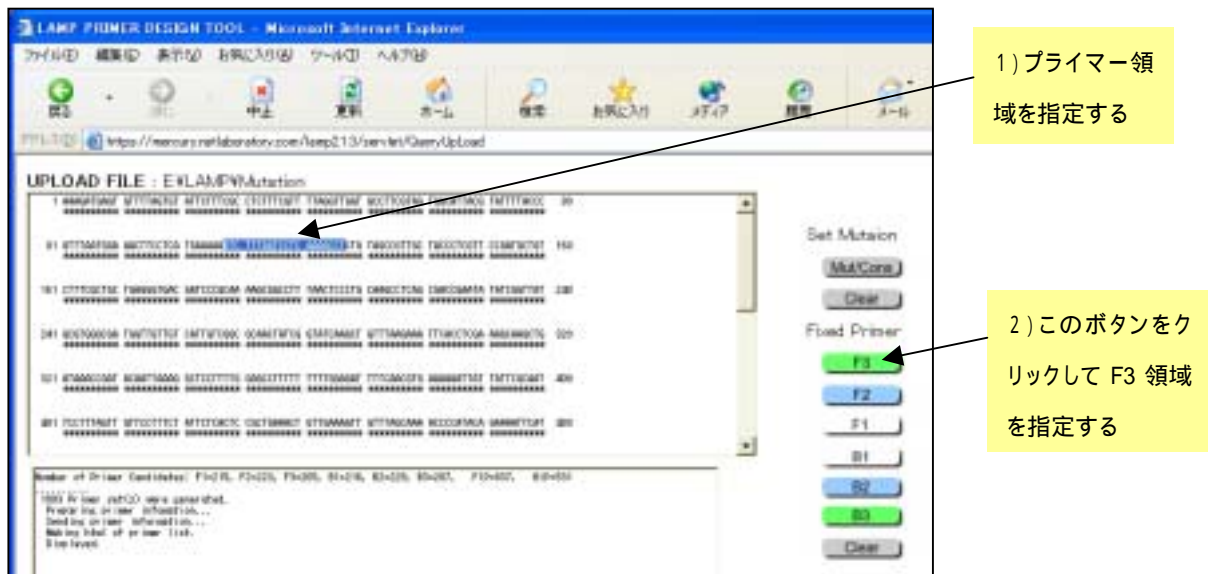
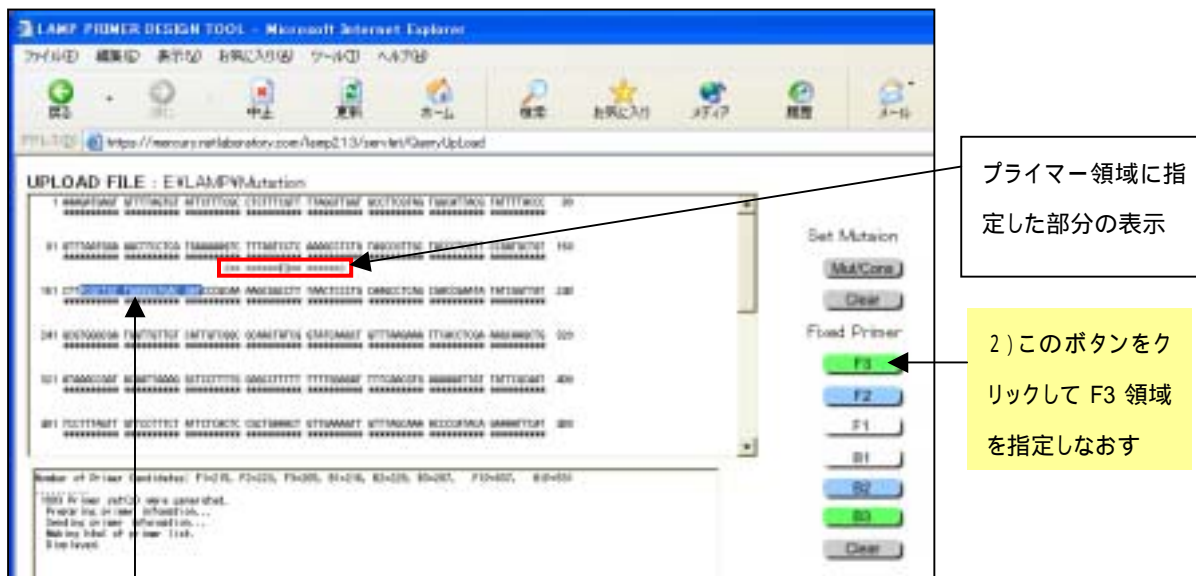


図4.2 プライマー領域指定後の画面

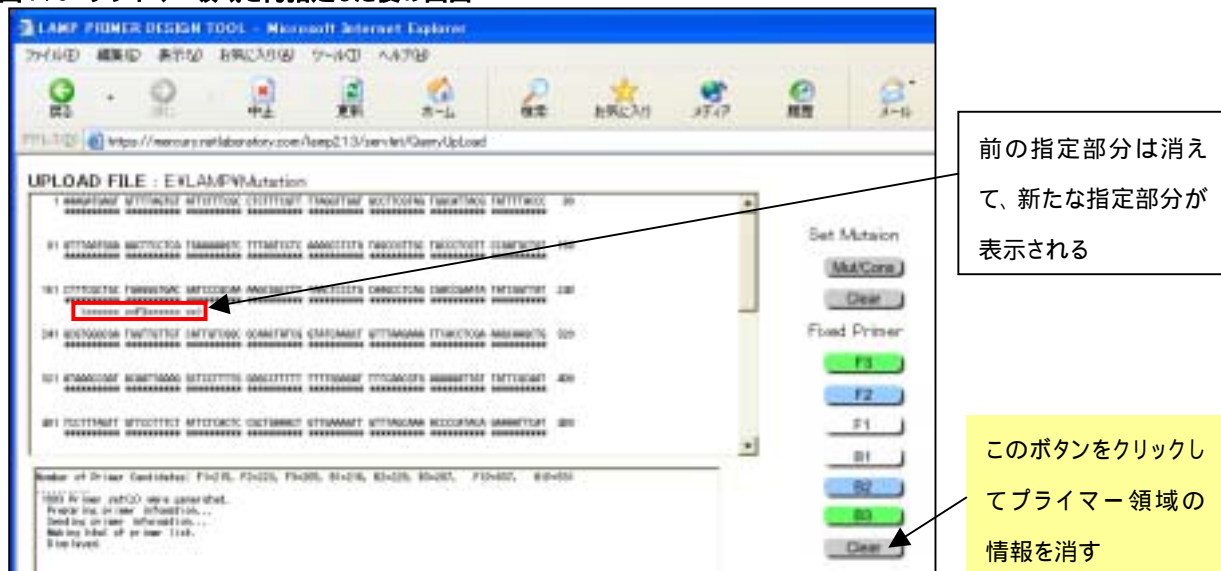


1) 変更する場合は、新たな F3 領域を指定する

もしもF3領域を違う場所に変更する場合は、図4.2のように新たな場所を指定して再度「F3」ボタンをクリックします。そうすると図4.3のように新たな場所がF3指定領域として表示されます。

このようにして領域の変更も可能です。また、このプライマー領域の情報をすべて消したい場合は「Clear」ボタンをクリックして消去します。

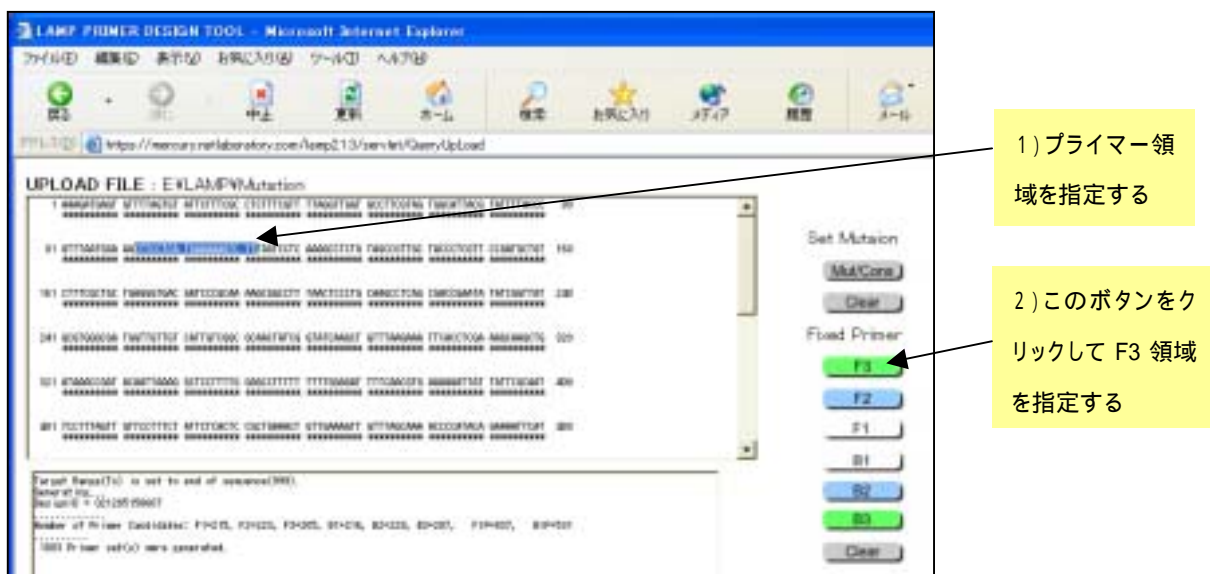
図4.3 プライマー領域を再指定した後の画面



#### 4.2 プライマー領域を指定して設計する

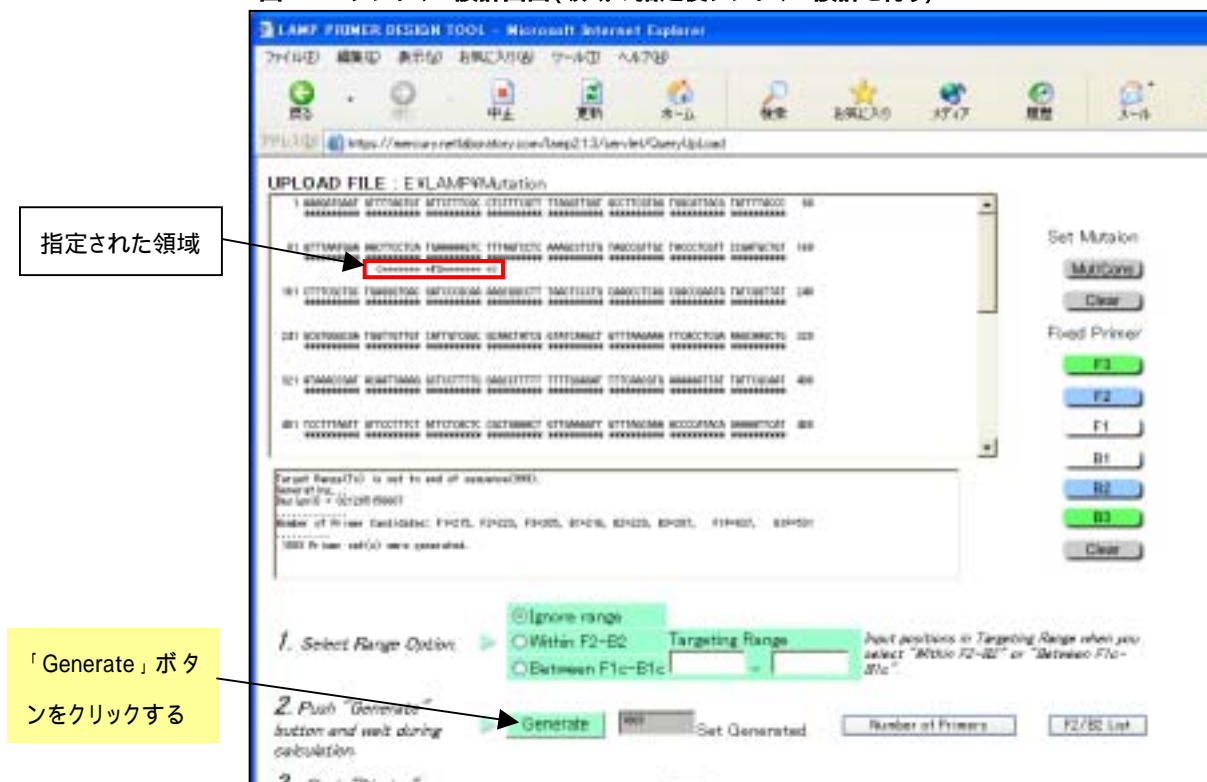
それでは、実際にプライマー領域を指定してプライマー設計を行います。今回は図4.4のようにF3領域を指定してプライマーを設計します。

図4.4 プライマー設計画面



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。(図4.4、4.5参照)

図4.5 プライマー設計画面(領域の指定後プライマー設計を行う)



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4.6参照)

図4.6 プライマー設計画面(プライマー設計後)

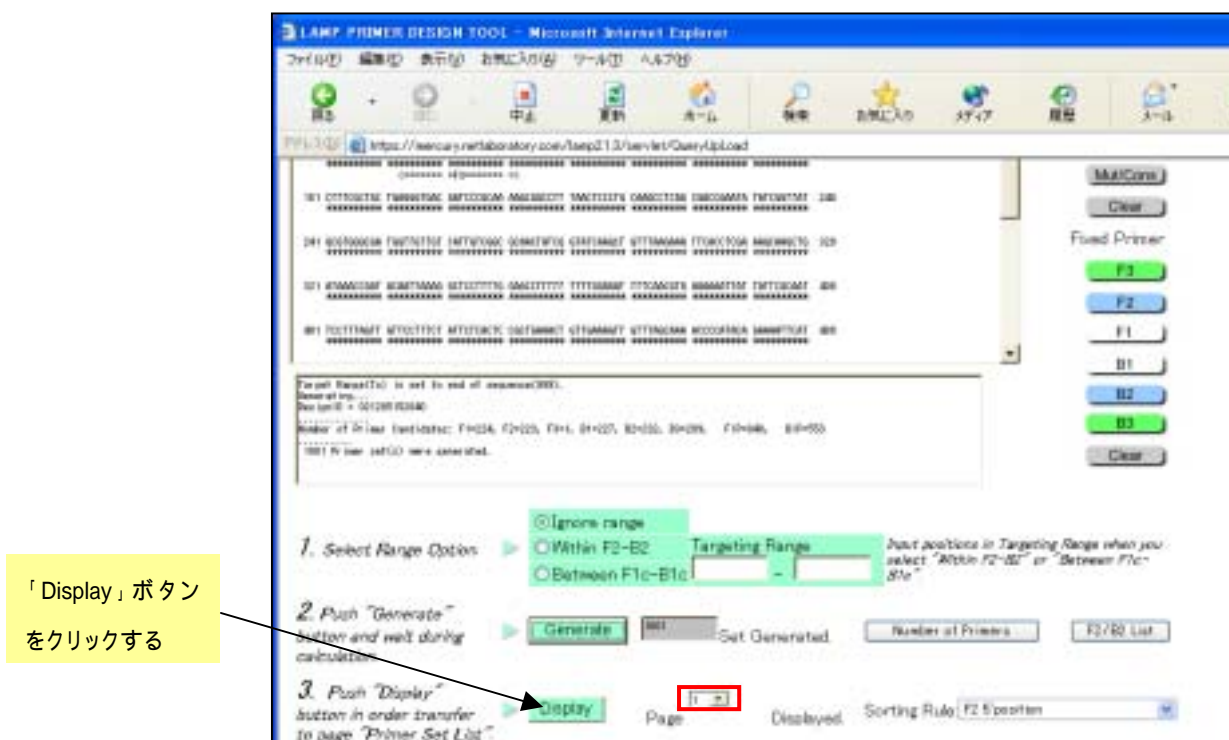
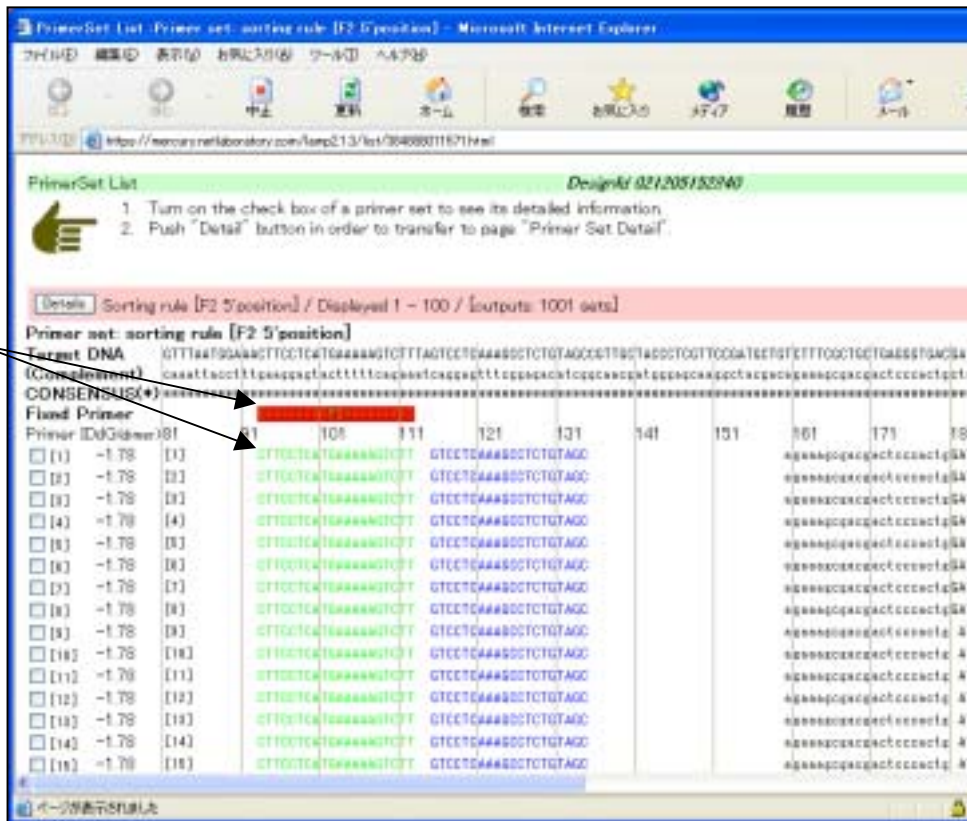


図4.7の一覧表示画面で緑の大文字で示されている部分がF3領域ですが、先程指定した部分と一致しています。F3領域を指定したプライマーセットが設計できました。

図4.7 結果の一覧表示画面(1ページ目)



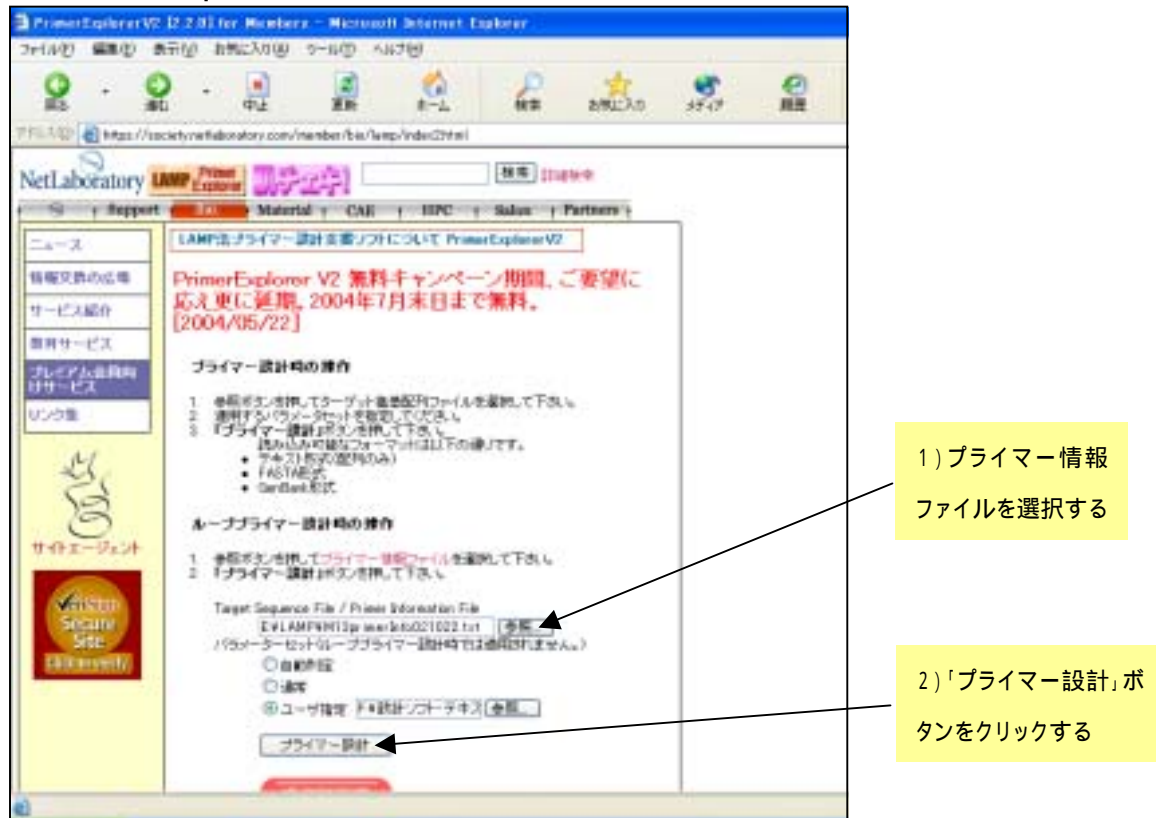
このようにして設計したものの中から、第1章と同様の方法(p11~13 参照)でプライマーセットを選択します。

## 5 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 (Ver.3) 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)

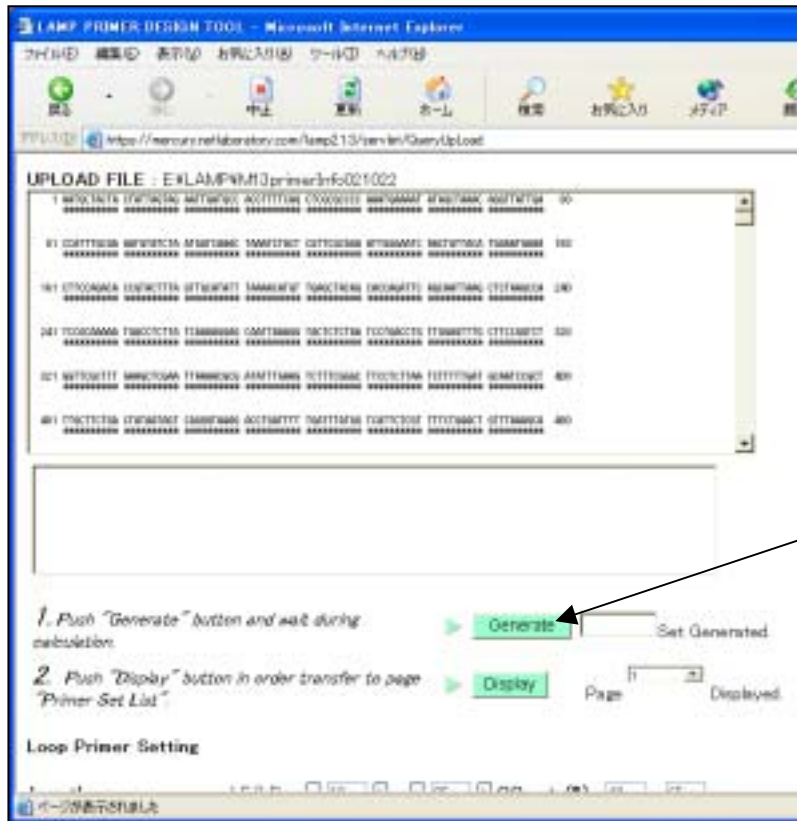
図5.1 PrimerExplorer (Ver.3) の初期画面



### 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。

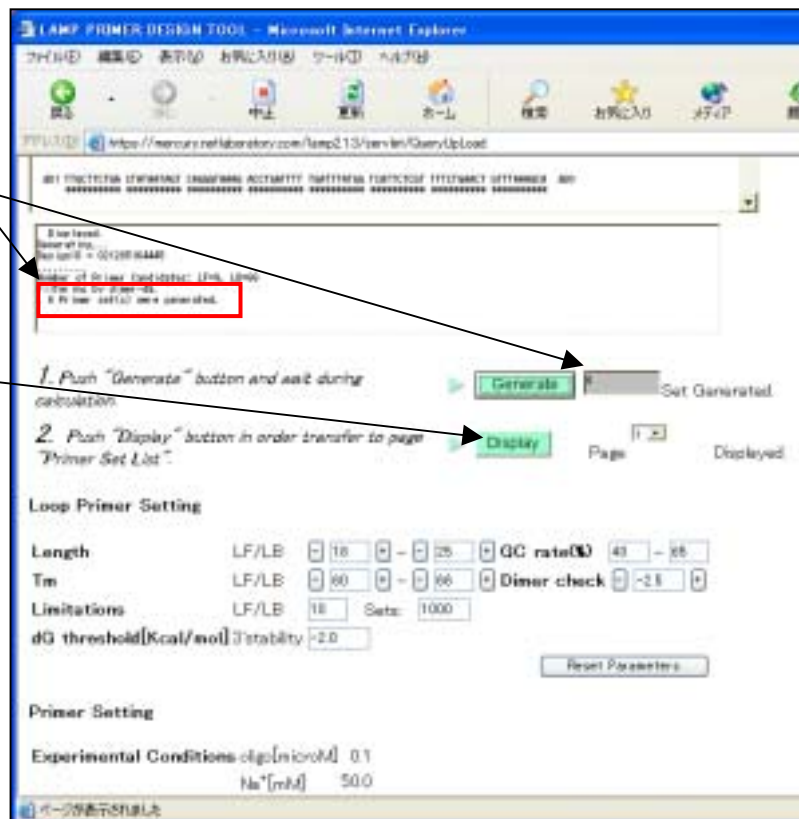
図5.2 ループプライマー設計画面



パラメータは変更しないで「Generate」ボタンをクリックする

全部で6セットのプライマーが生成されますので、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 (図5.3参照)

図5.3 ループプライマー設計画面(設計後)



全部で6セットのプライマーが生成された

「Display」ボタンをクリックして結果を一覧表示させる



### 5.3 ループプライマーセットの候補を絞り込む

プライマー詳細表示画面(図5.5)に、先程選択した6つの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。

図5.5 プライマー詳細表示画面

2) 「Confirm」ボタンをクリックして選択プライマー表示画面に進む

1) ID 1 のボックスをチェックする

同じ配列

同じ配列

ID	Label	pos	3'pos	len	Tm	5'3'	3'3'	GCrate	Sequence
ID1	dimer/inisun/dG-218	1357	1376	20	62.54	-5.70	-4.74	0.50	CEETCAGC#SCGAA#SACG
ID2	dimer/inisun/dG-218	1357	1376	20	62.54	-5.70	-4.74	0.50	CEETCAGC#SCGAA#SACG
ID3	dimer/inisun/dG-218	1357	1376	20	62.54	-5.70	-4.74	0.50	CEETCAGC#SCGAA#SACG
ID4	dimer/inisun/dG-198	1358	1376	19	61.63	-5.70	-4.41	0.50	CEETCAGC#SCGAA#SACG
ID5	dimer/inisun/dG-198	1358	1376	19	61.63	-5.70	-4.41	0.50	CEETCAGC#SCGAA#SACG
ID6	dimer/inisun/dG-198	1358	1376	19	61.63	-5.70	-4.41	0.50	CEETCAGC#SCGAA#SACG

まず、Forward側のループプライマーについて詳しく見てみると、ID Number1、2、3が同じもの、ID Number4、5、6が同じものになっています。前半(1から3)の代表としてID Number1のループプライマーの3'末端の安定性を見てみると、-4.74となっています。後半(4から6)の代表としてID Number4のループプライマーの3'末端の安定性は-4.41となっていますので、前半の3の方がより安定性が良いことがわかります。そこで前半の3の中からさらに絞り込みを行います。

ID Number1、2、3についてBackward側の3'末端の安定性を見ます。ID Number1が-4.46、ID Number2が-4.06、ID Number3が-4.07で、ID Number1のループプライマーセットが最も安定です。この6つのループプライマーセットからID Number1のセットを選択します。

ID Number1のプライマーのところのボックスをチェックしてから「Confirm」ボタンをクリックします。

続いて、表示されたプライマー詳細情報を確認した後にOrder画面に進んで注文をします。

## 6 変異部位を考慮したプライマー設計

### 6.1 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 (Ver.3)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.7 参照)で Target 配列ファイルを選択し、続いて「プライマ - 設計ボタン」をクリックします。(図は省略します)

### 6.2 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 - 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 - 設計画面(図6.1)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6.2のように変異の指定をした位置のスタ - (\*)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6.1 プライマ - 設計画面

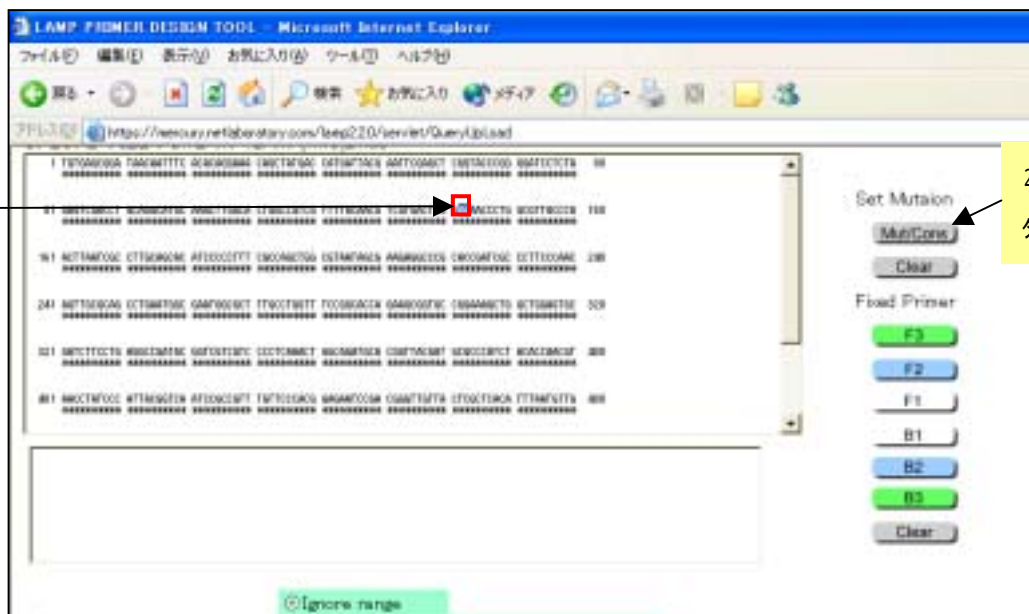
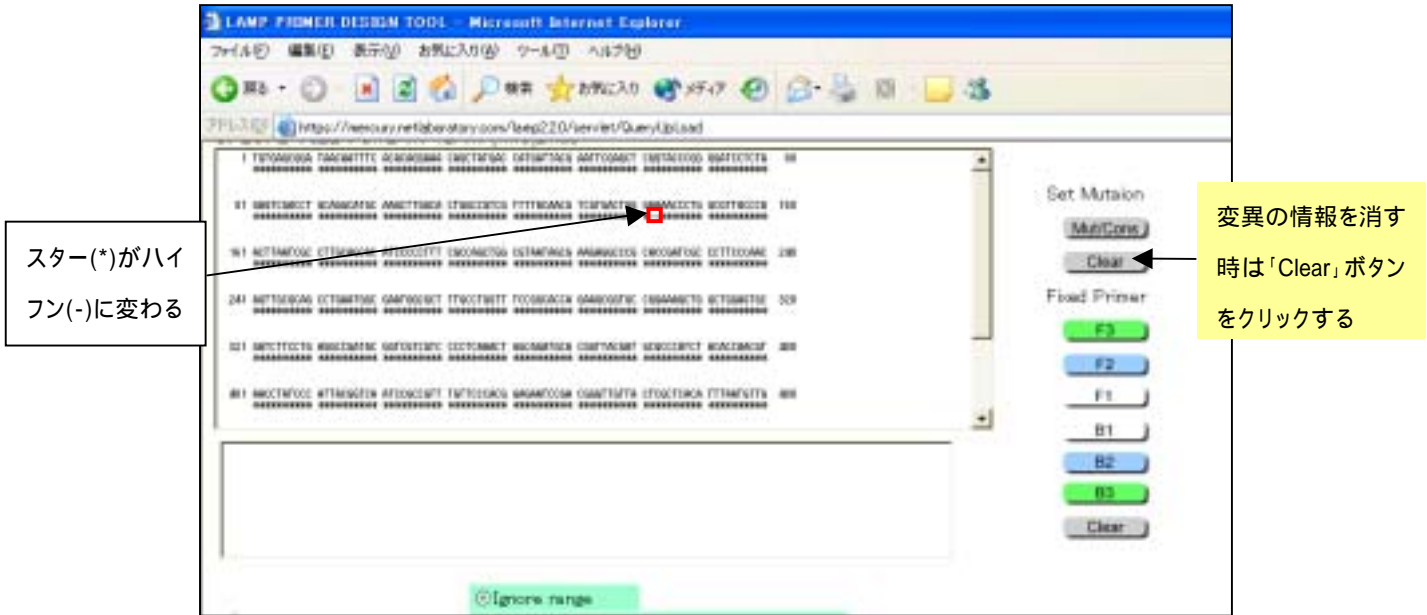
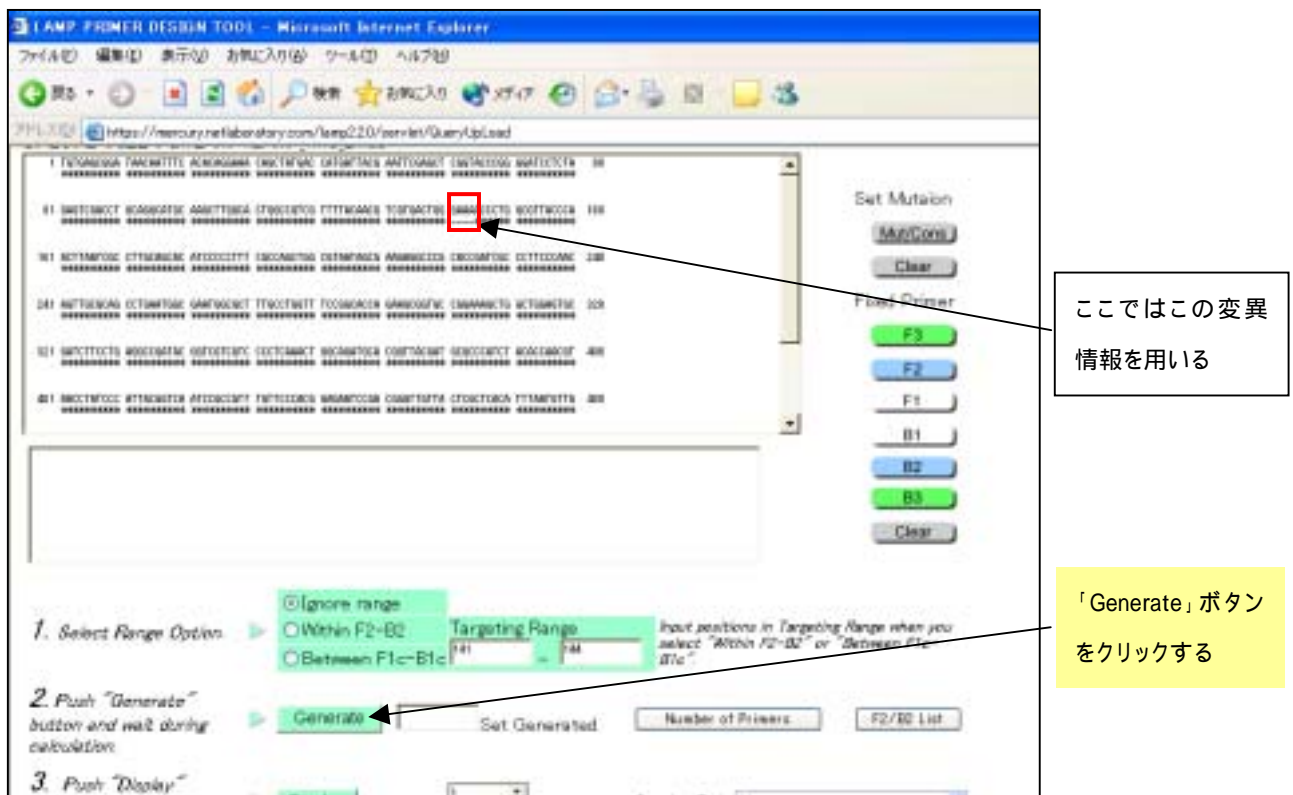


図6.2 変異部位を入力した後の画面



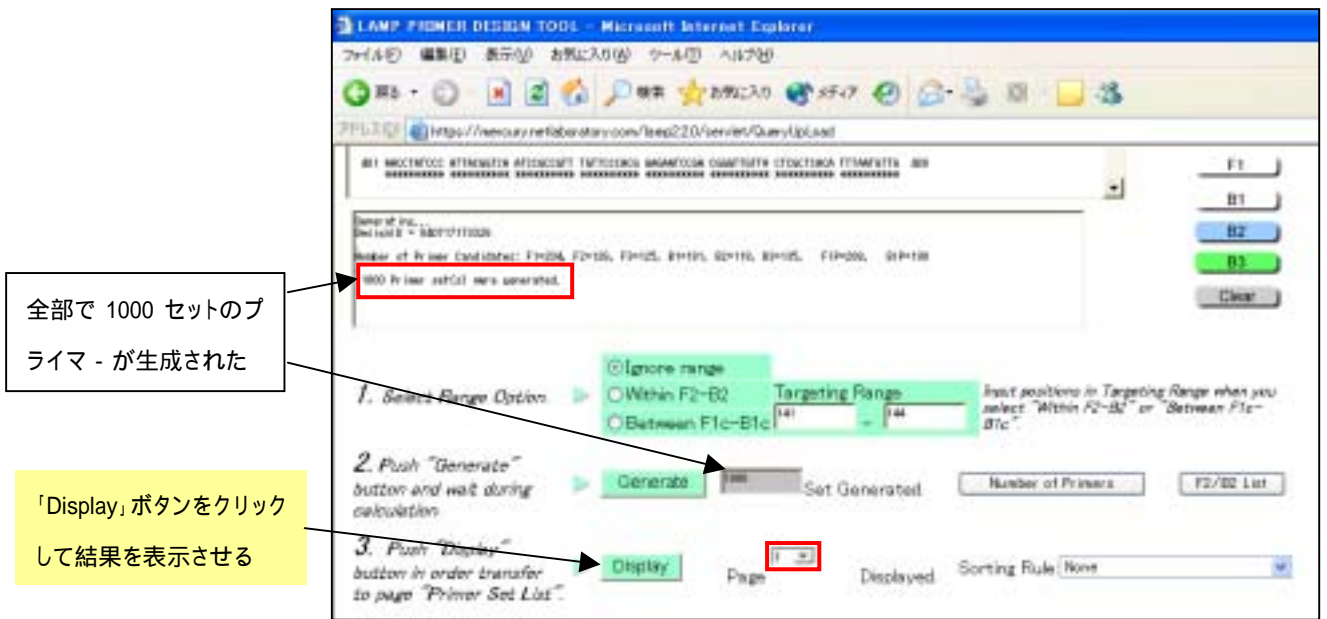
続いてもう一度(今度は別の)変異部位を指定します。ここでは変異部位を再入力した変異情報(図6.3参照)をもとにプライマ - 設計を行います。これにより、変異を避けるようにプライマーセットが設計されます。

図6.3 再度変異部位を入力した後の画面



全部で 1000 セットのプライマ - が設計されました。(図6.4参照)

図6.4 設計後の画面



全部で 1000 セットのプライマ - が生成された

「Display」ボタンをクリックして結果を表示させる

次に「Display」ボタンをクリックして結果を表示させます。図6.5に示すように、プライマ - 領域に変異が全く含まれないプライマ - が設計されます。

< 参考 >  
 変異を導入した場合のプライマ - 設計の順序は、まず初めに F1、F2、F3、B1、B2、B3 の各プライマ - 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 - 領域候補を除き、残ったプライマ - 領域を組み合わせることでプライマ - セットを設計しています。

図6.5 結果の一覧表示画面(1ペ - ジ目)

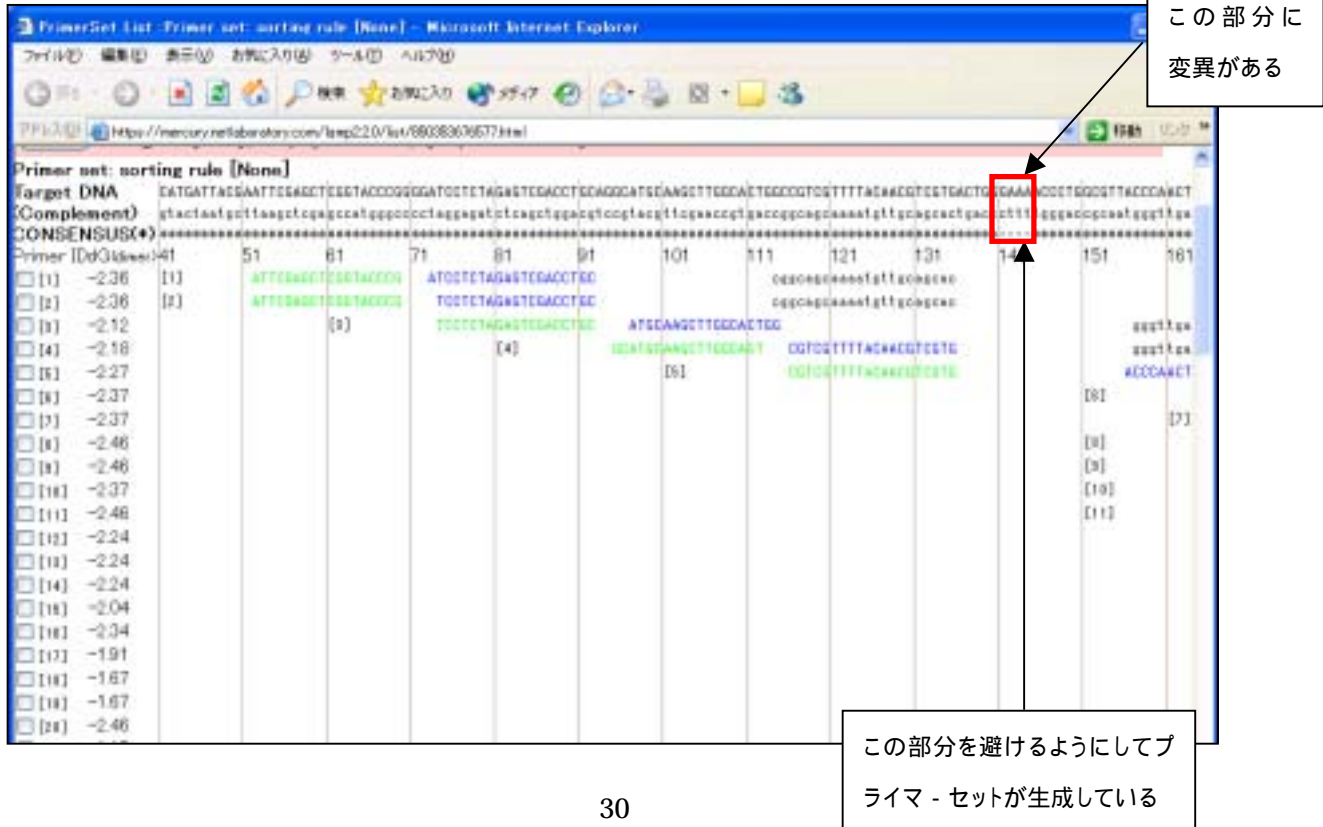




図6.7 プライマ - 設計画面

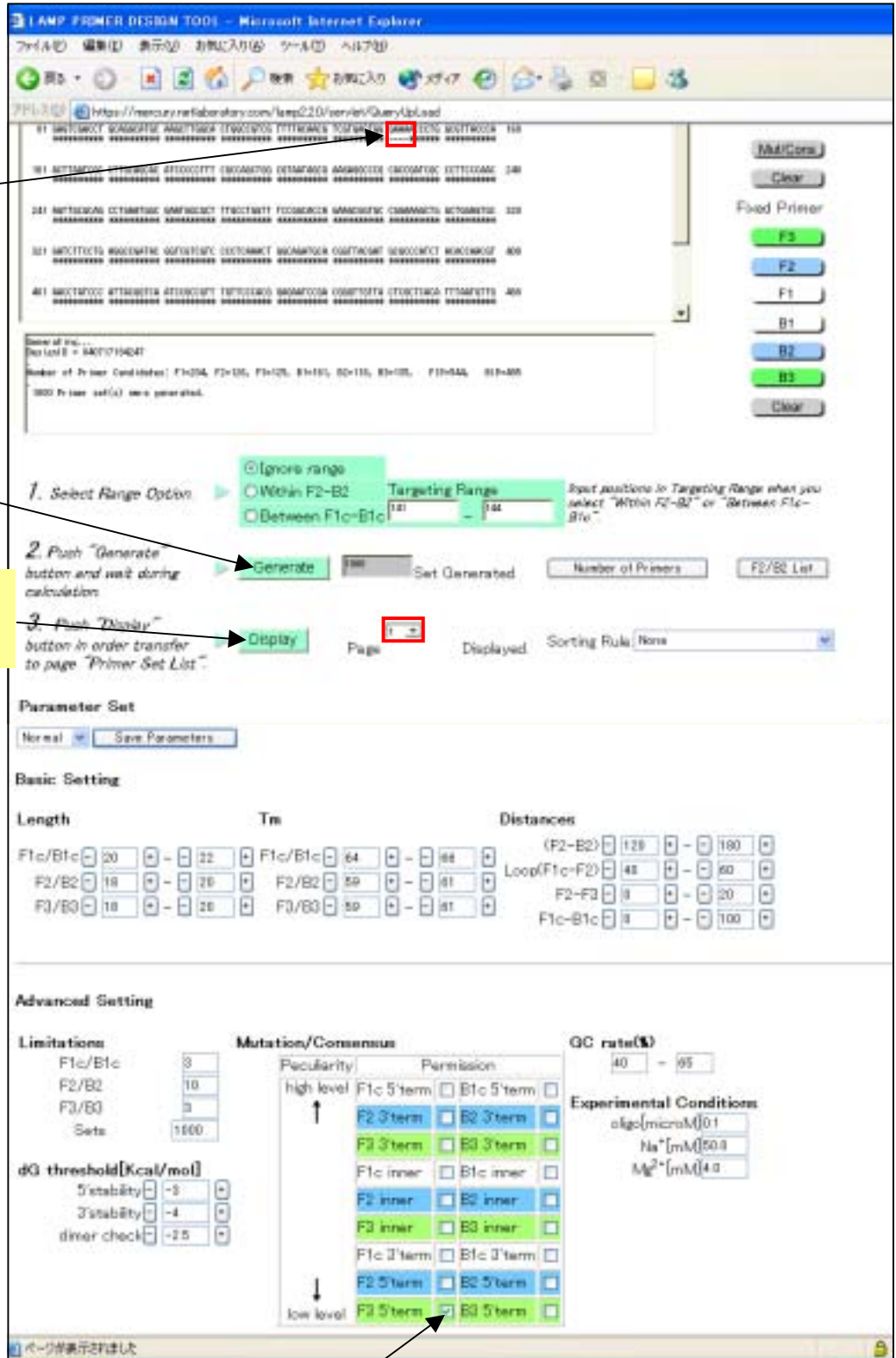


図6.3と同じ変異情報を用いる

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

プライマ - 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 6.8 の一覧表示画面を見ると、プライマ - 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 - 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 - 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 - セットが設計されます。

図 6.8 結果の一覧表示画面(1 ペ - ジ目)

The screenshot shows a web browser window displaying the 'PrimerSet List' interface. The main content area lists various primer sets with their sequences and associated data. A red box highlights a specific sequence in the 'F3' region, which is noted as containing a mutation. A callout box points to this red box with the text '変異を含む部分を赤く表示している' (The part containing the mutation is displayed in red). Another callout box points to the 'F3' column header with the text 'F3 領域の 5' 側に変異を含んだプライマ - が設計される' (Primers containing a mutation in the 5' side of the F3 region are designed).

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 6.9 のようにプライマ - 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 - 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 - が設計されます。(図 6.10 参照)

図6.9 プライマ - 設計画面

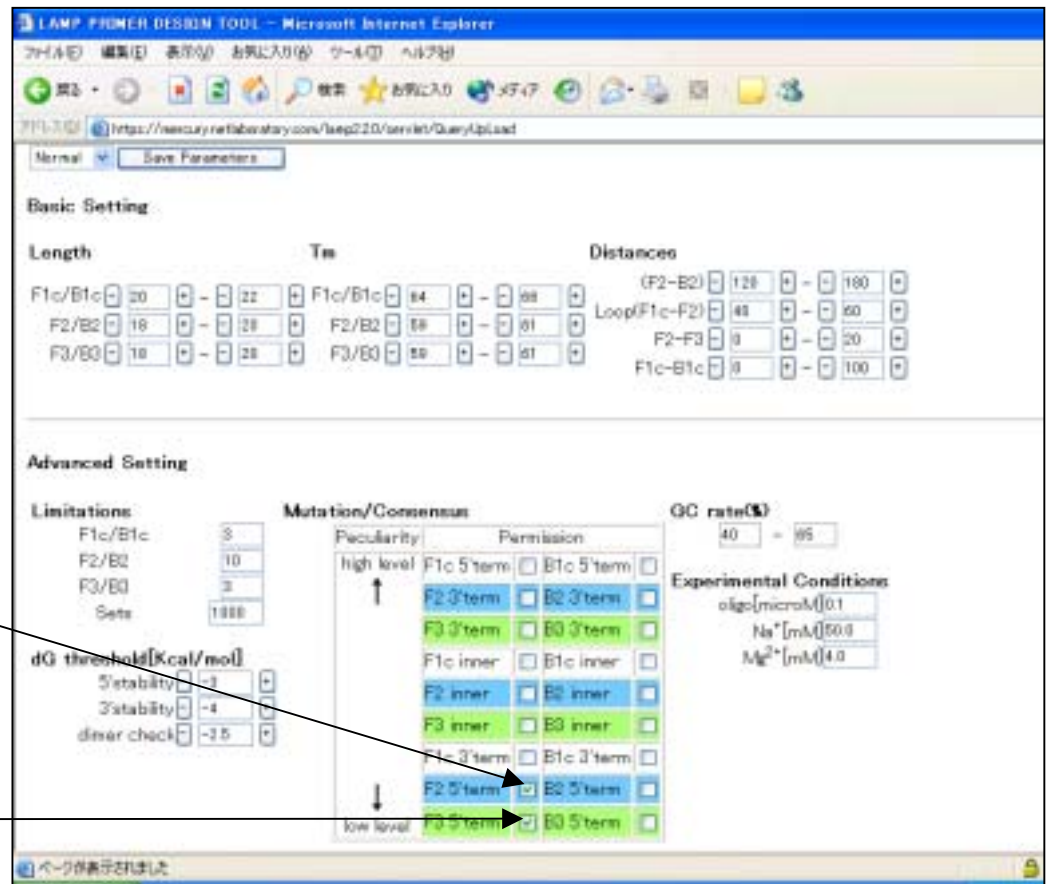
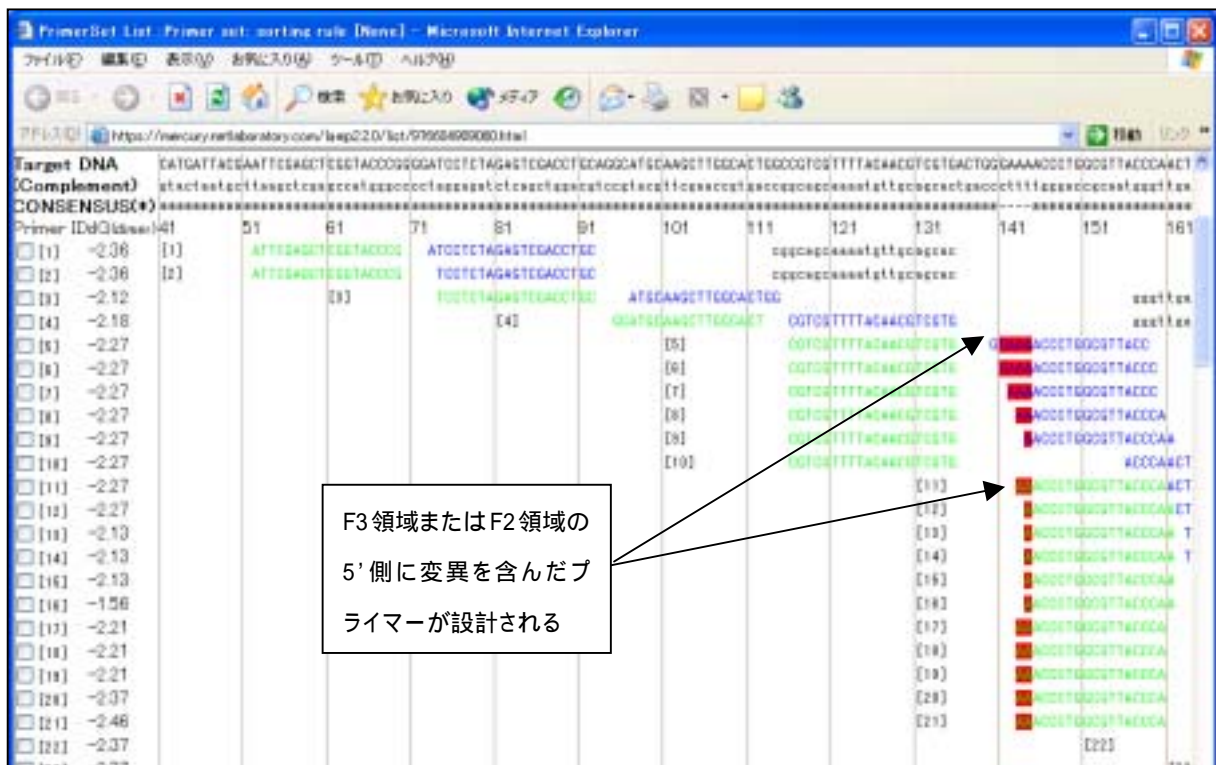


図6.10 結果の一覧表示画面(1ページ目)

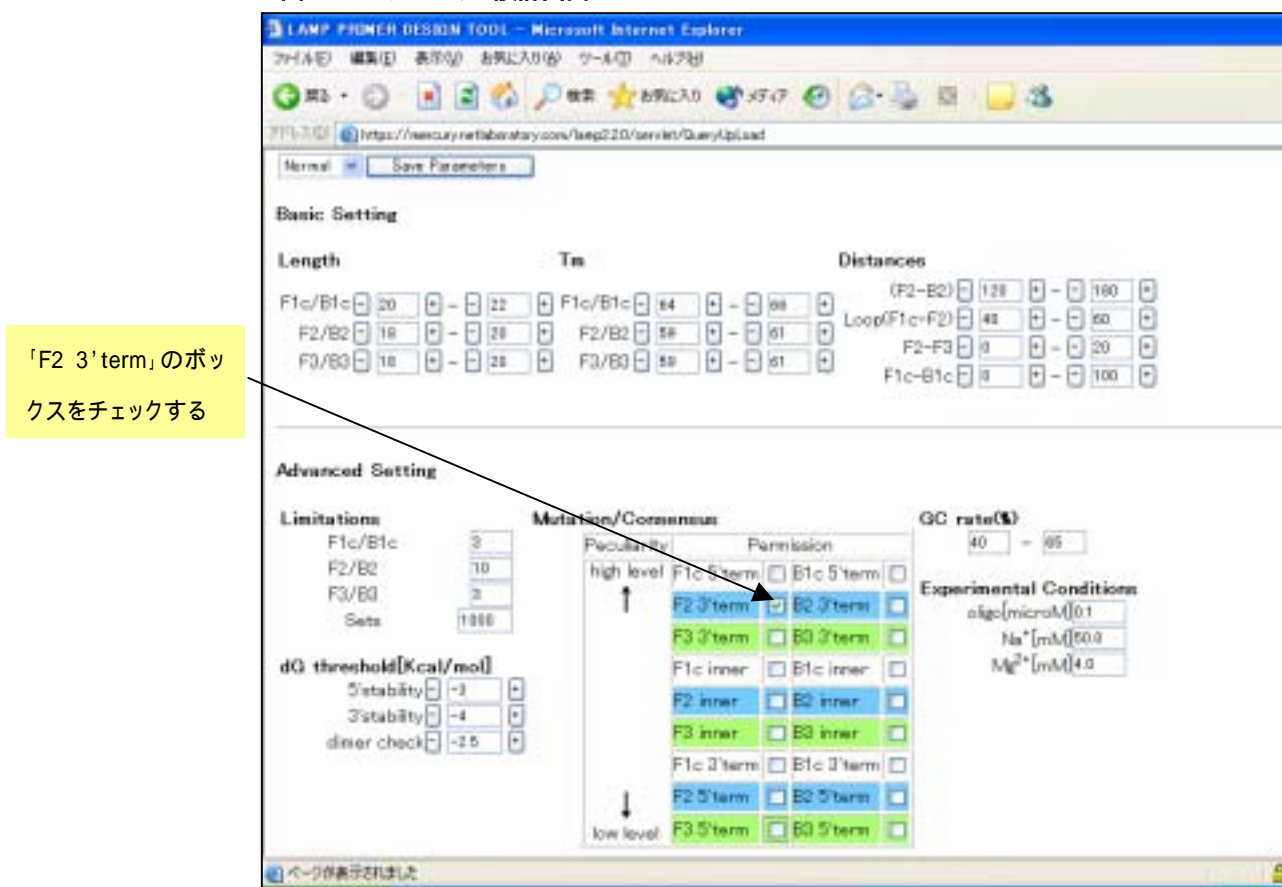


つぎに、プライマ - 領域の 3' 末端に変異部位が含まれるような設計を行います。

図 6.11 のようにプライマ - 設計画面で 3' 末端のところ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 - 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。

F2、F3、B2、B3 領域の 3' 末端あるいは F1c と B1c 領域の 5' 末端に変異が導入されるとプライマーの野生株に対する特異性は低くなり、相対的に変異株に対する特異性が高くなります。これらの領域はアニーリング時に遺伝子の増幅起点として働くため、領域に変異をもった遺伝子が特異的に増幅されることになります。この性質を利用して特異性の高いプライマーを選択することも可能です。

図 6.11 プライマ - 設計画面



プライマ - 領域の 3' 末端に変異が含まれるような設定をしましたので、今回は F2 領域の 3' 末端に変異が含まれるような設計がされています。(図 6.12 参照)

図6.12 結果の一覧表示画面(1 ペ - ジ目)

The screenshot shows a web browser window displaying a primer list. The browser's address bar shows the URL: <https://mercury.rmlaboratory.com/leap2.0/list/37962008591.html>. The page content includes a 'Target DNA' section with a sequence of nucleotides. Below this, a 'Primer (DdG) (max)' table lists various primers with their corresponding scores and positions. A callout box with an arrow points to a primer with a score of -1.99, indicating a mutation in the 3' region of the F2 domain.

Primer (DdG) (max)	Score	Primer Sequence
[1]	-2.36	ATTGAGCTCGTACGGS
[2]	-2.36	ATTGAGCTCGTACGGS
[3]	-2.12	ATTGAGCTCGTACGGS
[4]	-2.18	ATCTCTAGAGTGGACTGC
[5]	-1.89	ATCTCTAGAGTGGACTGC
[6]	-1.99	ATCTCTAGAGTGGACTGC
[7]	-1.99	ATCTCTAGAGTGGACTGC
[8]	-1.99	ATCTCTAGAGTGGACTGC
[9]	-1.99	ATCTCTAGAGTGGACTGC
[10]	-1.99	ATCTCTAGAGTGGACTGC
[11]	-2.27	ATCTCTAGAGTGGACTGC
[12]	-2.37	ATCTCTAGAGTGGACTGC
[13]	-2.37	ATCTCTAGAGTGGACTGC
[14]	-2.48	ATCTCTAGAGTGGACTGC
[15]	-2.48	ATCTCTAGAGTGGACTGC
[16]	-2.37	ATCTCTAGAGTGGACTGC
[17]	-2.40	ATCTCTAGAGTGGACTGC
[18]	-2.24	ATCTCTAGAGTGGACTGC

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 - セットを選択します。

## プライマ - 設計の応用例



## 7. プライマー設計の注意点

### 7.1 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 Tm 値の差(F2 と F1c 領域、B2 と B1c 領域等)を約 5 にします。

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します。そこで F2(B2 領域)は F1c(B1c 領域)よりターゲット遺伝子にアニーリングしやすい条件に設定します。そのため、F2(B2)領域の Tm 値は F1c(B1c)領域より 5 程度低いことが望ましい条件です。緩い条件(各領域の Tm 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 Tm 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 Tm 値の差が 3 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 Tm 値は合せた方が良い結果が得られます。

### 7.2 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 Ver. 3 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 Tm 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 Tm 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 Tm 値が、デフォルトの Tm 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 Tm 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 Tm 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 Tm 値がデフォルトの Tm 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 Tm 値をさらに高く設定します。どの程度長さや Tm 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 Tm 値を 1 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。

## 8 野生株と変異株に対するプライマー設計

PrimerExplorer Ver.2とVer.3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。

### 8.1 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となります。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 2-1)。

- 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 2-1 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 2-2 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-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。

## 8.2 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(表 2-1)。

- 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 8 - 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'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
共通プライマー*	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
特異的プライマー**			●	●	●	●	●					●

\*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

\*\*特異的プライマー；野生株と変異株を区別する場合に変異が対応する箇所

M13_3.nuc	1:	GCAGGCATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTTA	*	CAACGTCGTGACTGGGA	*	AAACCCCTG	60
M13_3M1.nuc	1:	GCAGGCATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTTG		CAACGTCGTGACTGGGA		TAACCCCTG	60
M13_3.nuc	61:	GCGTTACCCAACCTAATCG	*	CCTTGCAGCACATCCC	*	CCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCG	120
M13_3M1.nuc	61:	GCGTTACCCAACCTAATCG		ACTTGCAGCACATCCC		GCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCG	120
M13_3.nuc	121:	AAGAG	*	CCCCGACCCGATCGCCCTTCCAACA	*	CTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCT	180
M13_3M1.nuc	121:	AAGAG		TCCCGACCCGATCGCCCTTCCAACA		CTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCT	180
M13_3.nuc	181:	TTGCCTGGTTTCCGGCACCAGAAGCGGTGC		C	*	GGAAAGCTGGCTGGAGTGCATCTTCCTG	240
M13_3M1.nuc	181:	TTGCCTGGTTTCCGGCACCAGAAGCGGTGC		C		AGGAAAGCTGGCTGGAGTGCATCTTCCTG	240
M13_3.nuc	241:	AGGCCGATACGGTCGTCGTC		CCCCCTCAA		ACTGGCAGATGCACGGTTACGATGCGCCCATCT	300
M13_3M1.nuc	241:	AGGCCGATACGGTCGTCGTC		CCCCCTCAA		ACTGGCAGATGCACGGTTACGATGCGCCCATCT	300
M13_3.nuc	301:	ACACCAACGTAACCTATCCATTACGGTCAATCCGCGTTTGT		TCCACGGAGAATCCGA			360
M13_3M1.nuc	301:	ACACCAACGTAACCTATCCATTACGGTCAATCCGCGTTTGT		TCCACGGAGAATCCGA			360
M13_3.nuc	361:	CGGGTTGTTACTCGCTCACATTTAATGTTGATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCCAGACGC					420
M13_3M1.nuc	361:	CGGGTTGTTACTCGCTCACATTTAATGTTGATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCCAGACGC					420
M13_3.nuc	421:	GAATTATTTTGTATGGCGTTCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAA					480
M13_3M1.nuc	421:	GAATTATTTTGTATGGCGTTCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAA					480
M13_3.nuc	481:	CGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTAC					510
M13_3M1.nuc	481:	CGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTAC					510

図 8-1 野生株と変異株のアライメント



表8-2 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			B1c領域			B2領域			B3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



## 研究の進め方とテクニック




---



---



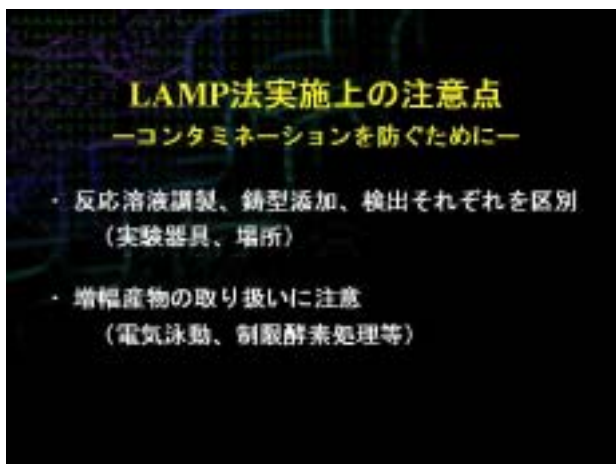
---



---



---



LAMP 法実施上の注意点はコンタミネーションを防ぐということが最も重要です。

その対策の1つは、反応溶液の調製、鑄型の添加、検出をそれぞれ区別して別々に行います。これは、実験器具や、実験する場所を区別します。もしも別々の実験場所を準備できない場合には、反応溶液の調製と鑄型の添加を別のクリーンベンチで行うことで同じ部屋で実験することが可能です。ただし、検出は必ず別の部屋で行って下さい。

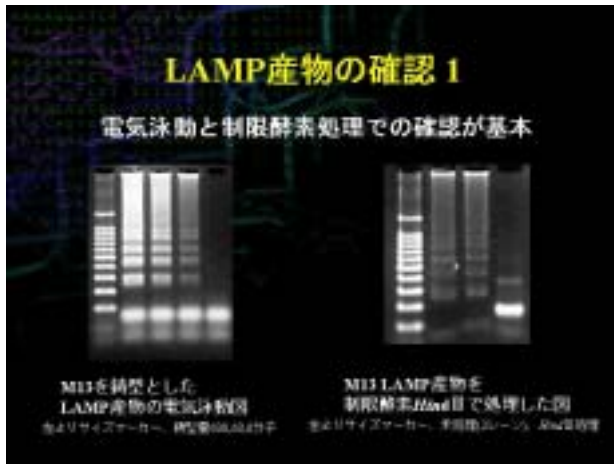
また、増幅産物の取り扱い時が最もコンタミネーションを起こしやすいので、電気泳動や制限酵素で目的の増幅産物を確認する際には十分に注意を払って下さい。



LAMP 法の実施条件は Loopamp DNA 増幅試薬キットに示されている条件が基本です。

さらに増幅速度、感度を上げる場合は以下のような検討をしてください。

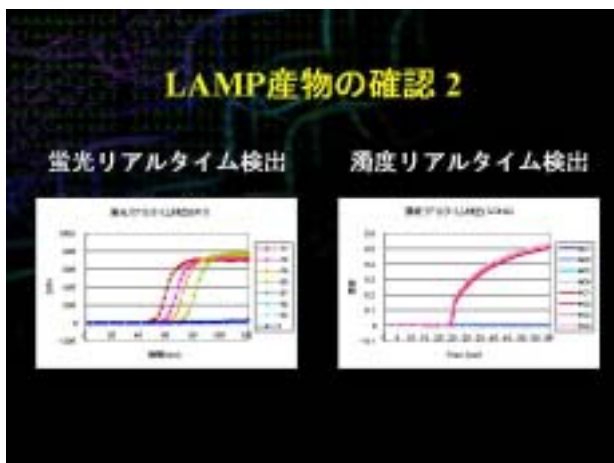
- ・酵素量、プライマー量(特に Inner primer の量)
- ・反応温度(63 を推奨していますが、60~65 で検討して下さい)
- ・Inner primer の精製度(はじめにプライマーセットをスクリーニングする際は OPC 精製で十分ですが、それ以後の検討では HPLC で精製されたものを使用して下さい)



LAMP 産物の確認の基本は、電気泳動と制限酵素での処理です。

左側の図が M13 を鋳型とした LAMP 産物の電気泳動図です。左から順にサイズマーカー、鋳型量 600 分子、60 分子、6 分子、ネガティブコントロールとなっています。

Target の M13 配列上には *Hind* 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* で処理したものとなっています。*Hind* によりきれいに消化されており、目的のものが増えていることが確認されました。



LAMP 産物の確認は電気泳動による方法が基本ですが、これは反応終了後にチューブのフタを開けなければいけないため、コンタミネーションの危険が高くなります。そこで、はじめに電気泳動による確認を実施した後は、閉鎖系での検出をお奨めします。例えば蛍光リアルタイム検出や濁度リアルタイム検出が挙げられます。

左側の図は M13 を鋳型として蛍光リアルタイム検出をした結果です。鋳型量を  $10^{-17}$ mol/tube から  $10^{-23}$ mol/tube としていますが、鋳型量依存的に増幅速度が変化しました。

右側の図は 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°C 保存
- ・ プライマーは原液を -80°C 保存
- ・ dNTPも徐々に劣化するので注意
- ・ 鋳型およびプライマーなどのDNAは TE 等で保存 (pH8~9)
- ・ 低濃度のものは劣化しやすいので注意

LAMP 法の検討を進めていくと、はじめは反応が非常に上手くいっていたが、途中から上手くいかなくなるという現象にあうことがあります。そのような場合には試薬の劣化が疑われますので、試薬の取り扱いに注意して下さい。一般的な注意は PCR による実験時のものとほぼ同じで、試薬はすべて -20 °C 保存、プライマーは原液を -80 °C で保存して下さい。基質の dNTP も徐々に劣化するので注意が必要です。鋳型やプライマーなどの DNA を水などで調製した場合は劣化が速くなる可能性がありますので、できれば TE などの Buffer 中で保存して下さい。特にターゲットの鋳型 DNA については低濃度のものは非常に劣化しやすいので注意が必要です。

## 用語集

### 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:

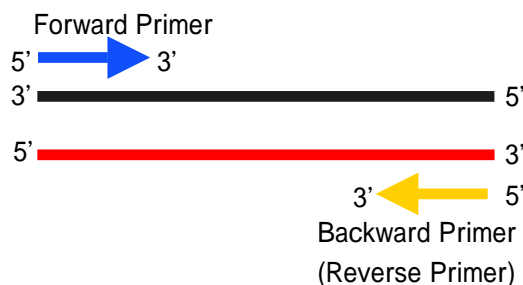
FASTAはデータベース検索により遺伝子やタンパク質の配列の類似性を調べることのできるコンピュータプログラムである。長い配列で類似性を保っているものを検索するのに適している。FASTA形式は配列解析プログラムで最もよく使われる形式であり、以下のようなフォーマットである。

```
>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)
taaagaagtaagcctttatttccttggtttgca    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
taaagaagtaagcctttatttccttggtttgca
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。

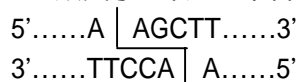
### GenBank 形式:

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

### Hind :

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。

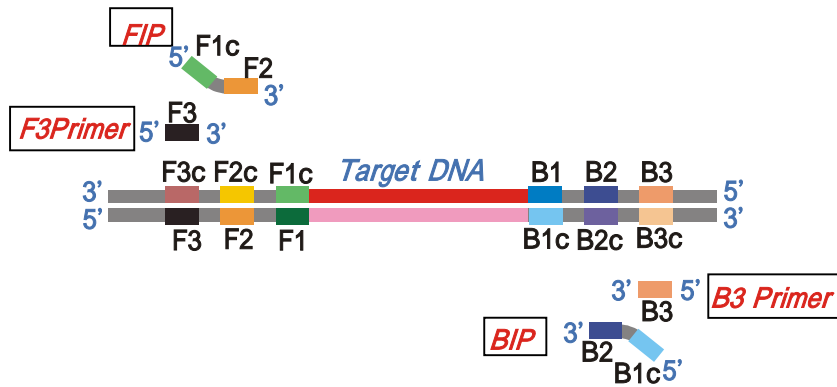
### LAMP 法:

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 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、2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 アニールング - DNA 合成というステップ無しに合成が進む 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)

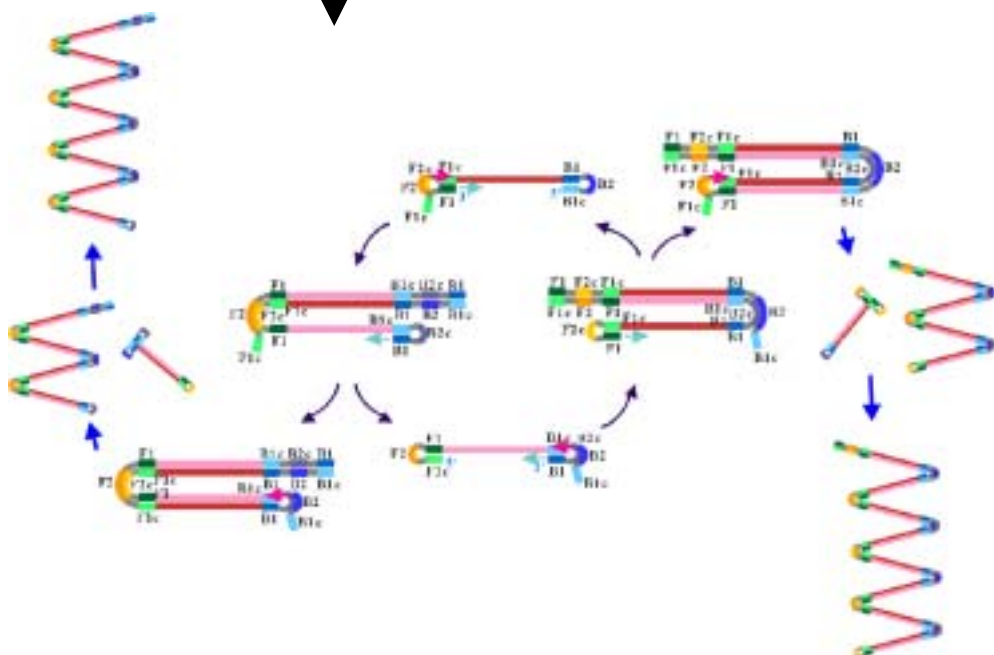


鎖置換型 DNA ポリメラーゼの働きにより 65 付近の定温で複数段階の反応が起こる

(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。WebSERVE/e Genome Orderにて購入できる。

#### Loop primer/ループプライマー:

LAMP法において、増幅反応の起点構造であるダンベル様構造及び増幅途上産物に形成されるループ構造領域の内、5'末端側のLoopの1本鎖部分(B1領域とB2領域の間、あるいはF1領域とF2領域の間)に相補的な配列を持つプライマー(それぞれLoop primerB、Loop primerF)。ループプライマーを用いることによりDNA合成の起点が増え、増幅反応時間の短縮、特異性の向上が可能となる。

#### M13 ファージ:

繊維状の1本鎖DNAファージ。大腸菌のF繊維を介して宿主に感染し、菌体内に取り込まれる。宿主内で1本鎖DNAは、2本鎖の複製型となり、それを鋳型として1本鎖DNAが合成され、新しくつくられた子ファージ粒子内に組み込まれた後、宿主大腸菌を溶菌することなく菌体外に放出される。このファージはクローニングベクターとしても有用であり、ジデオキシ法を用いた塩基配列の決定に際し1本鎖DNAの調製用に広く用いられている。

#### Nearest-Neighbor 法:

遺伝子のT<sub>m</sub>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<sub>m</sub>値を求める。

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

R: 気体定数 = 1.987 cal / (mol °K)  
H: エンタルピー (kcal / mol)  
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しで、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。

#### **Tm 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 Tm 値が高い。プライマーの結合能は一般的に Tm 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。

### ブレンテキスト形式:

配列情報のみを以下のように記述する形式。

```
ctcaggact ggggaccctg caccgaacat ggagaacaca acatcaggat tcctaggacc
cctgctcgtg ttacagggcg ggtttttctt gttgacaaga atcctcacia taccacagag
tctagactcg tggtagactt ctctcaattt tctaggggga gcaccacgt 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 G (自由エネルギー変化) を計算し、安定性を見ている。



