

猫主杓子主

Geneious Prime でシークエンス解析

geneious prime

第39回 プライマーデザイン機能(はじめに)

Geneious には、オリゴヌクレオチドプライマー、プライマーペア、プライマーペアとプローブの組み合わせなどの、作成、インポート、設計、テストなどを行うためのツールが数多く実装されており、そのほとんどは、Toolbar にある Primers ボタンからアクセスすることができます。



プライマーを設計する際には、必ずしもこれらをすべて満たす必要はありませんが、一般的に望ましい とされる以下のようなガイドラインがあります:

- 結合領域の長さは 17~27 bp にする
- 結合領域の Tm は 50~65℃ にする
  ※プライマーペア間の Tm の差は±4℃以内にする
- 適度なG+C含量(45~55%)にする
- 全体的に塩基の偏りがない配列にする
  ※おなじ塩基の反復は避ける
  ※繰り返しポリN領域は避ける
  ※部分的にGCリッチあるいはATリッチな配列(特に3'末端)は避ける
  ※3'末端塩基は、GまたはCが望ましい
- 2 次構造(ヘアピンやプライマーダイマー)を作らない配列にする
  ※プライマー内部やプライマー間で3 塩基以上の相補的配列を避ける
  ※プライマーの3' 末端が2 塩基以上相補する配列は避ける

<u>チュートリアル用のデータがこちらからダウンロード可能です</u>。ダウンロードした zip ファイルは解凍せずに Geneious Prime にドラッグ&ドロップすることでインポートできます。

Geneious では、プライマーは特別な形式のドキュメントファイルとして扱われます。プライマーのド キュメントファイルはドキュメントテーブル(Geneious 画面上部)で、緑色の矢印のアイコンとして表 示されます。

例えばチュートリアルで提供されている T7 Promoter のプライマーを選択して表示してみると、 primer\_bind "Binding region" アノテーションの付いた DNA 配列から構成されていることが わかります。この primer\_bind アノテーションは、プライマーが結合すると予想される相補的なター ゲット領域を表しており、ターゲット配列とのマッチングをテストする際に考慮される配列として定義 されています。その他に、G+C 含量、融解温度(Tm)、ヘアピン Tm、セルフダイマーTm などの様々 な情報が、プライマーの作成時に算出され、アノテーションと共に保存されています。

緑色の Binding Region アノテーションの上にマウスポインターを置くと、Tooltip が表示され、これらの情報を表示することができます。

※ Geneious では、Tm 値の算出に <u>Primer3</u>を使用していますが、**Primer3** では 35 塩基以上の結合領域を持つプライマーの Tm は計算できないことにご注意ください。



Name: Binding Region Type: Primer Bind (primer\_bind) (Created by primer3) Length: 20 Interval: <u>1 -> 20</u> %GC: 40.0 Tm: 50.3 Hairpin Tm: None Self Dimer Tm: None Sequence: TAATACGACTCACTATAGGG

プライマーには 5' 伸長領域が含まれることがありますが、この領域は、ターゲット配列との初回のア ニーリングに関与しないと予想されるため、primer\_bind アノテーションではカバーされていません。

チュートリアルデータにある 2 番目のプライマー配列例、xynB R primer で、5′-PolyA 配列と HindIII 切断部位からなる伸長部を持つプライマーを確認することができます。



Geneious では様々な操作で、ターゲット配列にプライマーをアノテーションとして追加することが できます(例:Test with Saved Primers 機能など。詳しくは次回以降でご紹介します)。

配列にプライマーのアノテーションが追加されると、プライマーの primer\_bind 部分は、順方向に結 合する(つまり逆鎖を補完する)場合は濃い緑色に、逆方向に結合する場合は薄い緑色で表示されま す。プライマーにエクステンションがある場合は、薄い陰影のついた非結合領域として表示されます。 エクステンションに明確な特徴がある場合は、表示を高倍率にすることでそれらが見えるようになり ます。

チュートリアルデータにある DTU76545 配列を選択し、1140 のポジションを拡大すると、配列上 にリバースプライマー **xynB R primer** の結合位置が表示されていて、伸長は 5′-polyA 領域と HindIII 切断部位から構成されているのがわかります。

ターゲット配列にアノテーションした場合、リバースプライマーのアノテーションはターゲットの相補鎖 に対応するように右から左に表示され、伸長配列も右(5')から左(3')に読むことになります。



次回はプライマーの作成とインポートについてご紹介する予定です。

Geneious 製品概要・フリートライアルリクエストについては<u>こちら</u> 『Geneious Prime で猫も杓子もシークエンス解析』 過去の記事は<u>こちらでチェック!</u>

> TDB News 4. 2025 トミーデジタルバイオロジー株式会社 Phone 03-6240-0843 Fax 03-6240-0461