

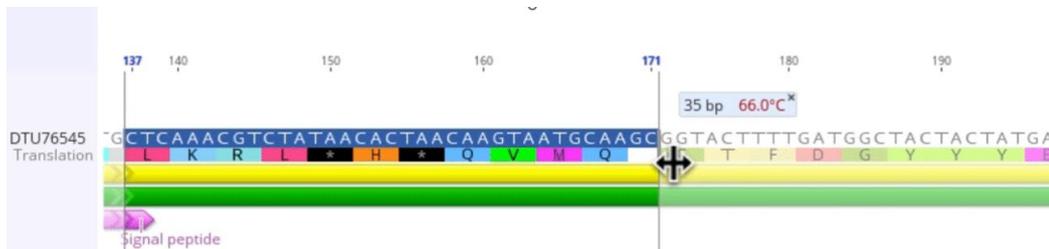
猫も杓子も

Geneious Prime でシーケンス解析

第 41 回 プライマーデザイン機能 (マニュアル設計)



Geneious Prime には、新規プライマーを手動で素早く作成するための機能があります。DNA 配列の任意の領域(100 塩基以下)を選択すると、選択した塩基の長さ と Tm を表示する **Selection Hint** がフローティング表示されます。**Selection Hint** の右側に **Add Primer** ボタン(Tm 表示の右にある[+→]ボタン)があります。もし **Selection Hint** が邪魔な場合は、ドラッグして位置を変えることもできます。**Selection Hint** の Tm(Rough Tm)は動的に計算されます。この計算に関する詳細は Geneious のマニュアルをご参照ください。



選択した位置と Tm に問題がなければ、**Add Primer** ボタン(Tm 表示の右にある[+→]ボタン)をクリックして、**Add Annotation** ダイアログを開きます。**Add Annotation** ダイアログは、新しいプライマーの作成に適した設定で開きます。

プライマーに名前を付け、プライマーの方向を設定し、必要であればエクステンションを追加します。

Primer3 が算出したプライマーの詳細は、ダイアログの **Characteristics** セクションに表示されますので、目的のアプリケーションに適したプライマーであるかどうかを確認することができます。

Primer3 が算出した **Tm** は、**Selection Hint** に表示されたものと若干($\pm 1-3^{\circ}\text{C}$)異なる場合があります。これは Primer3 がプライマー、ヌクレオチド、バッファーの塩濃度を考慮した、より高度なアルゴリズムを使用しているためです。**Tm Options** リンクをクリックすると、実験に使用する成分の濃度を設定することもできます。

[チュートリアルデータ](#)では、PCR で既存のリバースプライマーと使用する、新しいフォワードプライマーを設計する手順を試すことができます。

DTU76545 ターゲット配列は、グラム陰性好熱性細菌の一種である *Dictyoglomus thermophilum* xynB CDS を含んでいます。作成するプライマーは、成熟 XynB 遺伝子産物をコードする領域を増幅するものです。

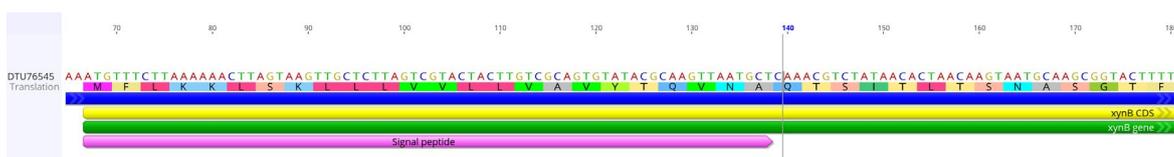
新しいプライマーは、PCR 産物に NcoI 制限酵素サイトを組み込むエクステンションを含むように設計します。さらに NcoI サイトは、消化された PCR 産物を pET26B 発現プラスミドにライゲーションできるように配置し、xynB CDS とプラスミドにコードされた PelB シグナルペプチドとの間にインフレーム融合が生じるようにします。また NcoI が、新しい NcoI サイトを効率的に切断できるように、5' -polyA スペースを加えます。

また、新しいプライマーの結合領域は、DTU76545 配列にすでにアノテーションされている xynB R リバースプライマーの Tm と一致するように、約 55°C の Tm を持つようにします。

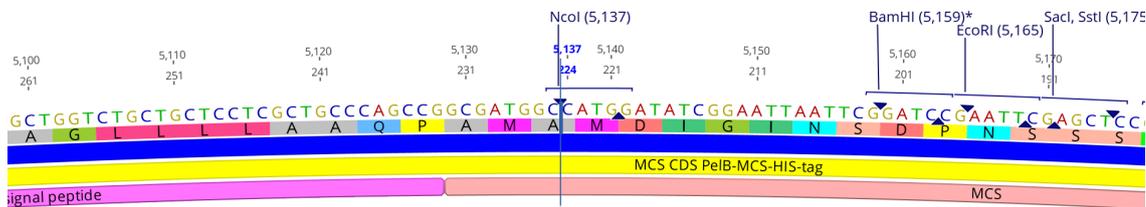
まず初めに、DTU76545 ファイルを選択し、140 bp 付近を拡大/スクロールします。

XynB のシグナルペプチドと成熟キシラナーゼ酵素の境界を定義すると予測されるピンク色のシグナルペプチドのアノテーションを見ることができます。シグナルペプチドの最後のコドン(Ala)から増幅するプライマーをデザインします。

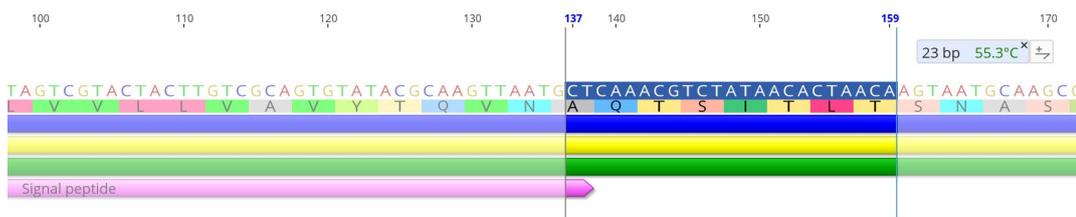
ビューアパネルにある **Display** タブで **Translation** をオンにし、**Frame** の設定が **By Annotation** になっていることを確認します。これで xynB CDS の翻訳が表示されます。



次に、pET26B ベクターを選択し、5137 bp の位置をズームすると、PelB リーダー配列とのインフレーム融合に使用する NcoI 部位が見えます。先ほどと同じく **Translation by Annotation** をオンにすると、NcoI 部位内の ATG(ccATGg)が PelB CDS のメチオニン(M)をコードしていることがわかります。そして NcoI の最後の G ヌクレオチドは、次のコドンの位置 1 に対応しています。この位置関係を利用して、新しいプライマーの NcoI 部位を確実に位置決めし、PelB と成熟 XynB をインフレームで融合させます。



ターゲットの DTU76545 配列に戻り、シグナルペプチドの最後のコドンの 2 番目の位置(CT - Ala) をからドラッグして予測 Tm が約 55°Cとなる領域を選択し、**Add Primer** ボタン(Tm 表示の右にある[+→]ボタン)をクリックして、**Add Annotation** ダイアログを開きます。

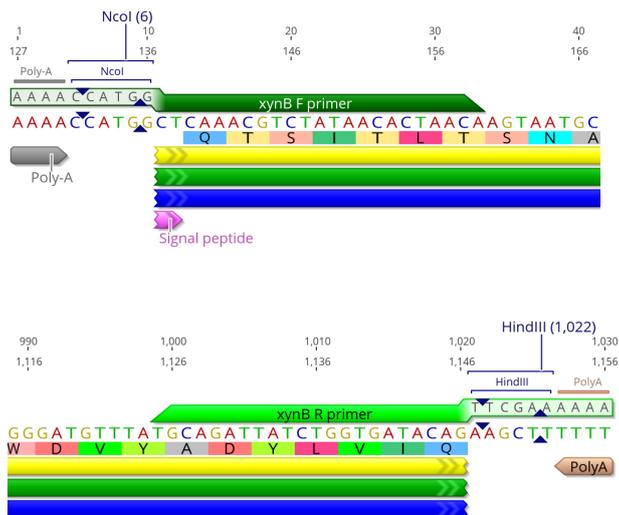


Add Primer ダイアログで、**Name:** に xynB F primer を入力、方向が **Forward** に設定されていることを確認、**Characteristics** で問題がないことを確認し、**Extension** ボタンをクリックして新しいエクステンションを追加します。

The screenshot shows the 'Add annotation' dialog box. The 'Name' field contains 'xynB F primer'. The 'Type' is set to 'Primer Bind (primer_bind)'. The 'Track' is set to 'No Track'. The 'Direction' is set to 'Forward'. The 'Binding site' is set to '137 to 159'. The 'Primer Sequence' is 'CTCAAACGCTCTATAACACTAACA'. The 'Extension' is set to 'none'. The 'Characteristics' section shows: Length: 23, Tm: 54.2, %GC: 34.8, Hairpin Tm: None, Self Dimer Tm: None. At the bottom, there are 'OK' and 'Cancel' buttons.

最後の 2 つのステップでは、新しいプライマーが目的の PCR 産物を生成することを確認します。DTU76545 を選択し、ツールバーの **Primers** → **Extract PCR Product...** と進みます。このツールは配列上のプライマーアノテーションを検出して選択します。OK をクリックすると、新しい PCR 産物ファイルが作成されます。

作成された DTU76545 PCR Product を選択し、ズームインして両末端を確認すると、プライマーエクステンションが PCR 産物の配列に組み込まれているのがわかります。NcoI 由来の ATG コドンが xynB CDS のフレーム内にあることも確認できます。



次回はプライマーペアの設計についてご紹介する予定です。

過去の記事もご参照下さい。

[第 39 回 プライマーデザイン機能（はじめに）](#)

[第 40 回 プライマーデザイン機能（作成とインポート）](#)

Geneious 製品概要・フリートライアルリクエストについては[こちら](#)

『Geneious Prime で猫も杓子もシーケンス解析』過去の記事は[こちらでチェック！](#)