

猫も杓子も

Geneious Prime でシーケンス解析

第 42 回 プライマーデザイン機能（プライマーペアの設計）



前回(第 41 回)の、プライマーをマニュアルで設計する方法に続いて、今回は Design New Primers 機能を使用して、目的配列を増幅するプライマーペアを設計する方法をご紹介します。

[チュートリアルデータ](#)では、マンモスゲノムから COX1 遺伝子の一部を増幅する PCR プライマーを設計する手順を試すことができます。

NC_007596 (Mammuthus primigenius (woolly mammoth) mitochondrion, complete genome)をクリックし、COX1 遺伝子を見つけてください。もし COX1 を見つけられない場合は、シーケンスビューア右側の Annotations and Tracks タブを表示し、フィルターボックスに COX1 と入力することで検索することができます。

COX1 のアノテーションを選択できましたら、**Primers ボタン** → **Design New Primers...**を選択してください。

Design New Primers では、プライマーのサイズや Tm などの特性、プライマーをどの位置に設計するか、どれぐらいのサイズの PCR 産物とするかを指定することができます。

Task で Generic を選択し、**Included Region** にチェックを入れます。これはプライマーが設計される場所を指定するので、COX1 遺伝子が位置する **5,331 から 6,878** に設定します。もし PCR で増幅したい遺伝子の特定の領域がある場合は、Target Region で設定します。

今回は COX1 に増幅したい特定の領域はないですが、プライマーが劣化した DNA でも作用するようにという想定で、PCR 産物のサイズを 300 bp 以下に設定します。そのため、Target Region のチェックは外し、Product Size Between を **200~300 bp**、Optimal Product Size は **250 bp** と設定し、**Number of pairs to generate** は 1 に設定します。

Tm Calculation セクションには、オリゴの融点を計算するのに使用する計算式の詳細が記載されていますが、デフォルト設定のままで構いません。

Characteristics セクションを展開します。ここでは、プライマーサイズ、Tm、ヘアピンやプライマーダイマーのペナルティなど、プライマーに必要な特性を設定できます。ほとんどの場合はデフォルト設定のままで問題ありませんが、特に GC や AT がリッチなターゲット配列や、より長いプライマーが必要な場合など、デフォルトの設定で適切なプライマーが見つからない場合は、これらの設定を調整する必要があるかもしれません。

今回は、これらのオプションのほとんどをデフォルトのまま使用しますが、F プライマーと R プライマー間の Tm 差を制限し、1 回の PCR 反応で確実に機能させるために、**Max Tm Difference** を 2 に設定します。

これで Design New Primers の設定はこのようになります：

Design New Primers

Select Task: **Design New** Design with Existing Design for Sequencing

Primer design uses a modified version of [Primer3 2.3.7](#)

☒ Forward Primer ☐ DNA Probe ☒ Reverse Primer

Task: Generic

☒ Included Region: 5,331 To 6,878

☐ Target Region: 5,331 To 6,878

☒ Product Size Between: 200 And 300

☒ Optimal Product Size: 250

Number of pairs to generate: 1

> Specificity Testing ?

> Tm Calculation

Characteristics

Primer DNA Probe

Size Min: 18 Optimal: 20 Max: 27

Tm Min: 57 Optimal: 60 Max: 63

%GC Min: 20 Optimal: 50 Max: 80

Product Tm Min: 0 Optimal: 0 Max: 0

Max Tm Difference: 2 GC Clamp: 0

Max Dimer Tm: 47 Max Poly-X: 5

Max 3' Stability: 9

☐ Allow primers inside target with penalty: 0

☒ Minimum Primer Distance: 0

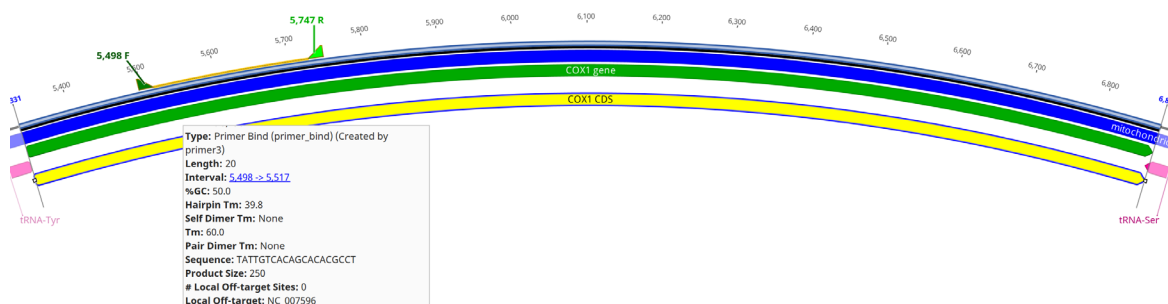
Primer Picking Weights

☐ Allow Degeneracy: 1

> Advanced

OK Cancel

OK をクリックすると、配列が更新され、適切なプライマーがアノテーションとして表示されます。COX1 のアノテーションを選択し、配列ビューアの右側にあるズームボタンを使ってズームインすると、プライマーアノテーションが塩基番号で表示されるはずです。Save をクリックしてプライマーアノテーションを配列に保存します。



プライマーアノテーションの上にマウスを置くと、PCR プライマーと産物の特徴を含むツールチップが表示されます。これらのプライマーは 250 bp のサイズの産物を増幅すること、そして両方のプライマーの Tm は 60°C であることがわかります。

それぞれのプライマーアノテーションをクリックして選択し、**Extract** をクリックして、Mammoth COX1_F や Mammoth COX1_R などの名前をつけてプライマードキュメントとして抽出することで、ほかの解析でもプライマーとして用いることができますようになります

次回はプライマーのテスト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）](#)

[第 41 回 プライマーデザイン機能（マニュアル設計）](#)

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 で猫も杓子もシークエンス解析』過去の記事は[こちらでチェック！](#)