猫も杓子も

Geneious Prime でシークエンス解析

第 43 回 プライマーデザイン機能（プライマーのテスト）

Geneious にはプライマーの動作をテストする機能が 2 つあります。どちらも Geneious のデータフォルダ内にターゲット配列が既に存在している必要があります。

Add Primers to Sequence
Geneious のデータベースに追加する新しいプライマーをテストする場合に使用します。例えば、論文に掲載されているプライマーが自分の持つターゲット配列に対して動作するかどうかを確認することができます。

Test with Saved primers
Geneious のデータベースにすでに存在するプライマーをテストする場合に使用します。この機能を使用することで PCR 産物がどのようになるかを確認したり、ターゲット以外の配列に対して非特異的増幅の可能性がないかを確認したりすることができます。

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。ダウンロードした zip ファイルは解凍せずに直接 Geneious にドラッグ＆ドロップすることでインポートすることができます。

Add Primers to Sequence

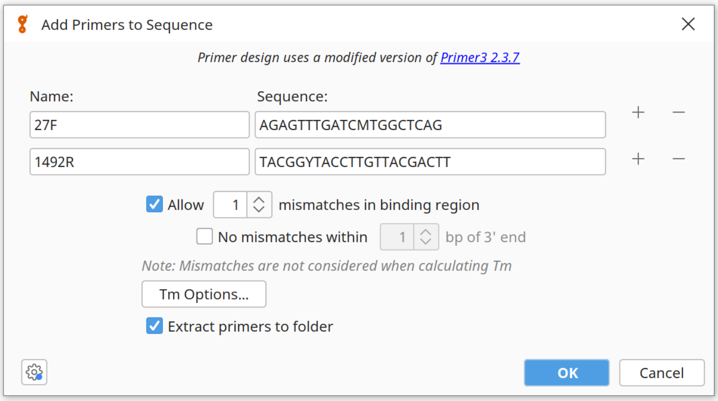
まず、**Add Primers to Sequence** を使用して 1 つまたは複数のプライマー配列を手動で入力し、テストする方法についてです。

Add Primers to Sequence を実行すると、一致するプライマーが見つかった場合、ターゲット配列にアノテーションとして追加されます。また、プライマー配列として保存するオプションもあります。**Add Primers to Sequence** を使用するには、ターゲット配列を選択し、**Primers → Add Primers to Sequence** と進みます。

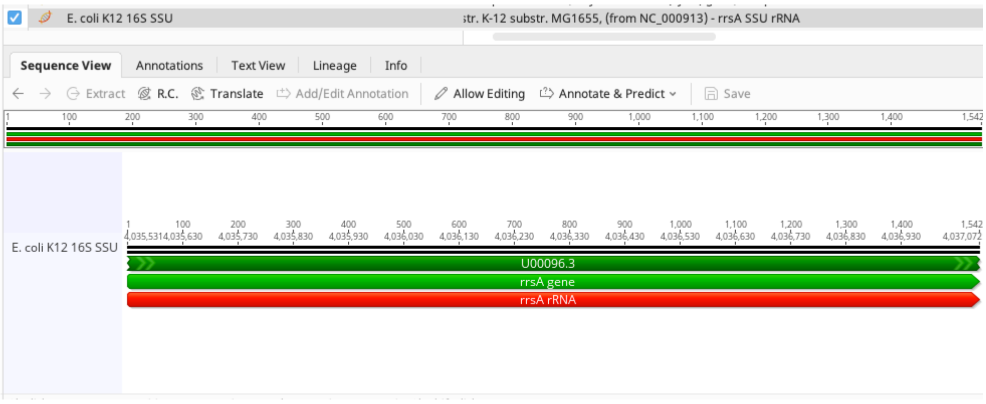
チュートリアル用のデータでは、原核生物の 16S SSU 配列を増幅するためのユニバーサルプライマーのペアを例としてテストすることができます。これらのプライマーは、多くの細菌や原核生物の 16S rDNA 遺伝子の増幅に使用されているもので、今回は公開されているゲノムから抽出された *E. coli* K12 の 16S SSU 遺伝子をターゲット配列として使用し、以下の 2 つのプライマーをテストします。

27F: AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
1492R: TACGGYTACCTTGTTACGACTT

E. coli K12 16S SSU のドキュメントを選択し、**Primers → Add Primers to Sequence** でプライマーの Name: と Sequence: を入力して、+ボタンで 2 つ目のプライマーを追加します。**Allow 1 mismatches...**でミスマッチを 1 つ許容する設定と、**Extract primers to folder** にチェックを入れます。**OK** をクリックして **Add Primers** ツールを実行します。



一致するプライマーが見つかった場合、入力したプライマーの Primer Bind アノテーションがターゲット配列に追加され、入力したプライマーは新しいプライマーとして保存されます。



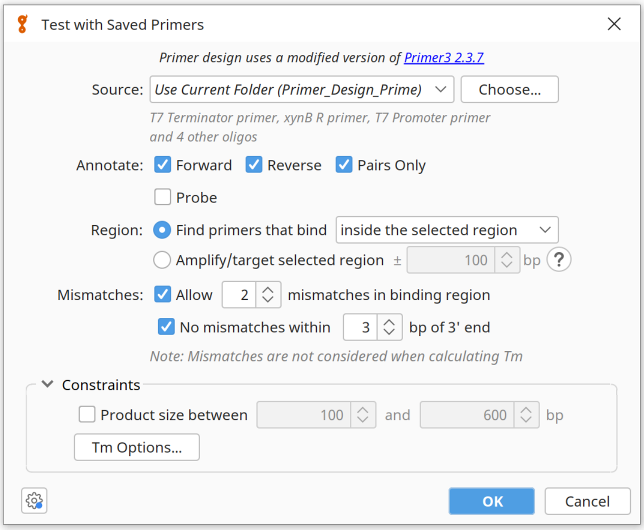
Test with Saved primers

次に、**Test with Saved Primers** についてご紹介します。チュートリアルのデータでは、前回アフリカゾウの COX1 遺伝子をターゲット配列としてデザインした、マンモスの COX1 プライマーをテストすることができます。

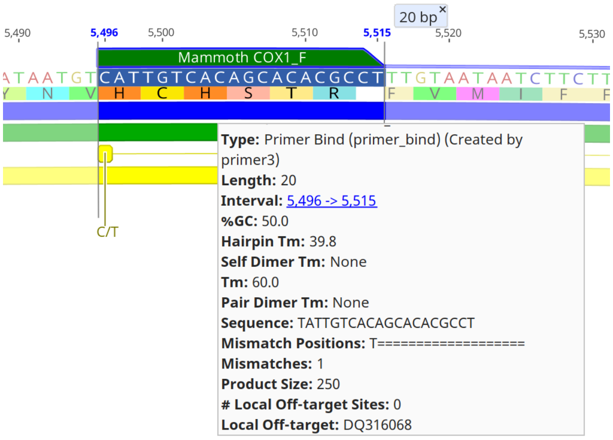
DQ316068（Elephas maximus mitochondrion, complete genome）を選択します。COX1 CDS を探して選択し、**Primers → Test with Saved Primers** と進みます。チュートリアルデータのフォルダ（Primer_Design_Prime）には、第 42 回で作成したプライマー（Mammoth COX1_F, Mammoth COX1_R）が含まれていますので、**Source:** は **Use current folder** または、**Choose...**ボタンからテストしたいプライマーを指定することもできます。

Forward Primer、**Reverse Primer**、**Pairs only** のオプションにチェックし、**Region:** オプションが **Find primers that bind inside the selected region** に設定されていることを確認します。

今回テストするプライマーは、ターゲット配列とは異なる生物種用に設計されているため、完全に一致する可能性は低いですが、3′ 末端に近すぎない限り、1～2 個のミスマッチがあっても PCR 反応に使用できると考えられます。**Mismatches** をチェックし、**Allow mismatches in binding region** にチェックして 2 を設定し、**No mismatches within…**を 3′ 末端から 3 bp に設定します。次の設定となっていることを確認して **OK** をクリックします。

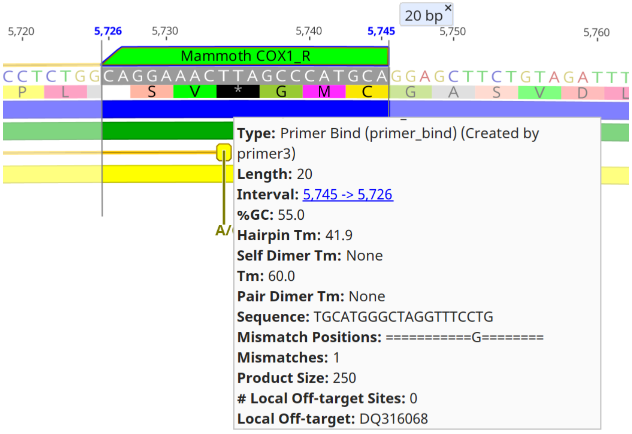


OK をクリックすると、マンモスのプライマーがアフリカゾウの配列上の COX1 遺伝子にアノテーションされます。フォワードプライマーのアノテーションを選択してズームインし、プライマーアノテーションの上にマウスカーソルを置くとツールチップが表示され、5′ 末端にターゲット配列とのミスマッチが 1 つだけあることがわかります。



次にリバースプライマーを見てみると、プライマーの真ん中にミスマッチが一つあるのがわかります。

これらのミスマッチが PCR に影響する可能性は低いため、これらのプライマーはアフリカゾウの COX 1 配列を増幅することができると予測できます。



Save をクリックしてプライマーのアノテーションを配列に保存します。プライマー部位にアノテーションを付与すると、下流の解析に使用するために PCR 産物の配列を抽出することができます。

DQ316068（Elephas maximus mitochondrion, complete genome）を再度選択し、**Primers → Extract PCR Product** で、Mammoth COX1 F/R プライマーが選択されていることを確認し、**OK** をクリックします。これらのプライマーはターゲットとミスマッチがあるため、ターゲットの配列を抽出するか、プライマーの配列を抽出するかの選択肢が表示されます。通常、PCR ではプライマー配列が優先されるため、**Extract Primer Bases** を選択します。これで、予測される PCR 産物の配列がドキュメントとして保存されます。

次回は Degenerate（縮重）プライマー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）
- 第 41 回　プライマーデザイン機能（マニュアル設計）
- 第 42 回　プライマーデザイン機能（プライマーペアの設計）

【最新バージョン】Geneious Prime 2026.0 新機能紹介はこちら

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！

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