

猫も杓子も

Geneious Prime でシークエンス解析

第 44 回 プライマーデザイン機能（縮重プライマーの設計）



縮重(Degenerate)プライマーは、1 か所以上の部位に塩基が混在しているプライマーで、目的遺伝子についてタンパク質の配列情報しか持っておらず、コドンの縮重を許容したい場合や、プライマー結合部位が同一でない可能性のある様々な生物種から、類似の遺伝子を単離したい場合などに有用なプライマーです。

プライマーの縮重度は、そのプライマー配列が表す異なるプライマーの数です。例えば、塩基の表記 N を 1 つだけ含む(他の曖昧さは含まない)プライマーでは、N が A,C,G,T の 4 塩基を表すため、縮重度は 4 となります。N と R を含むプライマーでは、R は A と G の 2 塩基を表すため、縮重度は $4 \times 2 = 8$ となります。

縮重プライマーは、実際には異なる塩基配列を持つプライマーの混合物となるため、実際の PCR では混合されたプライマーの一部しか機能しない可能性があります。そのため、縮重度はなるべく 100 以下までに抑えるべきで、それ以上の値では、それぞれのプライマーが希釈されすぎて効果的に働かなくなり、非特異的なターゲット断片も増幅されてしまう可能性があります。また同様の理由で、プライマーの 3' 末端に縮重塩基が配置されることも避けるべきです。

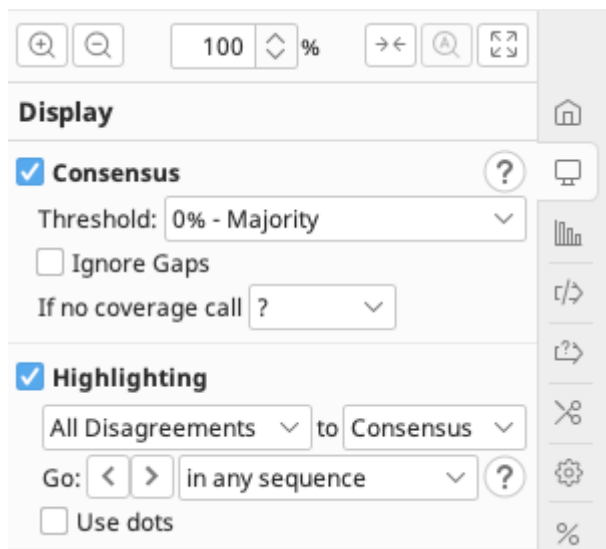
Geneious Prime では、アラインメント配列をテンプレートとして縮重プライマーを設計することができます。[チュートリアル用のデータ](#)では、脊椎動物に見られる多型性の高い免疫遺伝子である MHC class II 遺伝子を増幅するためのプライマーを設計する方法を試すことができます。

まず、MHC class II のアラインメントをクリックして選択して、シークエンスビューア右側の Display タブで **Highlighting** をチェックし、**All Disagreements to Consensus** を選択します。

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！](#)





アラインメントを確認すると、この遺伝子配列には多型領域と保存領域が混在していることがわかります。配列の末端の比較的保存された領域にプライマーを設定し、多型領域を横切って増幅するように設計したい場合、増幅する Target Region を指定することで行うことができます。

アラインメント配列で塩基番号 41 から 264 を選択し、**Primers** → **Design New Primers** をクリックします。これらの塩基番号は、Target Region と Included Region の両方のオプションに表示されるはずですが、今回の場合、これは配列決定をしたい領域で、PCR プライマーはこの領域内には入れたくない(この外側にプライマーを設計したい)ため、**Included Region** ボックスのチェックを外し、**Target Region** ボックスにチェックを入れます。もし、Product size range と optimal product size のボックスがチェックされている場合はチェックを外し、Number of pairs to generate を 1 に設定します。

フォワードプライマーが位置する予定の塩基番号 1 から 40 の領域は、多少多型があるため、この領域に結合する縮重プライマーが必要になります。**Characteristics** パネルを展開し、**Allow Degeneracy** ボックスにチェックし、値を 300 に設定します。

ウィンドウの最下部には、アラインメント配列上でのプライマーの設計方法をコントロールできるオプションがあります。縮重プライマーの場合は、Consensus で設計することを選択します。次に **Consensus** オプションをクリックして、多型位置でどの程度、縮重とするかを設定します。今回は Threshold を 75% に設定します。これはプライマー内の任意の位置で、プライマーがアラインメント中の配列の少なくとも 75% にマッチすることを意味します。そのため、アラインメント中の 75% 以上の配列が任意の位置で同じ塩基を持つ場合は、その位置はプライマー中で縮重されません。もしすべての配列のすべての変異塩基がプライマーに含まれるようにしたい場合は、コンセンサスしきい値を 100% に設定します。

OK をクリックすると、コンセンサス配列に 1 組のプライマーペアが追加されます。フォワードプライマーにマウスオーバーしてツールチップを表示させると、このプライマーには、Y、M、B、R の文字で指定された 4 つの縮重部位があることがわかります。これらの文字は塩基の IUPAC 表記で、その位置の塩基の組み合わせを指定しています。[これらのコードのリストはこちら](#)をご参照ください。このプライマーの Degeneracy score は 24 で、PCR の成功には妥当な値であると考えられます。

また、プライマー配列中の 2 番目の位置は、アラインメント中で 1 つの配列だけがこの位置にバリエーション塩基(T)を持ち、5/6(83%)の配列がプライマーにマッチしていて、設定した 75%のしきい値より大きいため、縮重されていません。

各プライマーのアノテーションをクリックし、**Extract** で抽出することで他の解析でも使用できるように保存することができます。