

PCR プライマーの設計

[GeneFisher](#) と [GeneWalker](#) のサイトを利用した PCR 用ユニバーサルプライマーの設計と確認方法の概説。

設計元配列の取得

特定分類群全体で利用可能なユニバーサルプライマーの設計には設計元の配列が必要。まずは何という遺伝子の領域を使うかを定める。これには、対象分類群内でそれなりに系統的に遠そうなゲノムが解読されている種間でゲノム対ゲノムの [BLAST](#) を行ったり、過去の研究から当たりを付ける。遺伝子に当たりが付けられない場合はそのまま次へ。

ターゲットとする領域が決まったら、[NCBI Taxonomy Browser](#) で対象分類群か、対象分類群を含む上位分類群名を入力して検索 分類群名を選択 右上の「Entrez records」テーブル内にある「Nucleotide」を選択してその分類群の塩基配列データリストを表示させる。検索ボックスに遺伝子名やキーワードを追加して絞り込む。必要なら 1000:5000[SLen] などと入力して配列の長さでも絞り込む(この例では 1000 ~ 5000bp に絞り込んでいる)。これを利用すると遺伝子に当たりが付けられなかった場合でも良さげな場所を探しやすい。

リストを十分絞り込むことができたなら、「Display」「Show」「Send to」をそれぞれ「GenBank」「最大値」「File」にして配列を根こそぎダウンロードする。[BioEdit](#) の配列取得機能を使う場合は「File

Retrieve sequences from GenBank or GenPept」で入力ボックスを表示させてから、[NCBI](#) のリスト表示を「GI List」「最大値」「Text」にして「全て選択 コピー [BioEdit](#) の Retrieve sequences from GenBank ボックスに貼り付け」ることで [BioEdit](#) に配列を取得させることができる(ただしあまり高速ではない)。配列の取得は、日本の場合ゲノムネットの [GenBank データベース](#) から取得すると高速。[DBGET の使い方](#) を踏まえて URL を入力すれば一発で大量の配列をダウンロードできる。[こちら](#)に DBGET からの配列ダウンロードを補助する CGI を設置してあるので、[NCBI](#) のリスト表示を「Brief」「最大値」「Text」にして「全て選択 コピー」し、フォームに貼り付けて submit すれば配列を取得できます。

コンセンサス配列を用意する

[GeneFisher](#) サイトでもアライメントとコンセンサス配列生成はできるが、データが大きい場合はサーバに負担をかけてしまうので好ましくない。そこで、自前で予めコンセンサス配列を用意して [GeneFisher](#) に送ることにする。

まず、対象となる複数の塩基配列をアライメントする。[ClustalW](#) なり [MAFFT](#) なり好きなものを使えばよい。アライメントが終わったらコンセンサス配列を得る。[BioEdit](#) なら「Alignment Create Consensus Sequence」で一発。

GeneFisher によるユニバーサルプライマー設計

コンセンサス配列ができたなら、[GeneFisher](#) のサイトに送る。FASTA 形式でフォームに貼り付けるか配列ファイルを指定する。[BioEdit](#) なら配列を選択して「Edit Copy sequences to clipboard (Fasta Format)」。

プライマーデザインパラメータとしては、プライマーの長さ・GC 含量・Tm 値・PCR プロダクトの長さを指定する。また、3' 末端の指定塩基数分の GC 含量と末端の塩基も指定できる。以下に推奨設定を記す。

パラメータ	値
Length	18-25bp
GC content	30-60%
Tm	45-60
Product Size	500-1500bp
3' length	2bp
3' GC content	50%
End primer with	ACGT

これでいくつかのプライマーセットができあがる。

GeneWalker によるプライマーのチェック

コンセンサス配列の生成に用いた配列のどれかの、プライマーで増幅する範囲を Target sequence に貼り付けて Format。Primer 1 と 2 には forward 側と reverse 側のプライマーを貼り付ける。「Primer dimers」「2:ary struct」「Anneal」でそれぞれできそうなプライマーダイマー・二次構造・アニールする箇所の確認ができる。[NCBI](#) の [e-PCR](#) も併用するとなお良し。