

Primer Express[®] **ソフトウェア**

TaqMan[®] プローブ検索のための
簡易操作ガイド : Rev.C

研究用のみ使用できます。診断目的およびその手続き上での使用はできません。

(For Research use only. Not for use in diagnostic procedure.)

Applied Biosystems, ABI PRISM and its design, Primer Express and Sequence Navigator are registered trademarks and AB (Design), Applera, ABI, TAMRA and Factura are trademarks of Applera Corporation or its subsidiaries in the US and certain other countries.

TaqMan is a registered trademark of Roche Molecular Systems, Inc.

SYBR is a registered trademark of Molecular Probes, Inc.

Stuftit Expader is a trademark of Aladdin Systems, Inc.

PageMaker is a registered trademark of Adobe Systems Incorporated.

Microsoft and Windows are registered trademarks of Microsoft Corporation.

Macintosh and Mac are registered trademarks of Apple Computer, Inc.

本誌に記載の社名および製品名は、弊社または各社の商標または登録商標です。

The PCR process and 5' nuclease process are covered by patents owned by Roche Molecular Systems, Inc. and F. Hoffmann-La Roche Ltd.

©2001 Applied Biosystems Japan Ltd., All rights reserved.

Contents

1 Primer Express[®] ソフトウェアの概要	1-1
本書について	1-2
概要	1-2
注意すべき用語	1-2
ソフトウェアのバージョンについて	1-2
Primer Express [®] ソフトウェアについて	1-3
概要	1-3
Primer Express [®] ソフトウェアの特徴	1-3
当社へのお問い合わせ	1-5
2 Primer Express[®] ソフトウェアのインストール 2-1	
Primer Express [®] ソフトウェアの使用システム環境	2-2
使用システム環境	2-2
Primer Express [®] ソフトウェアのインストール	2-3
概要	2-3
Macintosh [®] 版 v1.5 のインストール	2-3
Windows [®] 版 v2.0 のインストール	2-4
Primer Express [®] ソフトウェア を初めて使用する時に行う操作	2-5
複数の PX Archive ファイルの作成	2-6
使用メモリの増加方法	2-7
使用メモリを増やす必要性について	2-7
使用メモリの増加が必要な時	2-7
使用メモリの増加方法	2-7

3 Primer Express[®] ソフトウェアページ 3-1

ページとタブ	3-2
ページ名及びタブ名	3-2
ページの表示	3-3
ダイナミックリンク	3-3
標準の Sequence ページ	3-4
標準の Sequence ページについて	3-4
Sequence ページの例	3-4
DNA 配列のファイル形式	3-5
特徴	3-5

4 TaqMan[®] プローブ及びプライマーの検索 . 4-1

TaqMan [®] プローブ及びプライマーの検索	4-2
TaqMan [®] プローブ及びプライマーの検索	4-2
TaqMan [®] プローブ・プライマーセットが検索された場合	4-5
検索結果の表示	4-5
TaqMan [®] プローブ配列の確認	4-8
その他の選択の基準	4-10
TaqMan [®] プローブ・プライマーセットが検索されなかった場合 . 4-11	
変更条件の確認	4-11
Interim Results 画面の確認	4-11
Map ページでの T _m 値及び G C% の確認	4-12
検索条件の変更	4-12
検索結果の保存	4-15
概要	4-15
Save コマンドを使用した保存方法	4-15
単独のファイルとしての保存方法	4-16
選択したセットの配列情報のみを保存する方法	4-17
設計のガイドライン	4-19

5 条件を設定して検索する方法 5-1

Annotation Tools について	5-2
概要	5-2

Annotation Tools パレット	5-2
Tool のタイプ	5-3
パレットの移動	5-3
塩基配列情報の選択及び移動	5-4
概要	5-4
塩基配列の選択	5-4
塩基配列のコピー	5-4
Annotation の変更	5-5
Annotation の削除	5-6
Annotation の削除	5-7
Annotation の削除	5-7
全ての Annotation の削除	5-7
TaqMan [®] プローブの指定	5-8
概要	5-8
TaqMan [®] プローブの指定	5-8
TaqMan [®] プローブの指定の変更	5-9
検索対象外の配列の指定	5-10
概要	5-10
検索対象外の配列の指定	5-10
検索対象外の配列の指定位置等の変更	5-10
Forward Primer の指定	5-11
概要	5-11
Forward Primer の指定	5-11
Forward Primer の指定位置等の変更	5-12
Forward Primer の 3' 末端塩基の指定	5-13
概要	5-13
Forward Primer の 3' 末端塩基の指定	5-13
Forward Primer の 3' 末端塩基の指定等の変更	5-14
Reverse Primer の指定	5-15
概要	5-15
Reverse Primer の指定	5-15
Reverse Primer の指定位置等の変更	5-16
Reverse Primer の 3' 末端塩基の指定	5-17
概要	5-17
Reverse Primer の 3' 末端塩基の指定	5-17

Forward Primer の 3' 末端塩基の指定等の変更	5-18
指定の DNA 配列から翻訳されたアミノ酸配列の表示	5-19
概要	5-19
指定の DNA 配列から翻訳されたアミノ酸配列の表示	5-19
ORF の指定の変更	5-20
特定の塩基配列のラベル	5-21
概要	5-21
特定の塩基配列のラベル	5-21
ラベル位置の指定等の変更	5-22
ジャンクション部位の指定	5-23
概要	5-23
使用目的	5-23
ジャンクション部位の指定	5-23
ジャンクション部位の指定等の変更	5-24
ジャンクション部位の指定の削除	5-24
制限酵素切断部位等のサイトの指定	5-25
概要	5-25
制限酵素切断部位等のサイトの指定	5-25
サイトの指定等の変更	5-26
サイトの指定の削除	5-26

6 補足情報 6-1

相補鎖に対する TaqMan [®] プローブの検索方法	6-2
概要	6-2
相補鎖に対する TaqMan [®] プローブの検索方法	6-2
total gene 配列からイントロンを削除する方法	6-4
概要	6-4
total gene 配列からイントロンを削除する方法	6-4
特定のプライマー配列の T _m 値の算出の方法	6-6
概要	6-6
特定のプライマー配列の T _m 値の算出方法	6-6
特定の塩基配列の検索方法	6-8
概要	6-8
特定の塩基配列の検索方法	6-8

TaqMan [®] MGB プローブ	6-10
概要	6-10
構造	6-10
特徴	6-10
TaqMan [®] MGB プローブ設計のガイドライン	6-11
TaqMan [®] MGB プローブの設計	6-11

Primer Express® ソフトウェアの概要

1

この章では以下の項目についてご説明いたします。

Topic	Page
本書について	1-2
Primer Express® ソフトウェアについて	1-3
当社へのお問い合わせ	1-5

本書について

概要

本書では主に Primer Express® ソフトウェアを用いて TaqMan® プローブ及びプライマーを検索する方法についてご説明します。

注意すべき用語

本書では通常の本文部分とは別に、以下の2種の説明部を設けています。それぞれの " 注意すべき用語 " には、特定の順守事項や体諸事項が掲載されています。安全性や適性なソフトウェア作動にとって重要ですので充分ご注意ください。

注記 注意事項が記述してあることを示します。

重要 適正なソフトウェア作動に必要な事柄を説明します。

ソフトウェアのバージョンについて

この簡易操作ガイドは挿入図を含め全て Macintosh® 版の v1.5 を元に作成しました。

v1.5 と旧 v1.0 との相違点は注記しました。

Windows® 版の v2.0 の操作方法は全て v1.5 と共通です。

旧 v1.0 をお持ちの方で v1.5 へのアップデートをご希望の場合は弊社テクニカルサポートまでご連絡下さい。

Primer Express® ソフトウェアについて

概要

Primer Express®ソフトウェアはPCRやシーケンスのアプリケーションのためのオリゴの設計及び解析を行うソフトウェアです。

Primer Express® ソフトウェアの 特徴

種々の PCR アプリケーション及びシーケンシングアプリケーションに対応

Primer Express®ソフトウェアは種々のPCRアプリケーション及びシーケンシングアプリケーション別の特異的なドキュメントを用いることにより、そのアプリケーション用のオリゴヌクレオチドの設計、解析を行うことのできるソフトウェアです。

Primer Express® ソフトウェアのドキュメント

アプリケーションとソフトウェア	ドキュメントタイプ
PCR	<ul style="list-style-type: none">◆ DNA PCR◆ RT - PCR◆ Nested PCR◆ Allele Specific PCR◆ Multiplex PCR◆ TaqMan® Probe & Primer Design◆ TaqMan® MGB Probe & Primer Design
DNA シーケンシング	<ul style="list-style-type: none">◆ Cycle Sequencing◆ Sequencing Primer
バッチプロセス機能	<ul style="list-style-type: none">◆ Batch Processing
プライマーテスト機能	<ul style="list-style-type: none">◆ Primer Test◆ TaqMan® MGB Probe Test

注記 上記ドキュメントタイプはPrimer Express® ソフトウェア v1.5 及び v2.0 の場合です。v1.0 では含まれていないドキュメントタイプがあります。

バッチプロセス機能

複数の同じアプリケーションドキュメントまたは異なったアプリケーションドキュメントに対する PCR プライマー及び TaqMan® プローブを同時に設計、検索を可能にする Batch Processing ドキュメントが含まれています。

プライマーテスト機能

さらに Primer Express® ソフトウェアは2つのプライマー配列を入力すると瞬時に各プライマーの Tm 値 (Nearest Neighbor 法による計算)、GC%、また潜在的な2次構造、プライマーダイマー形成の推測ができる Primer Test ドキュメントも含まれています。

多くのドキュメントを一度に表示可能

Primer Express® ソフトウェアは一度に表示できるドキュメントの数に機能上制限はありません。しかしながら、Primer Express® ソフトウェアに割り当てられた RAM の容量と読み込むファイルのサイズと数が、プライマー及びプローブの検索スピードに影響します。

当社へのお問い合わせ

Primer Express® ソフトウェアや Sequence Detection アプリケーション、TaqMan® プローブや Polymerase Chain Reaction (PCR) についてご不明な点がございましたら、弊社スタッフにお問い合わせ下さい。

お問い合わせ先の住所、電話番号は以下の通りです。

アプライドバイオシステムズジャパン株式会社

テクニカルサポート

テクニカルサポート	東京都中央区八丁堀 4-5-4 フリーダイヤル：0120-477392 TEL：03-5566-6530 FAX：03-5566-6538
-----------	--

営業所

東京	東京都中央区八丁堀 4-5-4 TEL：03-5566-6100 FAX：03-5566-6501
名古屋	愛知県名古屋市千種区池下町 2-15 TEL：052-764-1201 FAX：052-764-1202
大阪	大阪府吹田市広芝町 10-2 8 TEL：06-6389-1201 FAX：06-6389-1206
福岡	福岡県福岡市中央区赤坂 1-6-10 TEL：092-771-2755 FAX：092-771-2756

Primer Express®

ソフトウェアのインストール

2

この章では以下の項目について掲載いたします。

Topic	Page
Primer Express® ソフトウェアの使用システム環境	2-2
Primer Express® ソフトウェアのインストール	2-3
使用メモリの増加方法	2-7

Primer Express® ソフトウェアの使用システム環境

Macintosh® 版 v1.5 の使用シ ステム環境

Primer Express®ソフトウェア v1.5を使用するためには下記の条件を満たしていることが必要です。

Macintosh モデル	7200	4400	G3	G4
Macintosh® OS	7.6.1	7.6.1/8.0	8.5.1/8.6	9.0
RAM メモリー	32MB	32MB	64MB	64MB
バーチャルメモリーの設定	OFF	OFF	OFF	OFF
ハードディスクの空き容量	40MB			

重要 OS 8.1 はアプリケーションとの間で問題が発生するため使用しないで下さい。

注記 Primer Express®ソフトウェア v1.0 の使用システム環境は以下の通りです。

Macintosh® モデル	68003, 68040, PowerPC
Macintosh® OS	最低 : Mac OS 7.1 推奨 Mac OS 7.5 以上 Mac OS 7.1 の場合 Thresad Manager がインストールされていることが必要
RAM メモリー	8MB 推奨 16MB 以上
バーチャルメモリーの設定	OFF
ハードディスクドライブ	80MB 以上

Windows® 版 v2.0 の使用シス テム環境

Primer Express®ソフトウェア v2.0を使用するためには下記の条件を満たしていることが必要です。

コンピューターモデル	Pentium® III 搭載の PC コンピューター
Windows® OS	Windows® NT 4.0 Service Pack 3 以上
ハードディスクドライブ	80MB 以上

Primer Express® ソフトウェアのインストール

概要


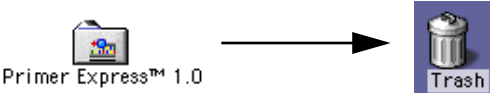
Primer Express® ソフトウェアのインストール方法について、Primer Express® ソフトウェア v1.5 for Macintosh® と Primer Express® ソフトウェア v2.0 for Windows® とそれぞれご説明致します。

重要 殆どのソフトウェアのインストールマニュアルに記述されているように、インストール中にはいずれのウイルス防止ソフトウェアも使用不能にしておく必要があります。インストールが完了しましたらウイルス防止ソフトウェアを使用可能状態に戻して下さい。

Macintosh® 版 v1.5 の インストール

Primer Express® ソフトウェア v1.5 for Macintosh® のインストール方法についてご説明します。

Primer Express® ソフトウェア v1.5 をインストールするには：

Step	操作
1	<p>Primer Express® ソフトウェア v1.0 をご利用の場合、Primer Express™ 1.0 フォルダ内の PXArchive ファイルを保存します。</p> <ol style="list-style-type: none">Primer Express™ 1.0 フォルダを開きます。PXArchive ファイルをデスクトップ上にドラッグします。  <p>PXArchive</p> <ol style="list-style-type: none">Primer Express™ 1.0 フォルダを閉じます。 <p>注記 Primer Express® v1.0 をご利用でない場合このステップの操作は必要ありません。</p>
2	<p>Primer Express™ 1.0 フォルダを Trash (ゴミ箱) に入れます。</p>  <p>Primer Express™ 1.0</p> <p>注記 Primer Express™ v1.0 をご利用でない場合このステップの操作は必要ありません。</p>
3	<p>Primer Express® ソフトウェア v1.5 インストール CD を CD-ROM ドライブにセットします。</p>

Primer Express® ソフトウェア v1.5 をインストールするには：

Step	操作
4	インストーラーアイコンをダブルクリックしソフトウェアによる指示に従ってインストールを実行して下さい。 インストール中、Primer Epxress® 1.5 インストーラーは古いバージョンのプログラムファイルを全て上書きします。インストールは自動で行われ、既に存在するファイルを変更したりコンピューターの再起動を行う必要はありません。
5	インストールが終了したら Quit ボタンをクリックしインストーラーを終了させます。
6	Step 1 でデスクトップ上に移動した PX Archive ファイルを新規にインストールされた Primer Express® 1.5 フォルダ内にドラッグします。 注記 Primer Express® v1.0 をご利用でない場合このステップの操作は必要ありません。

Windows® 版 v2.0 のインストール

Primer Express®ソフトウェアv2.0 for Windows®のインストール方法についてご説明します。

Primer Express® ソフトウェア v2.0 をインストールするには：

Step	操作
1	Primer Express®ソフトウェアv2.0 インストールCDをCD-ROMドライブにセットします。
2	Setupアイコンをダブルクリックしソフトウェアによる指示に従ってインストールを実行して下さい。
3	インストールが終了したら Finish ボタンをクリックしインストーラーを終了させます。

Primer Express® ソフトウェアを 初めて使用する 時に行う操作

重要 インストール後 Primer Express® ソフトウェアを初めて使用するときに Registration Code を入力することが必要です。Primer Express® ソフトウェア v1.0 からのアップデートの場合、v1.0 の Registration Code をそのまま入力して下さい。Registration Code は CD-ROM と同梱の SOFTWARE REGISTRATION カードに記載されています。Registration Code が無い場合は弊社までお問い合わせ下さい。

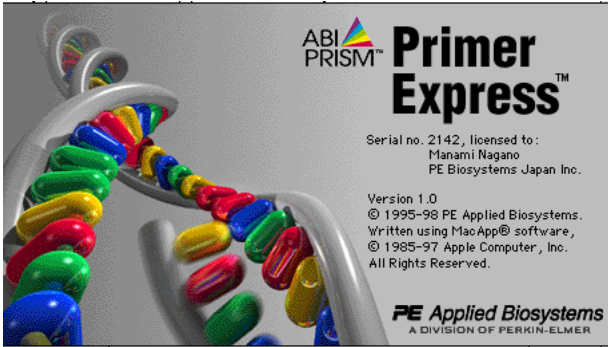
Primer Express® ソフトウェアを初めて使用する時に行う操作は：

Step	操作
1	<p>Primer Express® ソフトウェアのアイコンをダブルクリックします。</p> <p>Registration Code 入力画面が表示されます。</p> <p>注記 PX Archive ファイルまたは Preference File を移動させたり除去したりした場合は、再度 Registration Code を入力し直す必要があります。</p>
2	<p>Registration Code を入力し OK ボタンをクリックします。</p> <p>Registration Code が受理されると、プライマーデザイン情報を保存するための archive file を指定するように指示がでます。</p>
3	<p>Primer Express® ソフトウェア v1.0 から移動した PX Archive ファイルがある場合はこのファイルを選択し、Open ボタンをクリックします。</p> <p>新規にインストールを行った場合は PX Archive ファイルを作成します。</p> <ol style="list-style-type: none">New ボタンをクリックします。名称及び保存場所を指定する画面が表示されます。保存場所が Primer Express® フォルダになっていることを確認して Save ボタンをクリックすると PX Archive ファイルが作成されます。

複数の PX Archive ファイルの作成

同一のコンピュータで何人かのユーザーのプライマー検索データを保存する場合でも 1 つの PX Archive ファイルがあれば充分ですが、何らかの理由で異なった別の PX Archive ファイルを作成したい場合にはいつでも作成することができます。PX Archive ファイルはデータを保存するのに用いられ、個人的にあるいは所属別のデータのプレファレンスとファイル管理には幾つかの個々の PX Archive ファイルが必要になります。

新しい別の PX Archive ファイルを作成するには：

Step	操作
1	Primer Express® ソフトウェアを終了します。
2	プログラムを開始するために Primer Express® アイコンをダブルクリックします。
3	PX Archive ファイル作成のためのダイアログボックスが表示されるまで、スプラッシュスクリーンが表示されると同時に Primer Express®ソフトウェアv1.0またはv1.5の場合 option キーを、Primer Express®ソフトウェア v2.0 の場合は Alt キーを押し続けます。 
	[Primer Express® のスプラッシュスクリーン] 注記 古い PX Archive ファイルを残しておきたい時は、新しい Archive ファイルを別名で保存する必要があります。
4	新しい PX Archive ファイルを作成するために New ボタンをクリックします。
5	新しい PX Archive ファイルに名前を付け、保存場所を指定して Save ボタンをクリックします。

使用メモリの増加方法

使用メモリを増やす必要性について

注記 Primer Express® ソフトウェア v2.0 では以下の操作を行うことはできません。

Primer Express® ソフトウェアを起動した際、Primer Express® プログラムはある一定の RAM を使用します。使用中にメモリが不足した場合は、Primer Express® ソフトウェアに割り当てられるメモリ容量を増やすことができます。

使用メモリの増加が必要な時

以下の例の様な場合、Primer Express® ソフトウェアのメモリ容量を増やして使用する必要があります。

- ◆ 多くのドキュメントを同時に開くとき
- ◆ インポートしたシーケンスファイルが非常に大きいとき
- ◆ 多くの配列を含むバッチドキュメントや Multiplex PCR ドキュメントで操作を行うとき

使用メモリの増加方法

使用メモリを増やすには：

Step	操作
1	必要なファイルを保存し、Primer Express® ソフトウェアを終了します。
2	ファインダー上で Primer Express® ソフトウェアのアイコンをクリックし、さらに File メニューの Get Info (情報を見る) を選択します。
3	ダイアログボックスが表示されたら、Preferred Size (使用サイズ) エントリーフィールドの値を 1,000K まで増やします。
4	Get Info (情報を見る) ダイアログボックスを閉じます。 増加分のメモリーは Primer Express® ソフトウェアを次回開いた時に割り当てられます。 注記 もしメモリー不足が解消されない場合は、十分な処理速度が得られるまで Preferred Size (使用サイズ) を増やして下さい。

Primer Express® ソフトウェアページ

3

この章では以下の項目についてご説明いたします。

Topic	Page
Primer Express® ソフトウェアページについて	3-2
標準の Sequence ページ	3-4

Primer Express® ソフトウェアページについて

ページとタブ

Primer Express® ソフトウェアの各ドキュメントは Batch Processing ドキュメントと Primer Test ドキュメントおよび TaqMan® MGB Probe Test ドキュメント以外は 7つのページから構成されており、また各ページには以下のように固有のタブが付いています。



ページ名及びタブ名

各ページに相当するタブ名は以下の通りになっております。

ページ名	タブ名	使用目的
Sequence	Sequence	配列データの入力及び注釈
Parameters	Params	Primer の Tm 値や長さ、増幅産物の Tm 値は長さ、GC%、繰り返し塩基数及び 5' 末端等々のスペックの設定
Reaction Condition	Rxn Cond	DNA 濃度、塩濃度、Mg 濃度の設定及び PCR 酵素の選択
Primers	Primers	検索された Primer セットの表示とソート
Map	Map	検索された Primer セットのグラフィック表示及びソートと、配列の Tm / GC% のグラフィック表示
Recipe	Recipe	PCR の反応系の算出及びプロトコールのプリントアウト
Results	Results	検索された Primer を用いた PCR 反応の結果の記録

注記 Recipe ページと Results ページには PCR 反応の諸条件が表示されますが、実際の反応条件はご使用になる弊社の試薬商品によって異なりますので、各試薬商品毎のプロトコールに準じて PCR 反応の諸条件を設定することが必要です。

ページの表示

Primer Express® ソフトウェアの各ページをみるには、相当するタブをクリックします。

ダイナミック リンク

Primer Express® ソフトウェアは異なったページで配列データ、プライマーデータ、アノテーション等を変更することができます。Primer Express® ソフトウェアの各ページは他の全てのページとリンクしていますので、1つのページでデータを分類したり、プライマーを検索させたりするとその結果は全てのページに反映します。

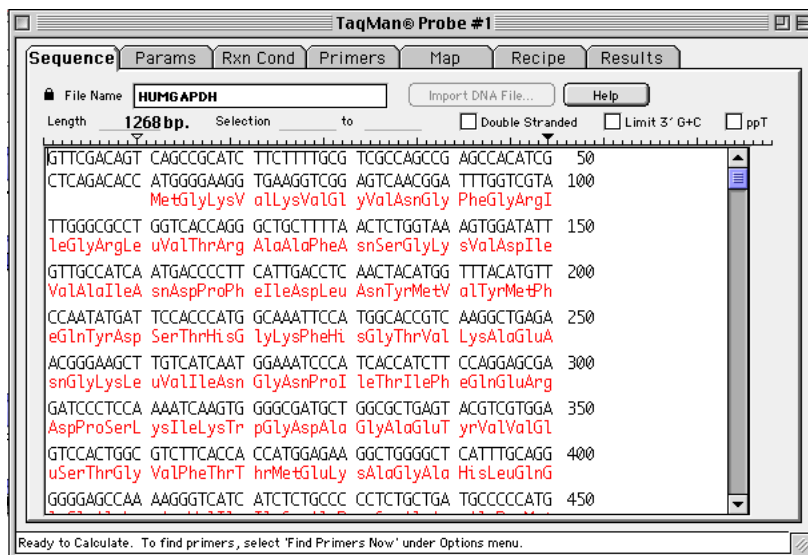
標準の Sequence ページ

標準の Sequence ページについて

標準の Sequence ページでは 1 つ以上の sequence ファイルを読み込ませることができます。この標準の Sequence ページは、特殊な Sequence ページをもつ Allelic Specific PCR ドキュメントと Sequence ページをもたない Batch Processing ドキュメント、Primer Test ドキュメントを除く全てのドキュメント上に表示されます。

Sequence ページの例

下図は DNA PCR ドキュメントの Sequence ページの例になります。ここでは仮に HUMGAPDH という sequence ファイルが読み込まれています。



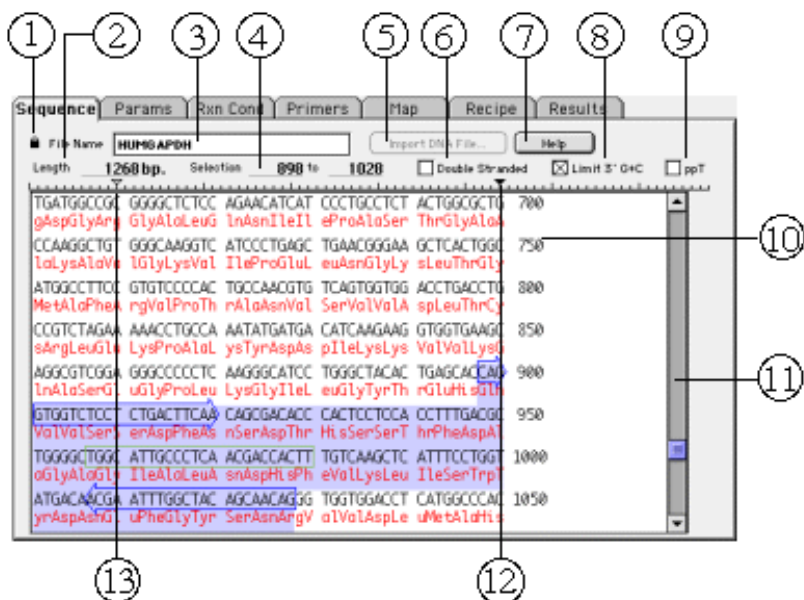
DNA 配列のファイル形式

Primer Express® ソフトウェアで読み込むことが可能な DNA 配列のファイル形式は以下の通りになります。

- ◆ Factura™
- ◆ Sequence Navigator®
- ◆ ABI 373/377/310 sample files
- ◆ GeneWorks
- ◆ GenBank
- ◆ EMBL
- ◆ ABIF
- ◆ GCG
- ◆ FASTA
- ◆ plain text files

特徴

Sequence ページの特徴は以下の通りになります。



注記 Primer Express® ソフトウェア v1.0 では 8 と 9 のチェックボックスがありません。

Sequence ページの特徴

No.	項目	説明
1	Sequence Data Lock	このアイコンは配列データがロックされているか否かを示します。ロックを解除するにはこのアイコンをクリックします。配列データがロックされていれば Sequence ページ上のどのテキストもカット、ペースト、ドラッグすることはできません。配列を読み込ませる際は、ロックを解除しないかぎりその配列はデフォルトでロックされます。
2	Length	Length フィールドは Sequence ページ上に表示されている配列の塩基数を示します。Sequence ファイルが読み込まれていない場合は '0bp' と表示されます。
3	File Name	File Name フィールドはドキュメントに読み込ませた配列の名前が表示されます。Multiplex PCR ドキュメントでは読み込まれた全ての配列の名前はポップアップメニューで表示されます。読み込まれた sequence ファイルが無い場合はこのフィールドには 'No File Loaded' と表示されます。表示されている名前を変更したい場合はその名前の部分をハイライトにし新しい名前を入力します。
4	Selection	Selection フィールドにはハイライトされた最初と最後の塩基番号を表示します。
5	Import DNA File Button	このボタンは標準の Macintosh file nabigation ダイアログボックスを介して Sequence ファイルを読み込ませる機能をもっています。Multiplex PCR ドキュメントでは、複数の配列の Sequence ファイルを読み込ませることができます。Sequence ファイルを読み込ませると、このボタンはグレイアウト（反転表示）になります（Multiplex PCR は例外）。
6	Double Stranded View Checkbox	Double Stranded チェックボックスにチェックを入れると両鎖の配列データを表示させることができます。

No.	項目	説明
7	Help button	このボタンは Primer Express® ソフトウェアガイドオンラインヘルプ機能から Sequence ページに関する特異的なヘルプを得るためのものです。Primer Express® ソフトウェアガイドを機能させるために Macintosh System7.5 以上の OS が必要となります。
8	Limit 3' G+C Checkbox	Limit 3' G+C チェックボックスにチェックを入れるとプライマーの 3' 末端から 5 塩基以内に G または C が二個以下のセットのみを検索します。
9	ppT Checkbox	ppT チェックボックスにチェックを入れると Turbo TaqMan® プローブを検索することができます。
10	Sequence Data Pane	Sequence ページのこの部分は、読み込まれた配列、若しくはキーボードで入力された配列データが表示されます。
11	Scroll Bar	Sequence Data Pane に表示されている配列以外より多くの配列データが読み込まれていると、表示されていない他の全ての配列データが見れるようにページの右側にスクロールバーが表示されます。

No.	項目	説明
12	Line Length Control	<p>配列データは Sequence Data Pane 上のフォーマットを最高 120bp/line まで変更することができます。1 ラインあたりの長さは Sequence Data Pane のすぐ右上にあるスライダーコントロール（黒塗りの矢印）で変更することができます。各ラインの最後の塩基対の連続番号は Sequence Data Pane の右マージンに表示されます。配列データは 20-120bp の長さで表示できます。</p> <p>ラインあたりの表示塩基長を変えるには：</p> <ol style="list-style-type: none"> a. 長くするにはウインドウの水平サイズを大きくします。 b. カーソルをスライダーコントロール上におきます。カーソルがスライダーコントロールカーソルに変わります。 c. スライダーコントロールカーソルをドラッグして長さを変えます。 <p>長くするには右方向にドラッグし、短くするひは左方向にドラッグします。</p>

No.	項目	説明
13	Base Grouping Control	<p>配列データは読みやすいようにヌクレオチドの一定の区分形式で表示させることができます。</p> <p>デフォルトの 1 区分は 10 塩基です。Sequence Data のすぐ左上にあるスライダーコントロール（白抜きの矢印）によって区分単位を変更することができます。</p> <p>スライダーコントロールのすぐ下にある定規は区分単位を示します。</p> <p>配列データは 1-120 塩基対の単位で区分でき、また区分無しで表示させることもできます。</p> <p>区分単位を変更するには</p> <ol style="list-style-type: none"> a. スライダーコントロール上にカーソルをおきます。するとカーソルがスライダーコントロールカーソルに変わります。 b. スライダーコントロールをドラッグして区分単位を変更します。 <ul style="list-style-type: none"> ◆ 区分単位を長くするには右方向へドラッグします。 ◆ 短くするには左方向へドラッグします。 ◆ 区分を無くすためには左端までドラッグします。

TaqMan® プローブ 及びプライマーの 検索

4

この章では以下の項目についてご説明いたします。

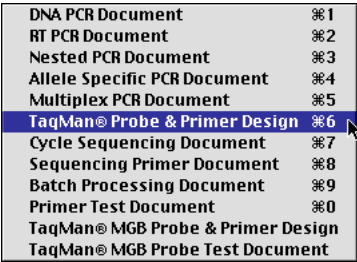
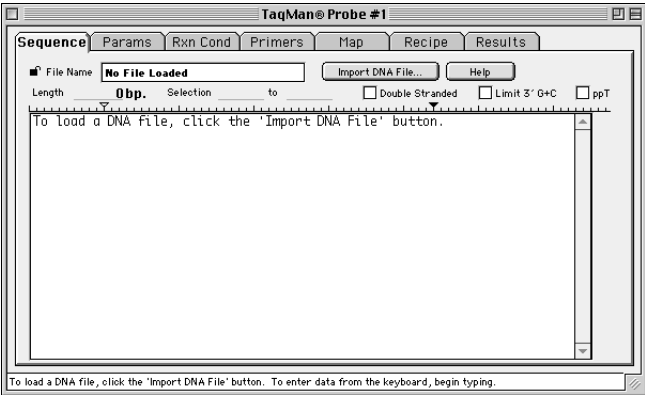
Topic	Page
TaqMan® プローブ及びプライマーの検索	4-2
TaqMan® プローブ・プライマーセットが検索された場合	4-5
TaqMan® プローブ・プライマーセットが検索されなかった場合	4-11
検索結果の保存	4-15
設計のガイドライン	4-19

TaqMan® プローブ及びプライマーの検索

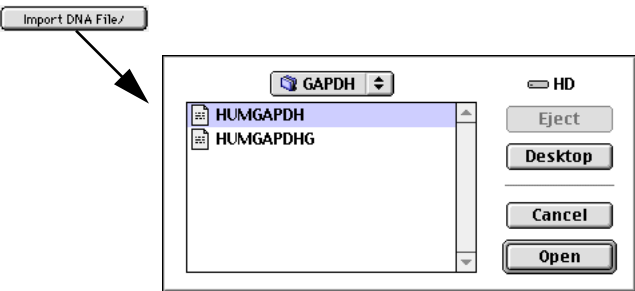
TaqMan® プローブ及びプライマーの検索

プローブ及びプライマーの検索を行います。

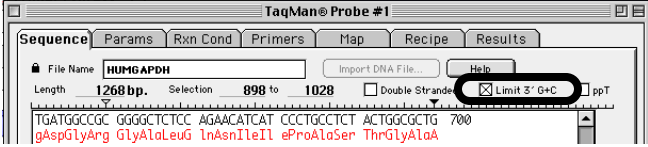
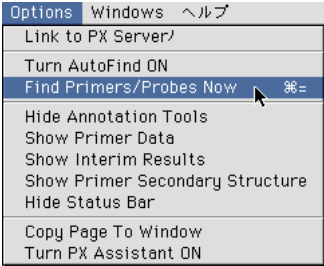
TaqMan® プローブ及びプライマーの検索をするには：

Step	操作
1	<p>Primer Express® ソフトウェアが起動した状態で、File メニューの New サブメニューより TaqMan® Probe & Primer Design を選択し、新規の TaqMan® Probe ドキュメントを開きます。</p>   <p>注記 上記 New サブメニューは Primer Express® ソフトウェア v1.5 の場合です。Primer Express® ソフトウェア v1.0 の場合には含まれていないドキュメントタイプがあります。</p>

TaqMan® プローブ及びプライマーの検索をするには：

Step	操作
2	<p data-bbox="517 183 1224 264">TaqMan® Probe ドキュメントに検索対象となる配列の入力を行います。そのままタイプして入力することも可能ですが、以下の形式のファイルであればそのまま読み込むことができます。</p> <ul data-bbox="517 284 880 690" style="list-style-type: none">◆ Factura™◆ Sequence Navigator®◆ ABI 373/377/310 sample files◆ GeneWorks◆ GenBank◆ EMBL◆ ABIF◆ GCG◆ FASTA◆ plain text files <p data-bbox="517 711 1081 735">上記ファイルを直接読み込む方法は下記の通りです。</p> <p data-bbox="517 743 1231 800">a. 画面右上の Import DNA File ボタンをクリックすると、ダイアログボックスが表示されます。</p> <div data-bbox="571 824 1206 1112" style="border: 1px solid black; padding: 5px;"></div> <p data-bbox="517 1149 1231 1239">b. 読み込ませるファイルを選択し、開く（若しくは Open）をクリックするとその配列が読み込まれ、Sequence ページに表示されます。</p> <p data-bbox="517 1258 1224 1398">注記 Microsoft® Word や PageMaker® のようなワープロ・ページレイアウトプログラムでフォーマットされたファイルを読み込ませることはできません。これらのアプリケーションプログラムから配列を読み込ませる時には、一旦そのファイルをフォーマットされていないテキストファイルで保存をして下さい。</p>

TaqMan® プローブ及びプライマーの検索をするには：

Step	操作
3	<p>画面右上の "Limit 3' G+C" チェックボックスにチェックを入れます。</p>  <p>注記 Primer Express® ソフトウェア v1.0 の場合はチェックボックスがありません。そのまま次の Step4 に進みます。</p>
4	<p>Options メニューから Find Primers/Probes Now を選択します。</p>  <p>選択したと同時に自動的に TaqMan® プローブ及びプライマーの検索が行われます。下部の status バーに検索の進行状況が随時表示されます。</p>
5	<p>検索が終了すると、以下のいずれかのメッセージが Status バーに表示されます。</p> <ul style="list-style-type: none"> ◆ A total (n) primer pairs found. To examine primer pairs, click the 'Primers' tab (n) 個のプローブ/プライマーセットが検索された、という表示です（最大 200 個まで検索結果は表示されます）。検索結果の表示方法については 5-7 ページをご参照下さい。 ◆ No Acceptable Primer Pairs Found. To determine why the search failed, use the 'Interim Results' window. 全く検索できなかった場合に上記の様に表示されます。この場合検索条件等の変更が必要になります。詳細につきましては 5-12 ページ以降をご参照下さい。

TaqMan® プローブ・プライマーセットが検索された場合

検索結果の表示

検索結果は Sequence ページ、Primers ページ及び Map ページ上で確認することができます。

Sequence ページ

Primer Express® ソフトウェアが適当な TaqMan® プローブとプライマーセットを 1 つ以上検索することができた場合、最も優先順位の高いセットが Sequence ページ上に表示されます。優先順位は Penalty Score によって決定されます。TaqMan® プローブとプライマーセットが Sequence ページの表示されると、増幅される領域がハイライトで表示されます。そして 2 つのプライマーはカラーのアウトラインの矢印で、TaqMan® プローブはカラーのアウトラインボックスでそれぞれ表示されます。

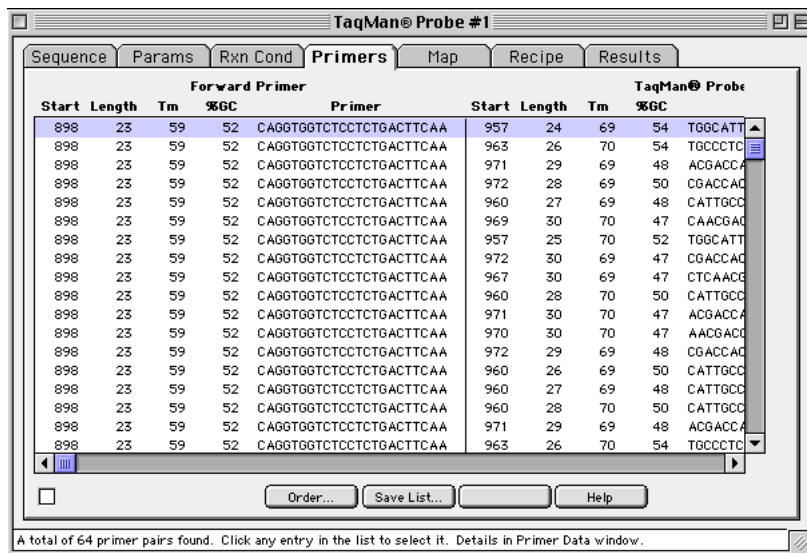
The screenshot shows the 'Sequence' tab of the 'TaqMan® Probe #1' software. The file name is 'HUMGAPDH'. The sequence length is 1268 bp, and the selection range is from 898 to 1028. The sequence is displayed with various amino acid translations and primer binding sites highlighted in blue. The interface includes tabs for Sequence, Params, Rxn Cond, Primers, Map, Recipe, and Results. The sequence is as follows:

```
TGATGGCCGC GGGGCTCTCC AGAACATCAT CCCTGCCTCT ACTGGCGCTG 700
gAspGlyArg GlyAlaLeuG lnAsnIleI eProAlaSer ThrGlyAlaA
CCAAGGCTGT GGGCAAGGTC ATCCCTGAGC TGAACGGGAA GCTCACTGGC 750
laLysAlaVa lGlyLysVal IleProGluL euAsnGlyLy sLeuThrGly
ATGGCCTTCC GTGTCCCCAC TGCCAACGTG TCAGTGGTGG ACCTGACCTG 800
MetAlaPheA rgValProTh rAlaAsnVal SerValValA spLeuThrCy
CCGTCTAGAA AAACCTGCCA AATATGATGA CATCAAGAAG GTGGTGAAGC 850
sArgLeuGlu LysProAlaL ysTyrAspAs pIleLysLys ValValLysG
AGGCGTCGGA GGGCCCCCTC AAGGGCATCC TGGGCTACAC TGAGCACCCAG 900
lnAlaSerGl uGlyProLeu LysGlyIleL euGlyTyrTh rGluHisGTh
GTGGTCTCCT CTGACTTCAA CAGCGACACC CACTCCTCCA CCTTTGACGC 950
ValValSerS erAspPheAs nSerAspThr HisSerSerT hrPheAspAl
TGGGGCTGGC ATTGCCCTCA ACGACCACCTT TGTC AAGCTC ATTTCTGGT 1000
aGlyAlaGly IleAlaLeuA snAspHisPh eValLysLeu IleSerTrpT
ATGCAACGA ATTTGGCTAC AGCAACAGGG TGGTGGACCT CATGGCCAC 1050
yrAspAshGl uPheGlyLyr SerAsnArgV alValAspLe uMetAlaHis
```

A total of 64 primer pairs found. To examine primer pairs, click the 'Primers' tab.

Primers ページ

Primers ページでは Status バーに示された検索数の TaqMan® プローブ・プライマーセットが全て表示されます。横一列が一つの TaqMan® プローブ・プライマーセットになります。最も優先順位の高いセットから順次リストアップされています。優先順位は Penalty Score によって決定されていますが、各セット毎の Penalty Score は一番右側の Penalty の項目に表示されています。ハイライト表示されている一つのセットが Sequence ページで表示されているセットに相当します。このハイライト表示されるセットは、クリックすることにより変更することが可能です。Primers ページ上でハイライト表示のセットを変更すると、Sequence ページ上で表示されるセットも自動的に変更され、Primers ページ上でハイライト表示されているセットが Sequence ページ上でも表示されます。

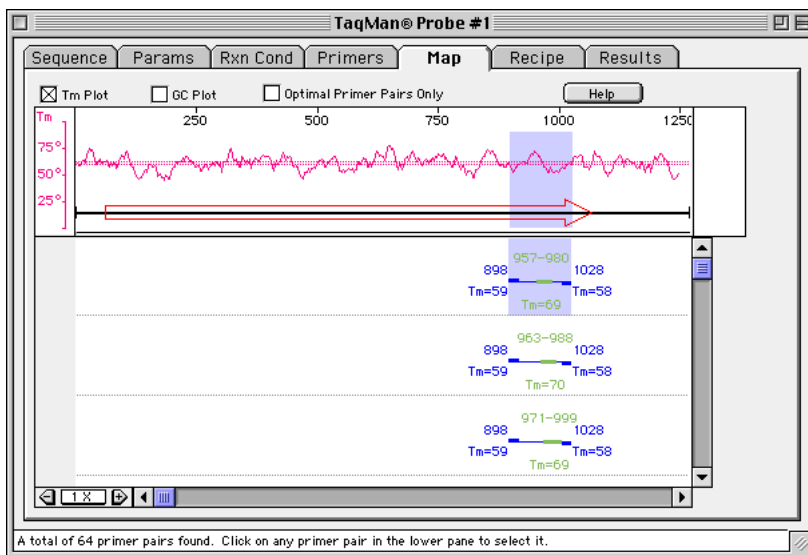


Forward Primer					TaqMan® Probe				
Start	Length	Tm	%GC	Primer	Start	Length	Tm	%GC	
898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	957	24	69	54	TGGCATT
898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	963	26	70	54	TGCCCTC
898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	971	29	69	48	ACGACCA
898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	972	28	69	50	CGACCA
898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	960	27	69	48	CATTGCC
898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	969	30	70	47	CAACGAC
898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	957	25	70	52	TGGCATT
898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	972	30	69	47	CGACCA
898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	967	30	69	47	CTCAACC
898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	960	28	70	50	CATTGCC
898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	971	30	70	47	ACGACCA
898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	970	30	70	47	AACGACC
898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	972	29	69	48	CGACCA
898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	960	26	69	50	CATTGCC
898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	960	27	69	48	CATTGCC
898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	960	28	70	50	CATTGCC
898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	971	29	69	48	ACGACCA
898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	963	26	70	54	TGCCCTC

A total of 64 primer pairs found. Click any entry in the list to select it. Details in Primer Data window.

Map ページ

Map ページでは Status バーに示された検索数の TaqMan® プローブ・プライマーセットが全て表示されます。検索に用いた全体の配列内での TaqMan® プローブ・プライマーの位置が図式で表示されます。またこのページでは配列全体の Tm 値や GC% を図式で確認することができます。ハイライト表示されている一つのセットが Sequence ページで表示されているセットに相当します。このハイライト表示されるセットは、クリックすることにより変更することが可能です。



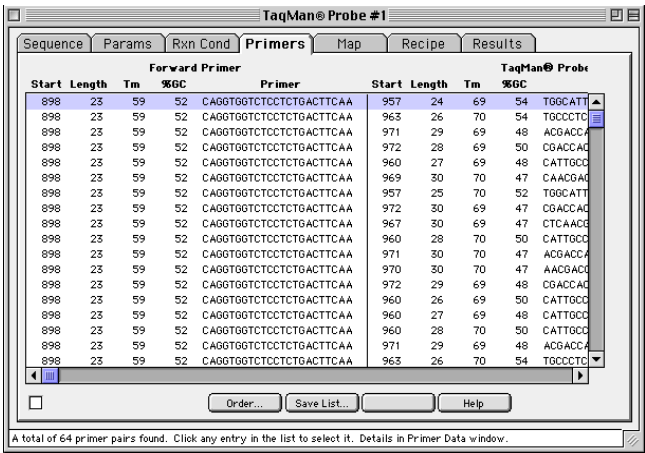
Sequence ページ、Primers ページ及び Map ページはそれぞれリンクしており、Primers ページ及び Map ページでのハイライト表示のセットの変更はそのまま Sequence ページ上でも変更されます。

TaqMan® プローブ配列の確認

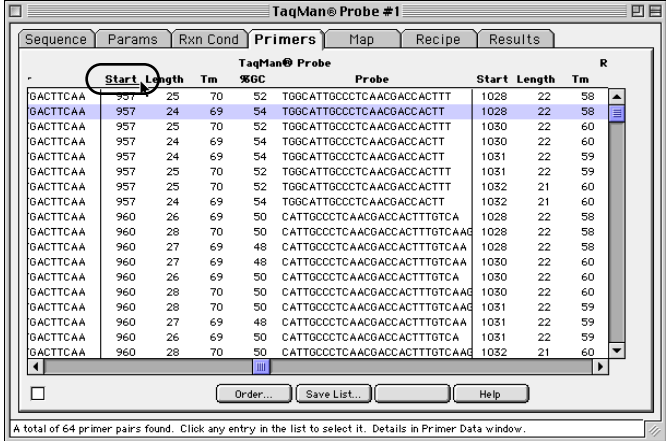
検索結果が得られたら、TaqMan® プローブの配列の確認を行います。TaqMan® プローブの配列はGよりもCの数が多いものを選択しますが、この項目については Primer Express® ソフトウェアは自動検索を行いませんので、得られた結果の中からマニュアルで選択を行うことが必要です。

注記 Primer Express® ソフトウェア v1.0 の場合、プライマーの3' 末端から5塩基以内にGまたはCが二個以下のものを選択する項目についての自動検索が行われないため、得られた結果の中からマニュアルで選択を行うことが必要です。

TaqMan® プローブの配列を確認するには：

Step	操作																																																																																																																		
1	<p>TaqMan® プローブ及びプライマーの検索を行い結果が得られたら Primer タブをクリックして Primer ページを表示します。</p>  <p>The screenshot shows the 'Primers' tab in the Primer Express software. The window title is 'TaqMan® Probe #1'. The interface includes tabs for 'Sequence', 'Params', 'Rxn Cond', 'Primers', 'Map', 'Recipe', and 'Results'. The 'Primers' tab is active, displaying a table with columns: 'Start', 'Length', 'Tm', '%GC', 'Forward Primer', and 'TaqMan® Probe'. The table lists 64 primer pairs. The first few rows are as follows:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Start</th> <th>Length</th> <th>Tm</th> <th>%GC</th> <th>Forward Primer</th> <th>TaqMan® Probe</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>898</td> <td>23</td> <td>59</td> <td>52</td> <td>CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA</td> <td>957 24 69 54 TGGCATT</td> </tr> <tr> <td>898</td> <td>23</td> <td>59</td> <td>52</td> <td>CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA</td> <td>963 26 70 54 TGCCCTC</td> </tr> <tr> <td>898</td> <td>23</td> <td>59</td> <td>52</td> <td>CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA</td> <td>971 29 69 48 ACACCAC</td> </tr> <tr> <td>898</td> <td>23</td> <td>59</td> <td>52</td> <td>CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA</td> <td>972 28 69 50 CGACCAC</td> </tr> <tr> <td>898</td> <td>23</td> <td>59</td> <td>52</td> <td>CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA</td> <td>960 27 69 48 CATTGCC</td> </tr> <tr> <td>898</td> <td>23</td> <td>59</td> <td>52</td> <td>CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA</td> <td>969 30 70 47 CAACGAC</td> </tr> <tr> <td>898</td> <td>23</td> <td>59</td> <td>52</td> <td>CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA</td> <td>957 25 70 52 TGGCATT</td> </tr> <tr> <td>898</td> <td>23</td> <td>59</td> <td>52</td> <td>CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA</td> <td>972 30 69 47 CGACCAC</td> </tr> <tr> <td>898</td> <td>23</td> <td>59</td> <td>52</td> <td>CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA</td> <td>967 30 69 47 CTCACAC</td> </tr> <tr> <td>898</td> <td>23</td> <td>59</td> <td>52</td> <td>CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA</td> <td>960 28 70 50 CATTGCC</td> </tr> <tr> <td>898</td> <td>23</td> <td>59</td> <td>52</td> <td>CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA</td> <td>971 30 70 47 ACGACCAC</td> </tr> <tr> <td>898</td> <td>23</td> <td>59</td> <td>52</td> <td>CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA</td> <td>970 30 70 47 ACGACCAC</td> </tr> <tr> <td>898</td> <td>23</td> <td>59</td> <td>52</td> <td>CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA</td> <td>972 29 69 48 CGACCAC</td> </tr> <tr> <td>898</td> <td>23</td> <td>59</td> <td>52</td> <td>CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA</td> <td>960 26 69 50 CATTGCC</td> </tr> <tr> <td>898</td> <td>23</td> <td>59</td> <td>52</td> <td>CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA</td> <td>960 27 69 48 CATTGCC</td> </tr> <tr> <td>898</td> <td>23</td> <td>59</td> <td>52</td> <td>CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA</td> <td>960 28 70 50 CATTGCC</td> </tr> <tr> <td>898</td> <td>23</td> <td>59</td> <td>52</td> <td>CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA</td> <td>971 29 69 48 ACGACCAC</td> </tr> <tr> <td>898</td> <td>23</td> <td>59</td> <td>52</td> <td>CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA</td> <td>963 26 70 54 TGCCCTC</td> </tr> </tbody> </table> <p>At the bottom of the window, a status bar reads: 'A total of 64 primer pairs found. Click any entry in the list to select it. Details in Primer Data window.'</p>	Start	Length	Tm	%GC	Forward Primer	TaqMan® Probe	898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	957 24 69 54 TGGCATT	898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	963 26 70 54 TGCCCTC	898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	971 29 69 48 ACACCAC	898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	972 28 69 50 CGACCAC	898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	960 27 69 48 CATTGCC	898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	969 30 70 47 CAACGAC	898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	957 25 70 52 TGGCATT	898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	972 30 69 47 CGACCAC	898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	967 30 69 47 CTCACAC	898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	960 28 70 50 CATTGCC	898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	971 30 70 47 ACGACCAC	898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	970 30 70 47 ACGACCAC	898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	972 29 69 48 CGACCAC	898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	960 26 69 50 CATTGCC	898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	960 27 69 48 CATTGCC	898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	960 28 70 50 CATTGCC	898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	971 29 69 48 ACGACCAC	898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	963 26 70 54 TGCCCTC
Start	Length	Tm	%GC	Forward Primer	TaqMan® Probe																																																																																																														
898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	957 24 69 54 TGGCATT																																																																																																														
898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	963 26 70 54 TGCCCTC																																																																																																														
898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	971 29 69 48 ACACCAC																																																																																																														
898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	972 28 69 50 CGACCAC																																																																																																														
898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	960 27 69 48 CATTGCC																																																																																																														
898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	969 30 70 47 CAACGAC																																																																																																														
898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	957 25 70 52 TGGCATT																																																																																																														
898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	972 30 69 47 CGACCAC																																																																																																														
898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	967 30 69 47 CTCACAC																																																																																																														
898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	960 28 70 50 CATTGCC																																																																																																														
898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	971 30 70 47 ACGACCAC																																																																																																														
898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	970 30 70 47 ACGACCAC																																																																																																														
898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	972 29 69 48 CGACCAC																																																																																																														
898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	960 26 69 50 CATTGCC																																																																																																														
898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	960 27 69 48 CATTGCC																																																																																																														
898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	960 28 70 50 CATTGCC																																																																																																														
898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	971 29 69 48 ACGACCAC																																																																																																														
898	23	59	52	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	963 26 70 54 TGCCCTC																																																																																																														

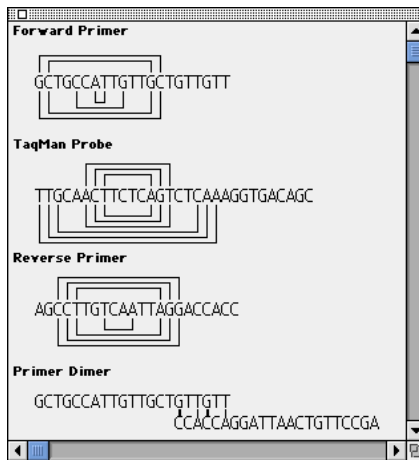
TaqMan® プローブの配列を確認するには：

Step	操作
2	<p>TaqMan® プローブの Start の文字をクリックすると、TaqMan® プローブの開始塩基数に合わせてソートがかり、ほぼ同一の TaqMan® プローブ毎に並び変えを行われます。</p>  <p>The screenshot shows a software window titled "TaqMan® Probe #1" with several tabs: Sequence, Params, Rxn Cond, Primers (selected), Map, Recipe, Results. Below the tabs is a table with columns: Start, Length, Tm, %GC, Probe, Start Length, Tm. The table contains 20 rows of probe data. The first row is highlighted in blue, and a mouse cursor is clicking on the "Start" column header. Below the table are buttons for "Order...", "Save List...", and "Help". At the bottom, a status bar reads: "A total of 64 primer pairs found. Click any entry in the list to select it. Details in Primer Data window."</p>
3	<p>同一の TaqMan® プローブの配列毎に G と C の数を確認し、G よりも C の数が多い TaqMan® プローブを選択します。</p>
4	<p>TaqMan® プローブの長さを確認します。そして 30 塩基以内の長さのものを選択します。</p> <p>注記 長い配列しか得られなかった場合、TaqMan® MGB プローブで設計を行うことにより長さを短縮することができます。</p>
5	<p>注記 このステップは Primer Express® ソフトウェア v1.0 を使用したときに行います。</p> <p>選択した TaqMan® プローブとセットになっているプライマーの配列を確認し、フォワードとリバース共に 3' 末端から 5 塩基以内に G または C が 2 個以下のセットを選択します。</p>

その他の選択の基準

TaqMan® プロープの配列を確認した後にまだ候補が数多く残っている場合の選択の基準について以下にご説明致しますがあくまで選択の指針の一助としてお考え下さい。

- ◆ プライマーの 3' 末端同士でプライマーダイマーを構築する可能性のあるものは避けます。
Optionsメニューから Show Primer Secondary Structure を選択するとプライマー及びプローブ分子内とプライマー分子間の塩基対形成をシュミレートした図が表示されます。Primers ページを表示した状態でハイライトのセットを変更すると Primer Secondary Structure も連動して図が切り換わります。その中で Primer Dimer として示されたプライマーダイマー予測構造が数のように 3' 末端同士で塩基対を形成するものは避けたほうが良いかもしれません。



TaqMan® プローブ・プライマーセットが検索されなかった場合

変更条件の確認

検索終了後 Status フィールドに 'No Acceptable Primer Pairs Found' というメッセージが表示され Primer Express® ソフトウェアが適当な TaqMan® プローブ・プライマーセットを全く検索できなかった場合、適切なセットが検索されるまで検索条件を緩める等の処置が必要になります。

はじめに検索結果が得られない原因になっている項目の確認を行います。そのために

- ◆ Interim Results 画面を見る
- ◆ Map ページで Tm 値及び GC% の確認をする

この二つの操作を行います。

Interim Results 画面の確認

Optionsメニューから Show Interim Resultsを選択すると Interim Results 画面が表示されます。

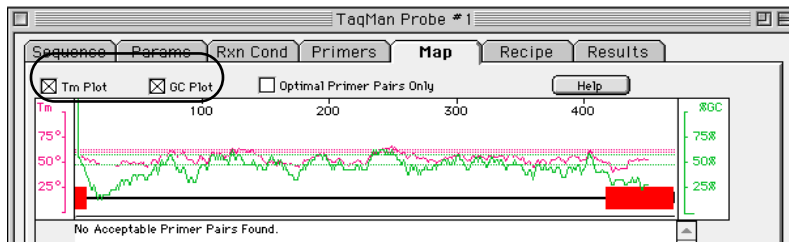
Interim Results	
Total Number Primers Tested	11466
Number Passing Ambig Test	12186
Number Passing Clamp Test	8124
Number Passing GC Test	3033
Number Passing Tm Test	266
Number Passing Repeat Test	315
Number Passing Secondary Struc Test	247
Number Passing Primer Site Unique Test	208
Total Number Primer Pairs Tested	2751
Number Passing Amplicon Length Test	0
Number Passing Avoid Excludes Test	0
Number Passing Tm Match Test	0
Number Passing Amplicon Tm Test	0
Number Passing Target Test	0
Number Passing Primer Dimer Test	0
Number TaqMan Probes Tested	5733
Number Passing Start Residue Test	24
Number Passing Tm Test	156

左の項目が各検索条件にあたり、右の数値はその検索条件に対してパスした配列の数を示しています。パスした配列の数が0の項目になった最も上段のテストが検索時に障害となっている項目に相当し、その項目の条件を緩めることがまず必要になります。

上記の例では Amplicon Length Test、つまり増幅長の設定項目で検索結果が得られなかったことが確認できます。

Map ページでの Tm 値及び GC% の確認

配列全体の Tm 値及び GC% の確認は Map ページで行うことができます。



Tm Plot 及び GC Plot のチェックボックスにチェックを入れます。

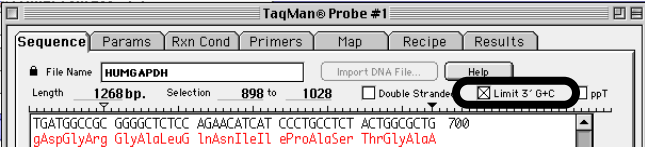
赤い線が Tm 値の変動を、緑の線が GC% の変動を表しています。横に引かれている点線は、それぞれ現在設定されている条件の上限と下限を表しています。

そして条件とかなり異なっている場合、条件を実際の配列の値に近づけるようにします。

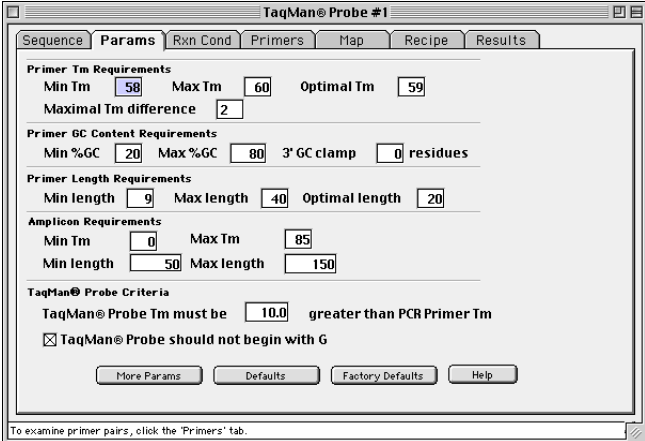
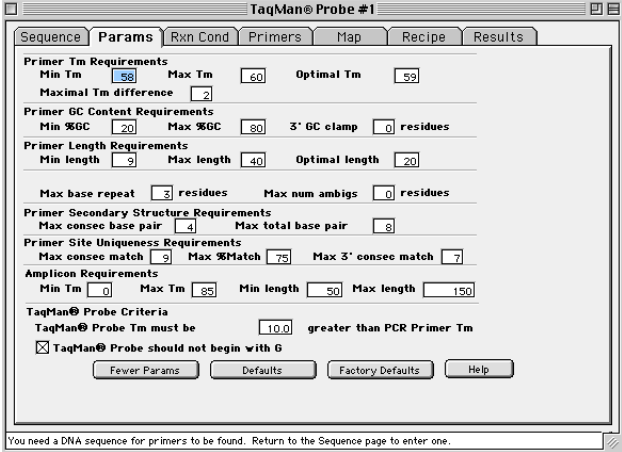
検索条件の変更

検索条件の変更は下記の通りに行います。

検索条件の変更を行うには：

Step	操作
1	Map ページで確認したときに GC% が高い配列の場合は、Sequence ページ画面右上の "Limit 3' G+C" チェックボックスのチェックを外します。 
2	Options メニューから Find Primers/Probes Now を選択します。 検索結果が得られなかった場合は Step3 に進みます。

検索条件の変更を行うには：

Step	操作
3	<p>Params タブをクリックし Params ページを表示します。</p>  <p>画面左下の More Params ボタンをクリックすると詳細が表示され ます。</p> 

検索条件の変更を行うには：

Step	操作
4	<p>Interim Results 及び Map ページで得られた情報を元に、条件の変更を行います。変更可能な項目は下記の通りです。</p> <ul style="list-style-type: none">◆ Primer Tm Requirement のうち Min Tm (55°C まで)、Max Tm 及び Optimal Tm。◆ Amplicon Requirement の諸項目。GC% が高い場合 Max Tm を 85 から 90 まで変更可能 (但し PCR の変性ステップの時間を長くする等の変更を行うことが必要になる場合があります)。◆ TaqMan® Probe Requirement の Tm 値の値を 10 から 7 まで変更可能。プライマーとプローブ間の Tm 値の有意差をつけにくい配列に有効。
5	変更後 Sequence タブをクリックし Sequence ページを表示します。
6	Options メニューから Find Primers/Probes Now を選択します。
7	検索結果が得られるまで Step3 から 6 を繰り返します。

検索結果の保存

概要

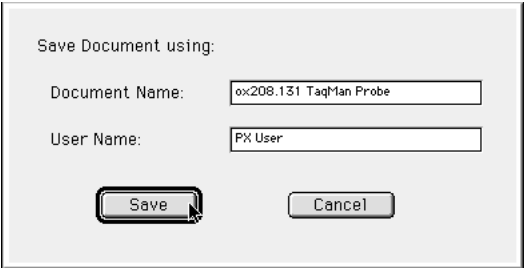
検索結果毎にプレートドキュメントを保存することができます（但し Primer Test ドキュメントは保存することができません）。通常の保存の操作では、保存されたデータは全て PX Archive ファイル内に保存されます。ドキュメント毎に単独のファイルとして保存したい場合は、保存ではなく出力を行うことが必要になります。

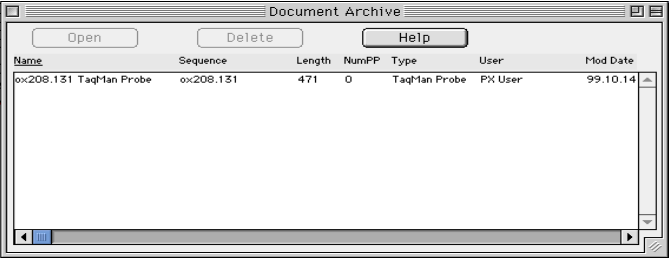
この項目では Save コマンドを使用した PX Archive ファイル内への保存方法と単独のファイルとしての保存方法の二つの方法についてご説明します。

また選択した TaqMan® プローブ及びプライマーセットの配列のみをテキストファイルとして保存する方法についてご説明します。

Save コマンドを使用した保存方法

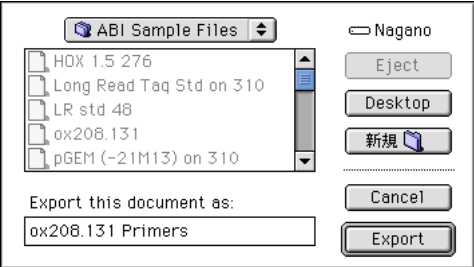

Save コマンドを使用して保存するには：

Step	操作
1	保存をするドキュメントを開いた状態で、File メニューより Save 又は Save As（別名で保存）を選択します。
2	Document Name と User Name の入力欄が表示されます。Document Name には "(Sequence Name) + TaqMan Probe" の形で自動入力され、User Name にはソフトウェアの User Name がそのまま入力されます。変更は可能ですので、適宜変更を行い、Save をクリックします。 

Step	操作
3	<p>Saveしたファイルを再度開く時にはPrimer Epxress®ソフトウェアを起動した状態で File メニューより Open を選択すると、Archive ファイル内に保存されているファイルの一覧が表示されますので、その中から指定のファイルを選択し、Open をクリックします。</p> 

単独のファイルとしての保存方法

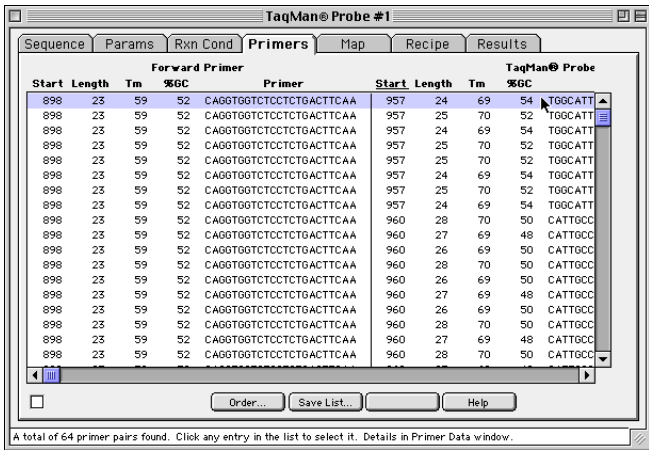
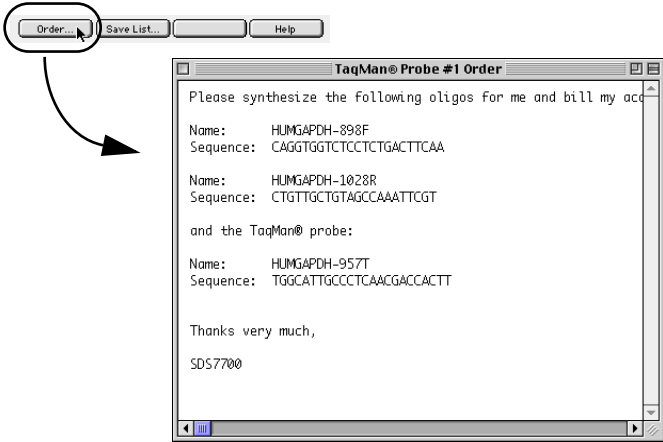
単独のファイルとして保存するには：

Step	操作
1	保存をするドキュメントを開いた状態で、File メニューから Export を選択します。
2	<p>ファイル名とデータの出力先の指定を行う画面が表示されますので、ファイル名を入力し出力先の指定を行って Export ボタンをクリックします。</p> 
3	<p>出力されたドキュメントファイルは下記のようなアイコンで表示されます。再度開くときにはこのアイコンをダブルクリックすると開くことができます。</p>  <p>ox208.131 Primers</p>

選択したセットの配列情報のみを保存する方法

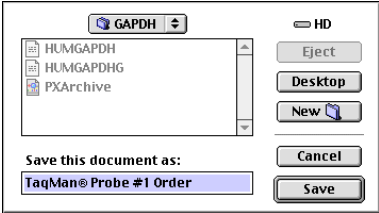
選択した TaqMan® プローブ及びプライマーセットの配列のみをテキストファイルとして保存する方法についてご説明します。

選択したセットの配列情報のみを保存するには：

Step	操作
1	<p>検索後 Primer ページ上で選択した TaqMan® プローブ及びプライマーセットをハイライトで選択します。</p> 
2	<p>画面下の Order ボタンをクリックします。</p> <p>Step1 で選択した TaqMan® プローブ及びプライマーの配列が表示されたテキストファイルが開きます。</p> 

内容の追加や削除が必要な場合はファイル上で変更を行います。

選択したセットの配列情報のみを保存するには：

Step	操作
3	<p data-bbox="467 183 1170 207">File メニューより Save を選択すると下記の画面が表示されます。</p> <div data-bbox="502 224 881 435"><p>The screenshot shows a 'Save this document as' dialog box. At the top, there is a dropdown menu showing 'GAPDH' and a drive indicator 'HD'. Below this is a list box containing three items: 'HUMGAPDH', 'HUMGAPDHG', and 'PXArchive'. To the right of the list box are buttons for 'Eject', 'Desktop', and 'New'. Below the list box is a text field labeled 'Save this document as:' containing the text 'TaqMan® Probe #1 Order'. To the right of this field are buttons for 'Cancel' and 'Save'.</p></div> <p data-bbox="467 467 1170 524">ファイル名の入力と保存する場所の選択を行い、Save ボタンをクリックします。</p>

設計のガイドライン

TaqMan® プローブ及びプライマーの設計ガイドラインとして以下の基準が設定されております。プライマーの設計ガイドラインは、SYBR® Green の実験系にもあてはまります。

TaqMan® プローブ ガイドライン	Sequence Detection プライマー ガイドライン (SYBR® Green 又は TaqMan® アッセイ)
まず初めに TaqMan® プローブを選択し、次に TaqMan® プローブと近接している (但しオーバーラップはしない) プライマーセットを選択します。 (増幅産物鎖長が 50-150bp 以内のものを強く推奨します。)	
GC 含量は 20-80% の範囲内で選択します。	
同一塩基の連続を避けて下さい。特に G に注意を払い、G が 4 塩基以上連続するものは避ける必要があります。	
Primer Express® ソフトウェア上で Tm 値を 68-70°C に設定します。	Primer Express® ソフトウェア上で Tm 値を 58-60°C に設定します。
5' 末端に G があつてはいけません。	プライマーの 3' 末端から 5 塩基以内に G または C の塩基が 2 個以下の配列を選択します。 **
G よりも C がより多く含まれている TaqMan® プローブを選択します。 *	

注記 * の項目については、Primer Express® ソフトウェアは自動検索を行いませんので、検索終了後に目視で確認することが必要です。

注記 ** の項目については、Primer Express® ソフトウェア v1.5 は自動検索を行いますが、v1.0 では行いませんので、検索終了後に目視で確認することが必要です。

Primer Express® ソフトウェアの初期設定では増幅産物鎖長を 50-150bp 以内のものを選択するように設定されています。増幅産物鎖長は反応効率をより高くするために短いものがより望ましいです。また反応効率の高い反応系では標準曲線を必要としない comparative Ct method による比較定量が可能になります。

TaqMan® プローブ及びプライマーの GC 含量は 20-80% の範囲内で選択をする必要があります。GC% が高すぎると反応中に変性が充分におきない可能性があり、その場合反応効率が落ちてしまいます。さらに GC% が高い場合は分子間の相互作用を誘発し、増幅効率の低下及び SYBR® Green I アッセイの場合は非特異的なシグナルの増加が起きやすくなります。

非特異産物の増幅をさけるため、TaqMan® プローブ及びプライマーの配列内に 4 塩基以上の G 塩基の連続は避ける必要があります。

GC%が低い配列では設定したTm値を確保するためにTaqMan® プローブ及びプライマーの配列が長くなります。このことは定量実験にはそれほど影響はしませんが、但し TaqMan® プローブの長さが 40bp を越えると Quenching の効率が落ち、また合成時の回収率も落ちてしまうため注意が必要です。

ガイドラインに準じた Tm 値に TaqMan® プローブ及びプライマーを設定することで、標準の PCR 条件で反応を行うことができます。TaqMan® プローブのTm値はプライマーのTm値よりも8-10°C高く設定することが必要です。TaqMan® プローブがプライマーよりも早く鋳型にハイブリすることにより、プライマーから伸長反応を進めてきた DNA ポリメラーゼを待ち受けることができるようにするためです。

Primer Express® ソフトウェアでは 5' 末端に G が存在する TaqMan® プローブは検索されません。TaqMan® プローブが分解された後も G の塩基が Quencher の働きをしまうためです。TaqMan® プローブが分解された後の蛍光強度の増加が TaqMan® アッセイの重要なポイントになりますが、G が 5' 末端にあった場合この蛍光強度の増加が G により抑えられてしまいます。また「TaqMan® プローブの塩基配列中に G よりも C がより多い配列の方が Rn 値が大きくなる」という傾向があることが確認されています。Primer Express® ソフトウェアはこの点に関しては自動検索を行いませんので、目視で確認する必要があります。

プライマーの 3' 末端から 5 塩基以内に C または G の塩基が 2 塩基以内のものを選択するのは非特異的産物の増幅を防ぐためです。GC%が高い配列の場合は増幅産物鎖長 150bp 以下を保守するためにこの推奨条件を緩和する必要が生じますが、緩和した場合もプライマーの 3' 末に C または G の塩基が集中している配列はできるだけ避けるようにして下さい。

5

条件を設定して 検索する方法

この章では以下の項目について説明いたします。:

Topic	Page
Annotation Tools について	5-2
塩基配列情報の選択及び移動	5-4
Annotation の削除	5-7
TaqMan® Probe の指定	5-8
検索対象外の配列の指定	5-10
Forward Primer の指定	5-12
Forward Primer の 3' 末塩基の指定	5-13
Reverse Primer の指定	5-15
Reverse Primer の 3' 末塩基の指定	5-17
指定の DNA 配列から翻訳されたアミノ酸配列の表示	5-19
特定の塩基配列のラベル	5-21
ジャンクション部位の指定	5-23
制限酵素切断部位等のサイトの指定	5-25













Annotation Tools について

概要

Sequence ページを開いたときに Annotation Tools パレットが左上に表示されます。この 12 種の Annotation Tool を用いることにより配列上に各種情報を表示することができます。

Annotation Tools パレット

TaqMan® Probe ドキュメントを開いた時の Annotation Tools パレットは下記の様に表示されます。Annotation Tools パレットは Sequence ページを開いている時にのみ表示されます。この Tools を使ったプライマーやプローブの指定は全て Sequence ページ上で行います。

Select Tool		Eraser Tool	
TaqMan® Probe Tool		Exclude Region Tool	
Forward Primer Tool		Forward Primer End Tool	
Reverse Primer Tool		Reverse Primer End Tool	
ORF Tool		Line Tool	
Junction Tool		Site Tool	

Tool のタイプ

Annotation Tools は、プライマーの検索に影響しない Tool と、検索に影響するため設定後再検索が必要になる Tool の大きく二つのタイプに分けることができます。

タイプ	Tool
プライマー検索に影響しない Tool	<ul style="list-style-type: none">◆ Select◆ ORF◆ Line◆ Site
プライマー検索に影響するため設定後再検索が必要になる Tool	<ul style="list-style-type: none">◆ Eraser◆ TaqMan® Probe◆ Exclude◆ Forward Primer◆ Forward Primer End◆ Reverse Primer◆ Reverse Primer End◆ Junction

パレットの移動

パレットのタイトルバーをドラッグすることにより、画面上の任意の場所にパレットを移動することができます。

塩基配列情報の選択及び移動

概要

Select Tool を使用することにより、塩基配列を選択しコピーすることができます。

塩基配列の選択

Sequence ページの塩基配列上にカーソルを移動すると、カーソルの形が変化します。


塩基配列を選択するためには、塩基配列上でクリック及びドラッグしてハイライト表示させます。選択した配列は標準のコマンドを用いて削除やコピーをすることができます。

塩基配列のコピー

任意の塩基配列を Macintosh® のデスクトップ上のクリッピングファイル内にコピーすることができ、そしてさらに他のプログラム上で塩基配列を利用することができます。

注記 Primer Express® ソフトウェアの Drag-and Drop 機能を使用するために、Macintosh® のシステムソフトウェアが Mac® OS 7.5 以上であるか、または Mac® OS 7.1 の場合 Thread Manager がインストールされていることが必要です。

塩基配列をクリッピングファイルにコピーするには：

Step	操作
1	塩基配列のロックを解除します。 塩基配列のロックの解除に関する詳細につきましては 4-6 ページの "Sequence Data Lock" の項目をご参照下さい。
2	Select Tool をクリックします。 
3	コピーする塩基配列をドラッグしてハイライト表示させます。
4	カーソルを一旦ハイライト表示で選択されている部位から離します。
5	再度カーソルをハイライト表示で選択されている配列上に移動するとハンドカーソルに形が変化します。 注記 不透明のハンドカーソルは手首の部分に袖口が表示され、背後の配列情報はハンドカーソルで隠れて表示されます。透明のハンドカーソルは袖口部分が無く、背後の配列情報が透けて表示されます。

塩基配列をクリッピングファイルにコピーするには：

Step	操作
6	ハイライト表示で選択されている配列上でクリックし、そのままマウスのボタンを押し続けます。 ハンドカーソルが開いた手から結んだ手の形に変わります。
7	ハイライト表示で選択されている配列をデスクトップ上にドラッグします。 マウスのボタンを離すと、ハイライト表示で選択されていた配列が "Text Clipping" という名前のクリッピングファイルとして保存されます。
8	クリッピングファイルに新しい名前を付けるときは、ファイル名を一度クリックしハイライト表示させ、新しい名前を入力します。 クリッピングファイルを読んだり、また他のアプリケーションにドロップすることもできます。詳細につきましては英文マニュアル C-5 ページの "Clipping File" の項目をご参照下さい。

Annotation の 変更

Select Tool を使用して設定されている Annotation を移動したり長さを変更することができます。

Annotation を変更するには：

Step	操作
1	Tool バレット上の Select Tool をクリックします。
2	塩基配列上でハイライト表示されている部位があった場合、一度任意の位置でクリックをしてハイライト表示を消します。 注記 塩基配列上でハイライト表示されている部位があると Annotation の変更をすることはできません。
3	カーソルを Annotation 上若しくは Annotation が開始・終了している部位に合わせます。
4	カーソルが正しい位置にあっていいる時には、カーソルがハンドカーソルに変化します。
5	クリックし、そのままマウスのボタンを押し続けます。 Annotation が設定されている配列の末端が1塩基のみの小さなハイライトで表示されます。
6	ハイライトをドラッグすることにより Annotation の位置を移動したり、長さを変更することができます。

Annotation の 削除

殆どの（但し全てではありません）Annotation は Select Tool を使用して削除することができます。

TaqMan® Probe、Exclude、Forward Primer、Forward Primer End、Reverse Primer、Reverse Primer End、ORF と Line の各 Annotation は Annotation の一方の末端からもう一方の末端までドラッグをすることにより削除できます。

注記 Edit メニューより "Clear All Annotations" を選択することにより設定されている全ての Annotation を同時に削除することができます。

Annotation の削除

Annotation の 削除



Eraser Tool を使用することによりドキュメント上から Annotation を削除することができます。

Annotation を削除するには、Eraser ボタンをクリックし、Eraser カーソルの左端を削除する Annotation に合わせてクリックします。

注記 殆どの Annotation は Select Tool を用いて削除することが可能です。

全ての Annotation の 削除

設定されている全ての Annotation を一度に削除するには、Edit メニューから "Clear All Annotations" を選択します。

TaqMan® プローブの指定


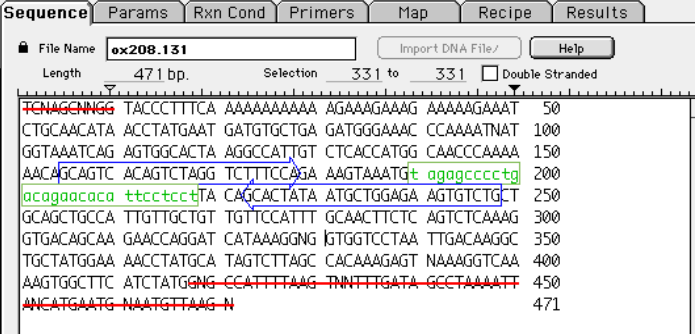
概要

TaqMan® Probe Toolを用いて TaqMan® プローブの配列の指定を行うことができます。TaqMan® Probe Tool は TaqMan® Probe ドキュメント専用の Tool になります。

注記 TaqMan® Probe は一度に一個所の指定しか行えません。一度指定を行ったのち別の部位で再度指定を行った場合、前回の指定は自動的に削除されます。

TaqMan® プローブの指定

Taq Man® プローブの指定を行うには：

Step	操作
1	TaqMan® Probe Tool をクリックします。  カーソルが緑色の I-beam カーソルに変化します。
2	カーソルを TaqMan® プローブの指定を行う塩基配列上に合わせます。
3	指定を行う配列をドラッグしてハイライト表示させます。マウスのボタンを離すと、ハイライト表示で選択されている配列が TaqMan® プローブとして指定されていることを示す緑色の小文字の配列へと変化します。 
4	指定した TaqMan® プローブに対するプライマーの検索を行うためには Options メニューより Find Probes/Primers Now を選択します。

TaqMan® プローブの指定の変更

TaqMan® プローブの指定範囲の変更や移動を Select Tool を用いて行うことができます。変更方法の詳細につきましては 6-5 ページの "Annotation の変更" の項目をご参照下さい。


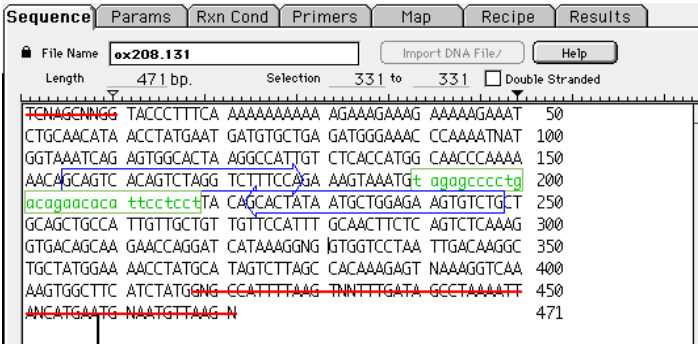
検索対象外の配列の指定

概要

Exclude Tool を用いることにより、検索の対象外とする配列部位の指定を行うことができます。

検索対象外の配列の指定

検索対象外の配列を指定するには：

Step	操作
1	Exclude Tool をクリックします。  カーソルが赤の I-beam カーソルに変化します。
2	検索対象外にする塩基配列の始まりの位置にカーソルを合わせます。
3	検索対象外にする塩基配列をドラッグしてハイライト表示で選択します。マウスのボタンを離すとハイライト表示で選択した塩基配列上に検索対象外として指定されたことを示す赤い横線が表示されます。  検索対象外の指定の Annotation

検索対象外の配列の指定位置等の変更

検索対象外の配列の指定範囲の変更や移動を Select Tool を用いて行うことができます。変更方法の詳細につきましては 6-5 ページの "Annotation の変更" の項目をご参照下さい。

Forward Primer の指定


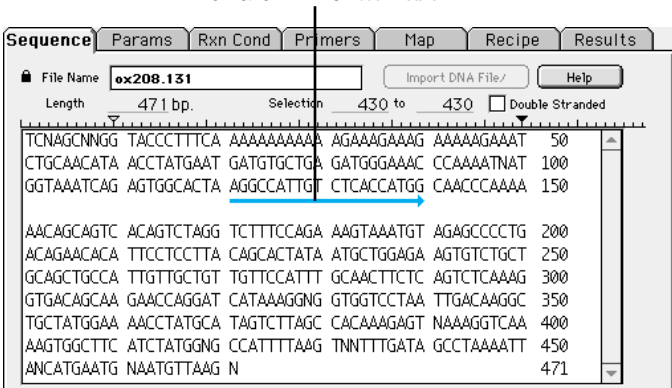
概要

Forward Primer Tool を用いることにより Forward Primer の配列を指定することができます。この Tool を用いて指定したプライマーは Params ページ上の検索条件を満たしている必要はありません。

注記 Forward Primer は一度に一個所の指定しか行えません。一度指定を行ったのち別の部位で再度指定を行った場合 (Forward Primer 3' End Tool を用いた場合を含みます) 前回の指定は自動的に削除されます。

Forward Primer の指定

Forward Primer の指定を行うには :

Step	操作
1	Forward Primer Tool をクリックします。  カーソルが青の I-beam カーソルに変化します。
2	カーソルを Forward Primer の指定を行う配列の一番初めの部位に合わせます。
3	クリック及びドラッグをして指定を行う配列をハイライト表示で選択します。マウスのボタンを離すとハイライトで選択した部位の下に青い矢印が入り、Forward Primer として指定されたことが画面上に表示されます。 <p style="text-align: center;">Forward Primer 指定部位</p> 

Forward Primer の指定位置等 の変更

Forward Primer の配列の指定範囲の変更や移動を Select Tool を用いて行うことができます。変更方法の詳細につきましては 6-5 ページの "Annotation の変更" の項目をご参照下さい。

Forward Primer の 3' 末端塩基の指定


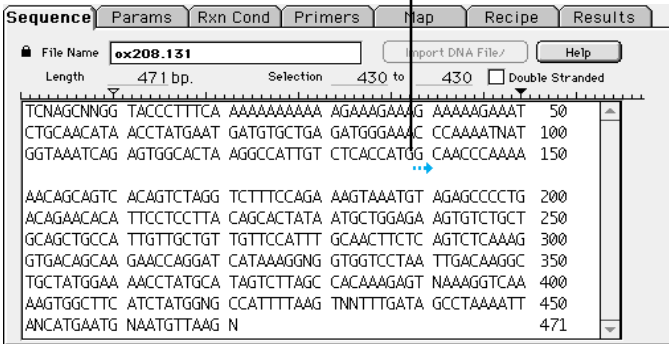
概要

Forward Primer 3'End Toolを用いてForward Primerの3'末端の塩基指定を行うことができます。この指定を行うと、Primer Express® ソフトウェアはこの塩基を 3' 末端に持つ Forward Primer のみを検索します。

注記 Forward Primer 3'End は一度に一個所の指定しか行えません。一度指定を行ったのち別の部位で再度指定を行った場合 (Forward Primer Tool を用いた場合を含みます) 前回の指定は自動的に削除されます。

Forward Primer の 3' 末端塩基の指定

Forward Primer の 3' 末端塩基を指定するには：

Step	操作
1	Forward Primer 3'End Tool をクリックします。  カーソルが青の I-beam カーソルに変化します。
2	カーソルを Forward Primer の 3' 末端塩基の指定を行う塩基に合わせます。
3	マウスをクリックすると Forward Primer の 3' 末端塩基の指定が行われたことを示す青の点線の矢印が画面に表示されます。 <p style="text-align: center;">Forward Primer 3'End 指定部位</p> 

Forward Primer の 3' 末端塩基の 指定等の変更

Forward Primerの3'末端塩基の指定範囲の変更や移動をSelect Toolを用いて行うことができます。変更方法の詳細につきましては6-5ページの"Annotationの変更"の項目をご参照下さい。

Reverse Primer の指定


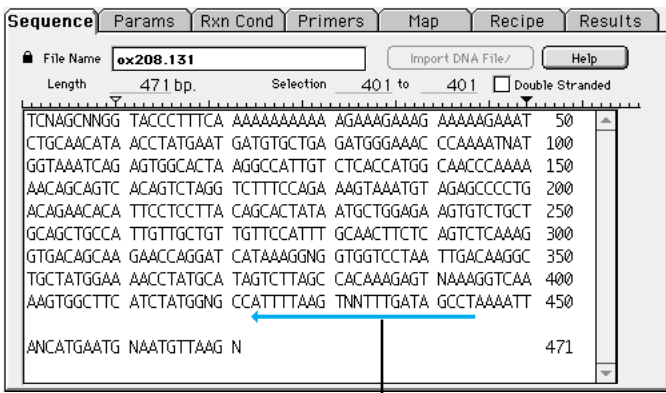
概要

Reverse Primer Tool を用いることにより Reverse Primer の配列を指定することができます。この Tool を用いて指定したプライマーは Params ページ上の検索条件を満たしている必要はありません。

注記 Reverse Primer は一度に一個所の指定しか行うことができません。一度指定を行ったのち、その他の部位で再度指定を行った場合 (Reverse Primer 3'End Tool を用いた場合を含みます) は始めに行った指定は自動的に削除されます。

Reverse Primer の指定

Reverse Primer の指定を行うには：

Step	操作
1	Reverse Primer Tool をクリックします。  カーソルが青の I-beam カーソルに変化します。
2	カーソルを Reverse Primer の指定を行う配列の一番初めの部位に合わせます。
3	指定を行う配列をドラッグしてハイライト表示で選択します。マウスのボタンを離すとハイライトで選択した部位の下に青い矢印が入り、Forward Primer として指定されたことが画面上に表示されます。  ReversePrimer 指定部位

Reverse Primer の指定位置等 の変更

Reverse Primer の配列の指定範囲の変更や移動を Select Tool を用いて行うことができます。変更方法の詳細につきましては 6-5 ページの "Annotation の変更" の項目をご参照下さい。

Reverse Primer の 3' 末端塩基の指定

概要

Reverse Primer 3'End Toolを用いて Reverse Primer の 3' 末端の塩基指定を行うことができます。この指定を行うと、Primer Express® ソフトウェアはこの塩基を 3' 末端に持つ Reverse Primer のみを検索します。

注記 Reverse Primer 3'End は一度に一個所の指定しか行えません。一度指定を行ったのち別の部位で再度指定を行った場合（Reverse Primer Tool を用いた場合を含みます）、前回の指定は自動的に削除されます。

Reverse Primer の 3' 末端塩基の指定

Reverse Primer の 3' 末端塩基を指定するには：

Step	操作
1	ReversePrimer 3'End Tool をクリックします。  カーソルが青の I-beam カーソルに変化します。
2	カーソルを ReversePrimer の 3' 末塩基の指定を行う塩基に合わせます。
3	マウスをクリックすると Reverse Primer の 3' 末塩基の指定が行われたことを示す青の点線の矢印が画面に表示されます。  Reverse Primer 3'End 指定部位

Forward Primer の 3' 末端塩基の 指定等の変更

Forward Primerの3'末端塩基の指定範囲の変更や移動をSelect Toolを用いて行うことができます。変更方法の詳細につきましては6-5ページの"Annotationの変更"の項目をご参照下さい。

指定の DNA 配列から翻訳されたアミノ酸配列の表示


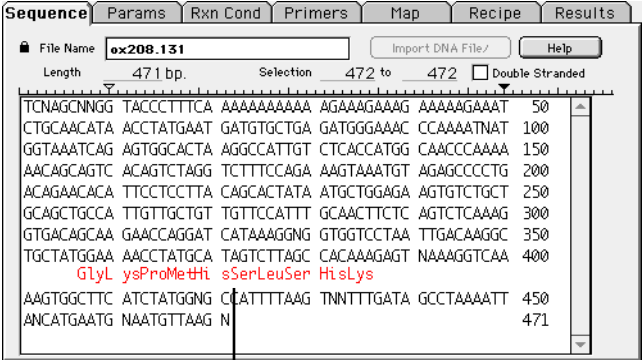
概要

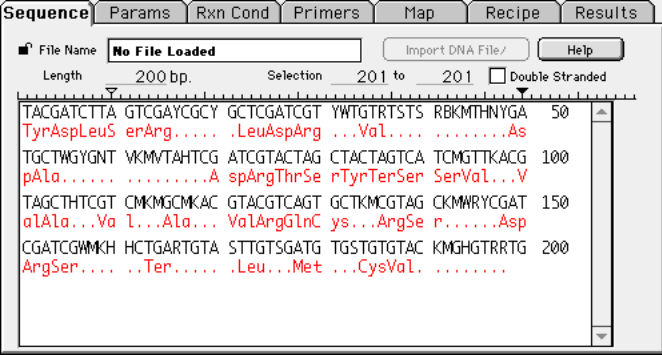
ORF (open reading frame) Tool を使用すると、選択した配列から推測されるアミノ酸配列をアミノ酸コドン表に従って自動的に表示します。このツールはタンパク質をコードしている配列部位の確認をするのに有効です。

指定の DNA 配列から翻訳されたアミノ酸配列の表示

注記 ORF は 3 塩基に対して 1 アミノ酸づつ表示されます。3 塩基に満たない場合は、その部位では ORF は表示されません。例えば 152 塩基の配列に対して ORF の指定を行った場合、150 塩基目までの ORF は表示されますが、3' 末端の残り 2 塩基に対する ORF 表示は行われず空白のままになります。

指定の DNA 配列から翻訳されたアミノ酸配列を表示するには：

Step	操作
1	ORF Tool をクリックします。  カーソルが赤い矢印表示に変化します。
2	カーソルを ORF の指定を行う配列の一番初めの塩基に合わせます。
3	ORF を表示させる塩基配列をドラッグをしてハイライト表示で選択します。マウスのボタンを離すとハイライト表示で選択した塩基配列の下段にアミノ酸配列が表示されます。  指定の DNA 配列から翻訳されたアミノ酸配列

Step	操作
4	<p>不確定の塩基が含まれていた場合、その部位ではアミノ酸配列は表示されませんが、確定部位上は表示されます。</p> 

ORF の指定の変更

ORF の指定範囲の変更や移動を Select Tool を用いて行うことができます。変更方法の詳細につきましては 6-5 ページの "Annotation の変更" の項目をご参照下さい。


特定の塩基配列のラベル

概要

Line Tool を用いることで、塩基配列上の特定の部位を下線によるラベルをすることができます。Line Tool によるラベルはプライマーの検索に影響をしません。

特定の塩基配列のラベル

特定の塩基配列のラベルをするには：

Step	操作
1	Line Tool をクリックします。  カーソルがピンク色の I-beam カーソルに変化します。
2	カーソルを下線でラベルをする初めの塩基に合わせます。
3	下線でラベルする塩基配列をドラッグしてハイライト表示で選択します。マウスのボタンを離すとハイライト表示で選択した塩基配列にピンクの下線が表示されます。  下線でラベルされた塩基配列

ラベル位置の 指定等の変更

下線によるラベルの指定範囲の変更や移動を Select Tool を用いて行うことができます。変更方法の詳細につきましては 6-5 ページの "Annotation の変更" の項目をご参照下さい。

ジャンクション部位の指定

概要


Junction Tool を用いることにより、mRNA 又は cDNA 配列上のエクソンジャンクション部位の指定をすることができます。エクソンジャンクション部位の指定を行うと、Primer Express® ソフトウェアはエクソンジャンクションをまたいで設定された TaqMan® プローブを含むプライマー・プローブセットを選択します。

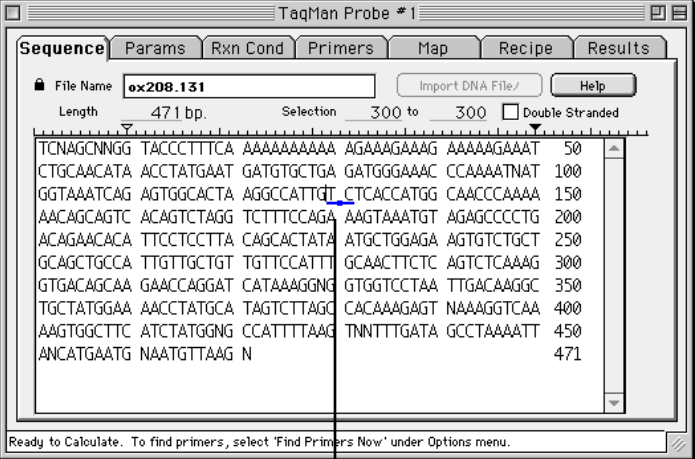
使用目的

Junction Tool を用いてエクソンジャンクション部位の指定を行い、TaqMan® プローブをジャンクション上に作成すると genome DNA の配列には TaqMan® プローブがハイブリダイズしないため、mRNA または cDNA 由来の PCR 増幅産物のみを検出することが可能です。

ジャンクション部位の指定

ジャンクション部位の指定を行うには：

Step	操作
1	Junction Tool をクリックします。  カーソルがジャンクションカーソルに変化します。

Step	操作																																	
2	<p>ジャンクション部位の指定を行う配列にカーソルを合わせ、そのままクリックをするとジャンクションのマークが塩基配列上に表示されます。</p>  <p>The screenshot shows the 'TaqMan Probe #1' window with a 'Sequence' tab selected. The sequence is displayed in a table with columns for the sequence, position, and a junction mark. The junction mark is a vertical line at position 150. The sequence is as follows:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Sequence</th> <th>Position</th> <th>Junction Mark</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>TCNAGCNNGG TACCCTTTCA AAAAAAAAAA AGAAAGAAAG AAAAAAGAAAT</td><td>50</td><td></td></tr> <tr><td>CTGCAACATA ACCTATGAAT GATGTGCTGA GATGGGAAAC CCAAAATNAT</td><td>100</td><td></td></tr> <tr><td>GGTAAATCAG AGTGGCACTA AGGCCATTGT CTCACCATGG CAACCCAAAA</td><td>150</td><td> </td></tr> <tr><td>AACAGCAGTC ACAGTCTAGG TCTTTCCAGA AAGTAAATGT AGAGCCCTCG</td><td>200</td><td></td></tr> <tr><td>ACAGAACACA TTCCTCCTTA CAGCACTATA ATGCTGGAGA AGTGTCTGCT</td><td>250</td><td></td></tr> <tr><td>GCAGCTGCCA TTGTTGCTGT TGTTCATTI GCAACTTCTC AGTCTCAAAG</td><td>300</td><td></td></tr> <tr><td>GTGACAGCAA GAACCAGGAT CATAAAGNG GTGGTCTAA TTGACAAGGC</td><td>350</td><td></td></tr> <tr><td>TGCTATGGAA AACCTATGCA TAGTCTTAGC CACAAAGAGT NAAAGGTCAA</td><td>400</td><td></td></tr> <tr><td>AAGTGGCTTC ATCTATGGNG CCATTTTAAG TNNTTTGATA GCCTAAAATT</td><td>450</td><td></td></tr> <tr><td>ANCATGAATG NAATGTTAAG N</td><td>471</td><td></td></tr> </tbody> </table> <p>指定されたジャンクション部位</p>	Sequence	Position	Junction Mark	TCNAGCNNGG TACCCTTTCA AAAAAAAAAA AGAAAGAAAG AAAAAAGAAAT	50		CTGCAACATA ACCTATGAAT GATGTGCTGA GATGGGAAAC CCAAAATNAT	100		GGTAAATCAG AGTGGCACTA AGGCCATTGT CTCACCATGG CAACCCAAAA	150		AACAGCAGTC ACAGTCTAGG TCTTTCCAGA AAGTAAATGT AGAGCCCTCG	200		ACAGAACACA TTCCTCCTTA CAGCACTATA ATGCTGGAGA AGTGTCTGCT	250		GCAGCTGCCA TTGTTGCTGT TGTTCATTI GCAACTTCTC AGTCTCAAAG	300		GTGACAGCAA GAACCAGGAT CATAAAGNG GTGGTCTAA TTGACAAGGC	350		TGCTATGGAA AACCTATGCA TAGTCTTAGC CACAAAGAGT NAAAGGTCAA	400		AAGTGGCTTC ATCTATGGNG CCATTTTAAG TNNTTTGATA GCCTAAAATT	450		ANCATGAATG NAATGTTAAG N	471	
Sequence	Position	Junction Mark																																
TCNAGCNNGG TACCCTTTCA AAAAAAAAAA AGAAAGAAAG AAAAAAGAAAT	50																																	
CTGCAACATA ACCTATGAAT GATGTGCTGA GATGGGAAAC CCAAAATNAT	100																																	
GGTAAATCAG AGTGGCACTA AGGCCATTGT CTCACCATGG CAACCCAAAA	150																																	
AACAGCAGTC ACAGTCTAGG TCTTTCCAGA AAGTAAATGT AGAGCCCTCG	200																																	
ACAGAACACA TTCCTCCTTA CAGCACTATA ATGCTGGAGA AGTGTCTGCT	250																																	
GCAGCTGCCA TTGTTGCTGT TGTTCATTI GCAACTTCTC AGTCTCAAAG	300																																	
GTGACAGCAA GAACCAGGAT CATAAAGNG GTGGTCTAA TTGACAAGGC	350																																	
TGCTATGGAA AACCTATGCA TAGTCTTAGC CACAAAGAGT NAAAGGTCAA	400																																	
AAGTGGCTTC ATCTATGGNG CCATTTTAAG TNNTTTGATA GCCTAAAATT	450																																	
ANCATGAATG NAATGTTAAG N	471																																	

ジャンクション部位の指定等の変更

ジャンクション部位の変更や移動を Select Tool を用いて行うことができます。変更方法の詳細につきましては 6-5 ページの "Annotation の変更" の項目をご参照下さい。

ジャンクション部位の指定の削除

Eraser Tool を用いてジャンクション部位の指定を削除することができます。削除方法の詳細につきましては 6-6 ページの "Annotation の削除" の項目をご参照下さい。


制限酵素切断部位等のサイトの指定

概要

Site Tool を用いることで制限酵素切断部位やクローニングサイト等のサイトの指定を行うことができます。Site Tool を用いて指定をした後、サイトの名前を 15 文字以内で入力することができます。

制限酵素切断部位等のサイトの指定

サイトの指定を行うには：

Step	操作
1	Site Tool をクリックします。  カーソルが site arrow カーソルに変化します。
2	カーソルをサイトの指定を行う塩基に合わせ、クリックするとサイトのマークが塩基配列上に表示されます。  指定されたサイト
3	"Site" と表示されているところを一度クリックし、サイト名を入力します。

サイトの指定等 の変更

指定したサイトの移動を Select Tool を用いて行うことができます。変更方法の詳細につきましては 6-5 ページの "Annotation の変更" の項目をご参照下さい。

サイトの指定の 削除

Eraser Tool を用いてサイトの指定を削除することができます。削除方法の詳細につきましては 6-6 ページの "Annotation の削除" の項目をご参照下さい。

6

補足情報

この章では以下の項目について説明いたします。

Topic	Page
相補鎖に対する TaqMan® プローブの検索方法	6-2
total gene 配列からイントロンを削除する方法	6-4
特定のプライマー配列の Tm 値の算出方法	6-6
特定の塩基配列の検索方法	6-8
TaqMan® MGB プローブ	6-10

相補鎖に対する TaqMan® プローブの検索方法

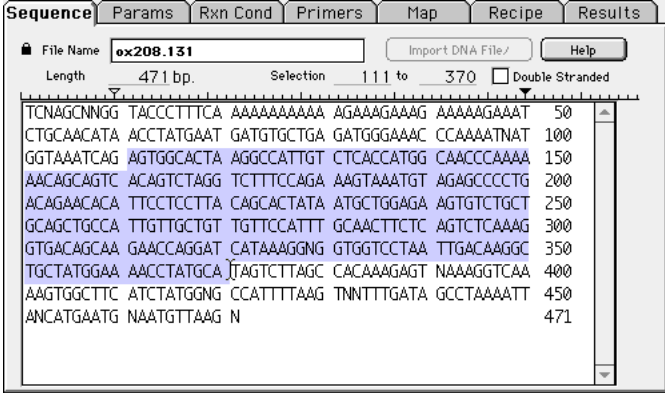
概要

TaqMan® Probe & Primer Design ドキュメントで TaqMan® プローブの検索を行う際には、Forward Primer は Sequence ページに表示されている塩基配列上で設計が行われ Reverse Primer はその相補鎖上で設計されますが、TaqMan® プローブの場合は Forward Primer と同じように Sequence ページに表示されている塩基配列上のみで設計が行われます。TaqMan® プローブを相補鎖上に設計する場合は、塩基配列を相補鎖に変換することが必要です。

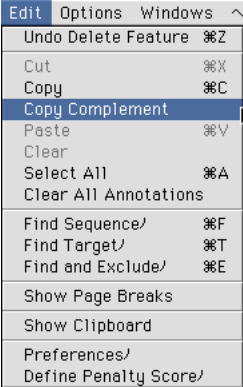
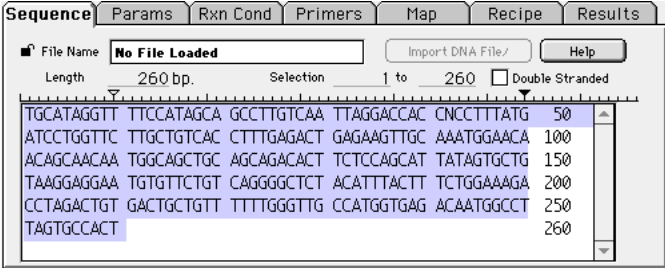
Sequence ページ上に表示されている塩基配列中に G の塩基が非常に多い場合、相補鎖に塩基配列を変換して検索をかけるとより良い結果が得られる場合があります。

相補鎖に対する TaqMan® プローブの検索方法

相補鎖に対する TaqMan® プローブを検索するには：

Step	操作
1	TaqMan® Probe & Primer Design ドキュメントを開き、相補鎖を作成する塩基配列を読み込みます。
2	Select Tool をクリックし、相補鎖を作成する塩基配列の範囲をクリック及びドラッグによるハイライト表示で選択します。 

全ての配列を選択する場合は Edit メニューより Select All を選択します。

Step	操作
3	Edit メニューから Copy Complement を選択すると、選択した塩基配列の相補鎖がコピーされます。 
4	新規の TaqMan® Probe & Primer Design Document を開きます。
5	Edit メニューより Paste を選択すると、相補鎖の塩基配列が Sequence ページ上に表示されます。 
6	TaqMan® プローブの検索を行います。得られたプライマー・プローブセットの TaqMan® プローブは相補鎖の塩基配列上に設計されたものになります。

注記 Copy Complement でコピーした相補鎖を別の Text ファイルにペーストすることができます。例えば Copy Complement でコピーした相補鎖を一度 Symple Text にペースト名称をつけて保存し、それを改めて Import DNA File により読み込むことができます。

total gene 配列からイントロンを削除する方法

概要

GenBank 等に登録されている遺伝子の塩基配列情報の中には total gene の塩基配列が登録されているものがあります。mRNA (又は cDNA) の定量用のプライマー・プローブ設計を行う際、エクソンジャンクション情報が明確な場合はそれを利用して genome DNA からの増幅が生じないように設計を行うことができますので、total gene の塩基配列情報内に含まれているイントロン及びエクソンの情報を活用することをお勧めいたします。

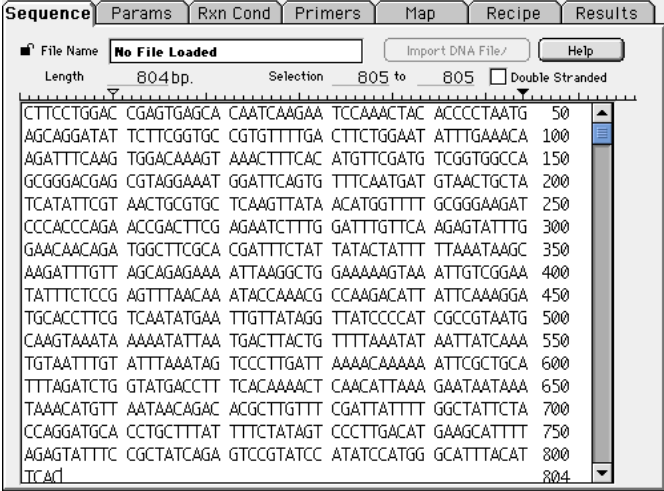
Primer Express®ソフトウェアにはアプリケーション毎に計10種類のドキュメントがありますが、そのなかの RT PCR ドキュメントを使用すると total gene の配列からイントロン部位を自動的に削除することができます。イントロンが削除されたエクソン同士のリンク部位にジャンクションの表示が入ります。

total gene 配列からイントロンを削除する方法

total gene の配列からイントロンを削除するには：

Step	操作
1	File メニューの New サブメニューより RT PCR Document を選択すると RT PCR ドキュメントが開きます。
2	Import DNA File ボタンをクリックして、total gene の配列を読み込むと、自動的にイントロンが削除され、ジャンクションの表示が入ります。

The screenshot shows the 'Sequence' tab of the software. The file name is 'DR06NBPSA3.gb' and the length is 804 bp. The sequence is displayed with junctions highlighted in red. The junctions are: LeuProGlyP roSerGluHi sAsnGlnGlu SerLysLeuH isProTerTe, rAlaGlyTyr SerSerValP roCysPheAs pPheTrpAsn IleTerAsnL, H isValArgCy sArgTrpPro, ysIleSerSe rGlyGlnSer LysLeuSer, AlaGlyArgA laTerGluMe tAspSerVal PheGlnTerC ysAsnCysTy, rHisIleArg AsnCysValL euLysLeuTe rHisGlyPhe AlaGlyArgS, erHisProGl uProThrSer ArgIlePheG lyPheValGl nGluTyrLeu, M etAlaSerHi sAspPheTyr TyrThrIleP heLysTerAl.

Step	操作
3	Edit メニューから Select All を選択して全ての塩基配列をハイライト表示で選択します。一部の塩基配列のみ選択する場合は Select Tool を用いて選択する範囲のみハイライト表示で選択します。
4	Edit メニューから Copy を選択します。
5	新規の TaqMan® Probe & Primer Design ドキュメントを開きます。
6	Edit メニューから Paste を選択するとイントロンが削除された配列が表示されます。
	 <p>The screenshot shows the 'Sequence' tab of the software. At the top, there are tabs for 'Params', 'Rxn Cond', 'Primers', 'Map', 'Recipe', and 'Results'. Below the tabs, there is a 'File Name' field containing 'No File Loaded' and an 'Import DNA File/' button. The 'Length' is set to '804 bp' and the 'Selection' is '805 to 805'. A 'Double Stranded' checkbox is present. The main area displays a DNA sequence in a grid format with line numbers on the right side. The sequence is as follows:</p> <pre> CTTCCTGGAC CGAGTGAGCA CAATCAAGAA TCCAAACTAC ACCCCCTAATG 50 AGCAGGATAT TCTTCGGTGC CGTGTTTTGA CTTCGGAAAT ATTTGAAACA 100 AGATTTCAAG TGGACAAAGT AAACTTTCAC ATGTTTCGATG TCGGTGGCCA 150 GCGGGACGAG CGTAGGAAAT GGATTCAGTG TTTCAATGAT GTAACCTGCTA 200 TCATATTCGT AACTGCGTGC TCAAGTTATA ACATGGTTTT GCGGGAAGAT 250 CCCACCCAGA ACCGACTTCG AGAATCITTG GATTTGTTCA AGAGTATTTG 300 GAACAACAGA TGGCTTCGCA CGATTTCTAT TATACTATTT TTAATAAGC 350 AAGATTTGTT AGCAGAGAAA ATTAAGGCTG GAAAAAGTAA ATTGTCGGAA 400 TATTTCTCCG AGTTTAAACA ATACCAAACG CCAAGACATT ATTCAAAGGA 450 TGCACCTTCG TCAATATGAA TTGTTATAGG TTATCCCAT CGCCGTAATG 500 CAAGTAAATA AAAATATTTA TGACTTACTG TTTTAAATAT AATTATCAAA 550 TGTAATTTGT ATTTAAATAG TCCCTTGATT AAAACA AAAA ATTCGCTGCA 600 TTTAGATCTG GTATGACCTT TCACAAAAC CAACATTAAA GAATAATAAA 650 TAAACATGTT AATAACAGAC ACGCTTGTTT CGATTATTTT GGCTATTCTA 700 CCAGGATGCA CCTGCTTTAT TTTCTATAGT CCCTTGACAT GAAGCATTTT 750 AGAGTATTTT CGCTATCAGA GTCCGTATCC ATATCCATGG GCATTACAT 800 TCAC 804 </pre>
	<p>注記 コピー及びペーストができるのは塩基配列のみです。各種 Annotation 設定をコピー及びペーストをすることはできません。</p>
7	RT PCR ドキュメント上の各種 Annotation 設定と同じになるように Annotation Tools を用いて TaqMan® Probe & Primer Design ドキュメント上に設定を行います。
8	プローブ・プライマーセットの検索を行います。

特定のプライマー配列の Tm 値の算出の方法

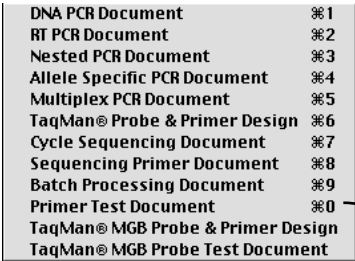
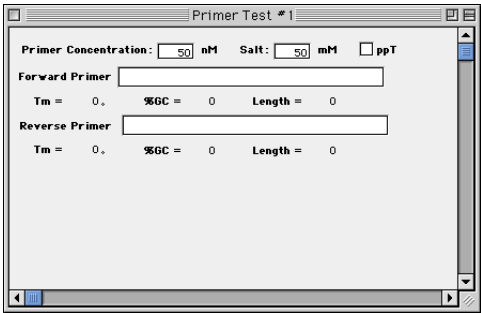
概要

現在使用しているプライマーの Tm 値を算出することができます。Forward Primer と Reverse Primer の両者を同時に入力すると、プライマーダイマー等予測される二次構造が図示されます。

プライマーを指定して検索を行う場合にこの方法で Primer Express® ソフトウェア上で算出される Tm 値を確認することをお勧めいたします。

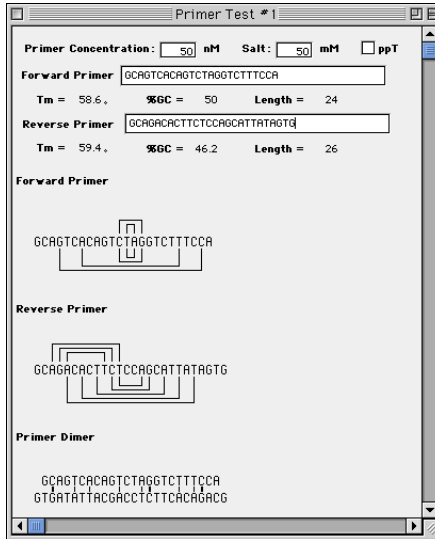
特定のプライマー配列の Tm 値の算出方法

特定のプライマー配列の Tm 値の算出をするには：

Step	操作
1	<p>FileメニューのNewサブメニューからPrimer Test Documentを選択するとPrimer Test ドキュメントが表示されます。</p>   <p>注記 上図は Primer Express® ソフトウェア v1.5 の場合です。v1.0 の場合には含まれていないドキュメントタイプ及びチェックボックスがあります。</p>
2	<p>Primer Express® ソフトウェアで検索に用いる場合は初期設定のまま算出した数値を用いますので、プライマー濃度及び塩濃度の変更はしないでください。</p>

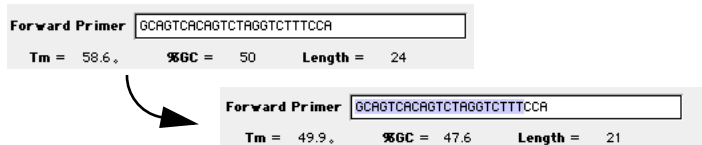
Step **操作**

3 Forward Primer 及び Reverse Primer のテキスト枠にそれぞれの塩基配列を入力します。



Tm 値、GC%、及び全長が表示されます。また予測される二次構造も同時に表示されます。

配列をハイライトで選択すると、選択された部分のみの Tm 値、GC%、及び全長が表示されます。



注記 ハイライトの機能を Primer Express® ソフトウェア v1.0 で使用することはできません。

右上の ppT チェックボックスにチェックをいれると Turbo TaqMan® プローブとして作成した場合の Tm 値が算出されます。

注記 Primer Express® ソフトウェア v1.0 では Turbo TaqMan® プローブの Tm 値を自動算出することはできません。

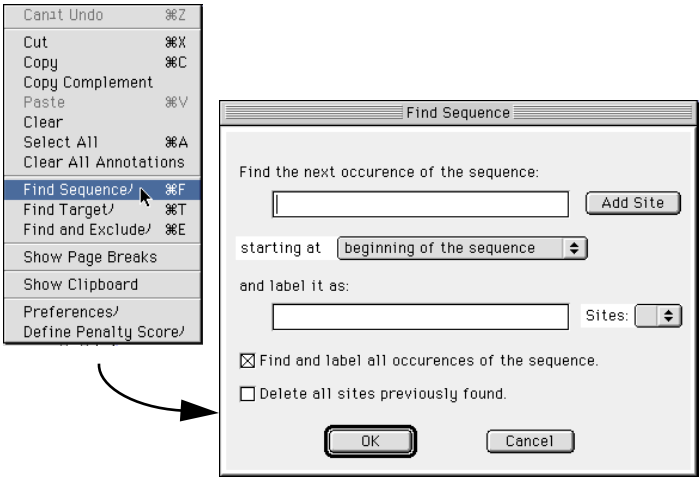
特定の塩基配列の検索方法

概要

Sequence ページの塩基配列内で、ある特定の塩基配列が存在するかどうか検索を行うことができます。現在使用しているプライマーの位置を確認したり、特定の制限酵素切断部位の検索を行うことができます。ここでは基本的な使用方法についてご説明いたしますので、詳細につきましては英文マニュアル 7-10 ページの "Find Sequence Command" をご参照下さい。

特定の塩基配列の検索方法

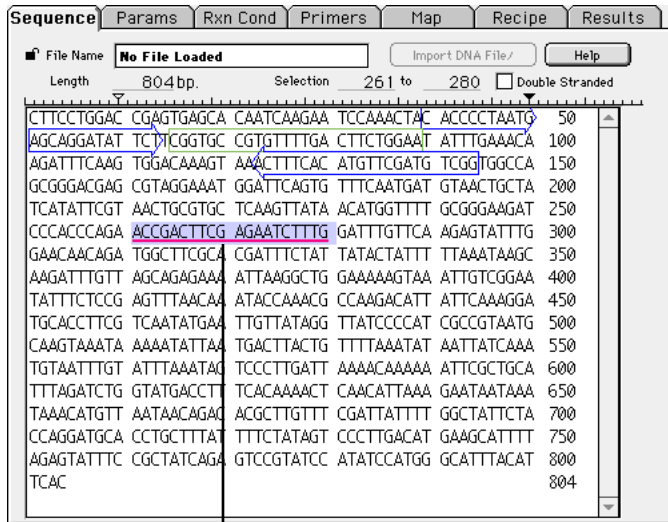
Sequence ページの塩基配列内における特定の塩基配列の検索をするには：

Step	操作
1	<p>Edit メニューより Find Sequence を選択すると、Find Sequence 画面が表示されます。</p>  <p>The image shows a screenshot of the 'Edit' menu with 'Find Sequence/' highlighted. To the right, the 'Find Sequence' dialog box is open. The dialog box contains the following fields and options: 'Find the next occurrence of the sequence:' followed by an empty text input field and an 'Add Site' button; 'starting at:' followed by a dropdown menu set to 'beginning of the sequence'; 'and label it as:' followed by an empty text input field and a 'Sites:' dropdown menu; a checked checkbox for 'Find and label all occurrences of the sequence.'; and an unchecked checkbox for 'Delete all sites previously found.' At the bottom are 'OK' and 'Cancel' buttons.</p>
2	<p>上段のテキスト欄に、検索を行う塩基配列を入力します。</p> <p>制限酵素切断部位の検索の場合、主な制限酵素の配列が既に登録されています。右中央の Sites ポップアップメニューをクリックすると各制限酵素の一覧が表示されますので、その中から選択します。</p>

Step **操作**

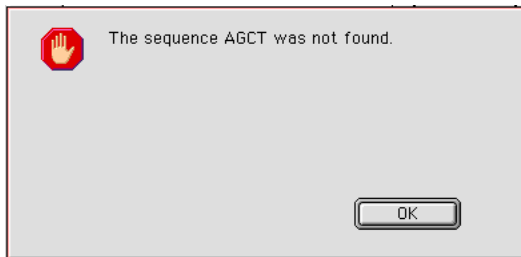
3 OK をクリックすると検索が行われます。

目的の配列が検索された場合、Sequence ページ上に下線ラベル付きで表示されます。



検索された配列

検索されなかった場合、以下のような画面が表示されますので、OK をクリックして画面を閉じます。



TaqMan® MGB プローブ

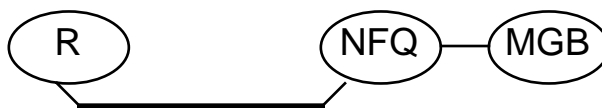
概要

ここでは TaqMan® MGB プローブの特徴及び設計方法についてご説明致します。

注記 TaqMan® MGB プローブの設計を行うためには Primer Express® ソフトウェアのバージョンが v1.5 以上であることが必要です。

構造

下記は TaqMan® MGB Probe の構造の模式図です。



- ◆ R : Reporter dye
- ◆ NFQ : No Fluorescent Quencher
- ◆ MGB : Miner Groove Binder (Tm enhancer)

特徴

TaqMan® MGB プローブの特徴は下記の通りです。

- ◆ 3' 末端に MGB を使用
MGBは2本鎖DNAのminer grooveにはまりこむ鎌型の分子構造を持つ物質で、ターゲットとなる鋳型 DNA にハイブリダイズすると、2本鎖 DNA の miner groove に折りたたまれ安定な構造をとります。プローブとターゲット遺伝子とのハイブリダイズが安定化されるため、プローブの Tm 値が上昇し、通常の TaqMan® プローブよりも短い塩基長で設計することが可能になります。ターゲット遺伝子が AT リッチの配列で通常の TaqMan® プローブではプローブ鎖長が 30 塩基を越えてしまう場合は TaqMan® MGB プローブの利用をお勧め致します。また SNPs アッセイにおいては相補的なプローブと非相補的なプローブとの間の Tm 値の格差が増すため、通常の TaqMan® プローブよりも SNPs の識別が容易になります。
- ◆ Quencher として NFQ を使用
TaqMan® MGB プローブの Quencher として NFQ を使用しているため、TAMRA™ を Quencher として用いている通常の TaqMan® プローブと比較して蛍光のバックグラウンドが低くおさえられ、より正確にリポーター蛍光強度を算出することができるようになります。

TaqMan® MGB プローブ設計の ガイドライン

TaqMan® MGB プローブ設計のガイドラインは通常の TaqMan® プローブ設計のガイドラインに準じますが、以下の点のみご注意ください。

- ◆ TaqMan® MGB プローブ鎖長が12塩基以下になってはいけません。12塩基以下ではプローブ配列の特異性が低くなってしまいますためです。最低でも13塩基以上のものを選択して下さい。

TaqMan® MGB プローブの設計

TaqMan® MGB プローブの検索は TaqMan® MGB Probe & Primer Design ドキュメントで行います。このドキュメントでは TaqMan® MGB プローブ専用のアルゴリズムを用いてプローブの Tm 値が算出されます。

TaqMan® MGB プローブの設計を行うには：

Step	操作
1	Primer Express® ソフトウェア v1.5 を起動します。
2	File メニューの New サブメニューから TaqMan® MGB Probe & Primer Design を選択します。  新規の TaqMan® MGB Probe ドキュメントが開きます。 

TaqMan® MGB プローブの設計を行うには：

Step	操作
3	4-3ページ以降の通常のTaqMan®プローブの検索方法と同様に検索を行います。
4	検索結果が得られた場合は4-5ページからの"TaqMan®プローブ・プライマーセットが検索された場合"に準じて使用するセットの選択を行います。 注記 TaqMan® MGB プローブ鎖長が12塩基以下のものは避けて下さい。
5	検索結果が得られなかった場合は4-11ページからの"TaqMan®プローブ・プライマーセットが検索されなかった場合"に準じて結果が得られるまで検索条件を徐々に緩めてゆきます。
