

Twist DX Probe & Primerの選定方法

2018.05.07

TwistAmp® Amp Probe作成

【作成条件】

- ◆ 2つのチミジンが約6bp未満のヌクレオチドを挟んで認められる部位
- ◆ テトラヒドロフラン(H)から5'側に30bp以上
- ◆ テトラヒドロフラン(H)から3'側に15bp以上
- ◆ フルオロフォアやクエンチャーとHの間は0塩基、1塩基、2塩基でも良い。

F =内部dT-FAM(フルオロフォア)

H =THF(テトラヒドロフラン残基)

Q =内部dT-BHQ1(クエンチャー)



TwistDX RPAプライマーとプローブに関するガイドラインより引用

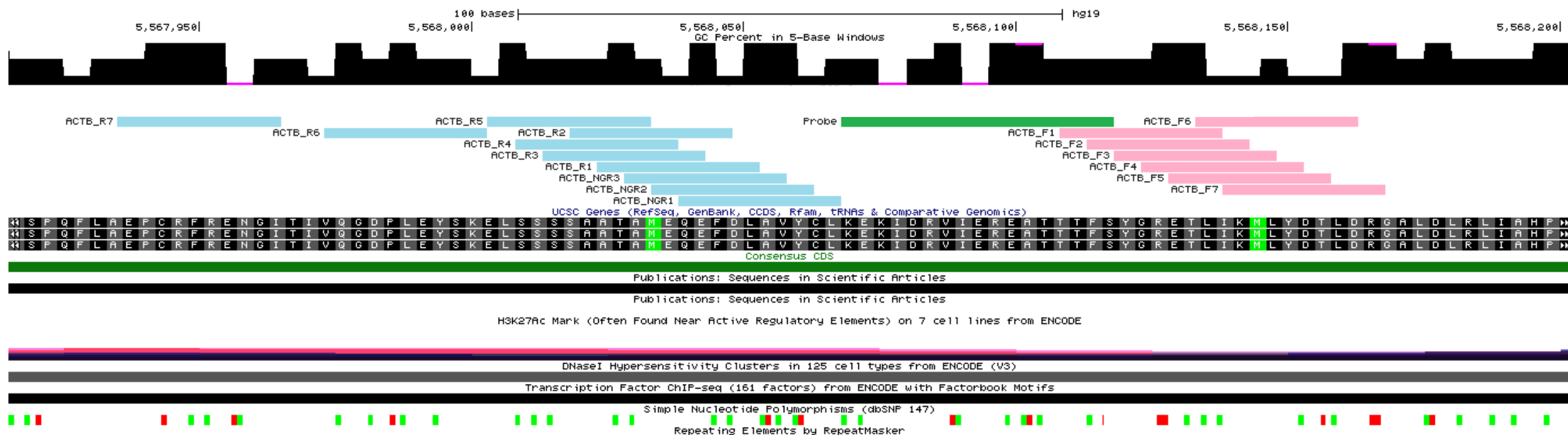
5' -TCACCCACACTGTGCCCATCTACGAGGGGTATGCCCTCCCC
CATGCCATCCTGCGTCTGGACCTGGCTGGCCGGGACCTGACTGA
C**T**ACC**T**CA**T**GAAGATCC**T**CACCGAGCGCGGC**T**ACAGC**TT**CACCA
CCACGGCCGAGCGGGAAA**T**CG**FH**CG**Q**GACA**TT**AAGGAGAAGC**T**G
TGCT**T**ACG**T**CGCCC**T**GGAC**TT**CGAGCAAGAGA**T**GGCCACGGCTGC
TTCCAGCTCCTCCCTGGAGAAGAGCTACGAGCTGCCTGACGGCC
AGGTCATCACCATTTGGCAATGAGCGGTTCCGCTG-3'

30bp

15bp

Primerの作成

「RPA プライマーとプローブに関するガイドライン」に従い、ForwardPrimerはProbeの5'方向に5bp重ねた所から5'方向に30bpで設計。そこから5bpごとにずらして候補Primerを選定する。



ReversePrimerはProbeと重ねてはいけないので、Probeと重ならないように3'方向へ30bpで設計してそこから5bpごとにずらして候補Primerを選定する。

In-Silico PCRでのPrimerCheck

In-silicoPCRとは、PCR PrimerPairの配列データベースを検索するツールで、PrimerPairの間に存在するデータベース内の全ての配列を含むシーケンス出力ファイルが高速に検索できます。

[Home](#) [Genomes](#) [Genome Browser](#) [Tools](#) [Mirrors](#) [Downloads](#) [My Data](#) [Help](#) [About Us](#)

UCSC In-Silico PCR

Genome:
Human

Assembly:
Feb. 2009 (GRCh37/hg19)

Target:
genome assembly

Forward Primer:

Reverse Primer:

submit

Max Product Size:

Min Perfect Match:

Min Good Match:

Flip Reverse Primer: ☐

About In-Silico PCR

In-Silico PCR searches a sequence database with a pair of PCR primers, using an indexing strategy for fast performance. See an example [video](#) on our YouTube channel.

Configuration Options

Genome and Assembly - The sequence database to search.
Target - If available, choose to query transcribed sequences.
Forward Primer - Must be at least 15 bases in length.
Reverse Primer - On the opposite strand from the forward primer. Minimum length of 15 bases.
Max Product Size - Maximum size of amplified region.
Min Perfect Match - Number of bases that match exactly on 3' end of primers. Minimum match size is 15.
Min Good Match - Number of bases on 3' end of primers where at least 2 out of 3 bases match.
Flip Reverse Primer - Invert the sequence order of the reverse primer and complement it.

Output

When successful, the search returns a sequence output file in fasta format containing all sequence in the database that lie between and include the primer pair. The fasta header describes the region in the database and the primers. The fasta body is capitalized in areas where the primer sequence matches the database sequence and in lower-case elsewhere. Here is an example from human:

```
>chr22:31000551+31001000 TAACAGATTGATGATGCATGAAATGGG CCCATGAGTGGCTCCTAAAGCAGCTGC
TtACAGATTGATGATGCATGAAATGGGgggtggccagggggtgggggtga
gactgcagagaaagcagggctggttcataacaagctttgtgctcccaa
tatgacagctgaagttttccaggggctgatggtgagccagtgagggtaa
tacacagaacatcctagagaaacccctcattccttaaagattaaaaataa
gacttgctgctgtgaagggttggtattcctatttgagaaattctgtta
tccagaatggcttaccccaaatgctgaaagtgtgtacgtaattctcaa
agcaagctcctcctcagacagagaacaccagcggtcacaggaagcaaa
aatttgcttcacttttaaggtgaatccagaacccagatgtcagagctcc
aagcactttgctcagctccacGCAGCTGCTTTAGGAGCCACTCATGaG
```

The + between the coordinates in the fasta header indicates this is on the positive strand.

Author

In-Silico PCR was written by [Jim Kent](#). Interactive use on this web server is free to all. Sources and executables to run batch jobs on your own server are available free for academic, personal, and non-profit purposes. Non-exclusive commercial licenses are also available. Contact Jim for details.

UCSC Genome Browser GatewayはWebサーバー上で無料で使用できます。
ただし、データベースがあるものだけに限り、調べたい生物種によってはデータベースがない場合もあります。

候補Primerからの選定

>ACTB_F1
CCTCACCAGCGCGGCTACAGCTTCACCAC

>ACTB_NGR1
TTGCTCGAAGTCCAGGGCGACGTAGCACAG

UCSC In-Silico PCR

Genome: Assembly: Target:

Max Product Size: Min Perfect Match: Min Good Match: Flip Reverse Primer: ☐

Forward Primer: Reverse Primer:



ForwardPrimerとReversePrimerを入力して
Submitを押すと、入力したPrimerPairでのPCR配
列が全て表示されます。

UCSC In-Silico PCR

>[chr17:79478341-79478440](#) 100bp CCTCACCAGCGCGGCTACAGCTTCACCAC TTGCTCGAAGTCCAGGGCGACGTAGCACAG
CCTCActGAGCGaGGCTACAGCTTCACCACcaccggccgagcgggaaatcg
tgccgcacatcaaggagaagCTGTGCTACGTGCGCCCTGGACTTCGAGCAG
>[chr6:88986054-88986152](#) 99bp CCTCACCAGCGCGGCTACAGCTTCACCAC TTGCTCGAAGTCCAGGGCGACGTAGCACAG
CCTCACCCAGCaCaGCTACAGCTTCACCACcaccgtgagcaggaaatcat
gtgtgacatcaaggagaagCTGTGCTACGTGCGCCCTGGAAATTCGAGCAG
>[chr7:5568039-5568138](#) 100bp CCTCACCAGCGCGGCTACAGCTTCACCAC TTGCTCGAAGTCCAGGGCGACGTAGCACAG
CCTCACCAGCGCGGCTACAGCTTCACCACcaccggccgagcgggaaatcg
tgcgtgacattaaggagaagCTGTGCTACGTGCGCCCTGGACTTCGAGCAA

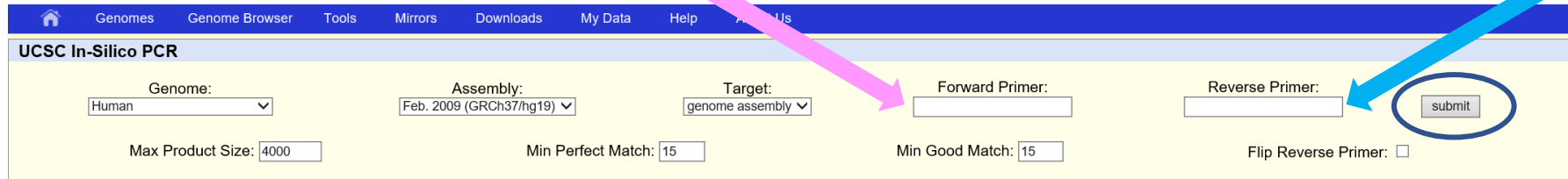
Primer Melting Temperatures

Forward: 81.1 C cctcaccgagcgcggctacagcttcaccac
Reverse: 78.8 C ttgctcgaagtcaggcgacgtagcacag
The temperature calculations are done assuming 50 mM salt and 50 nM annealing oligo concentration. The code to calculate the melting temp comes from [Primer3](#).

このPrimerPairでは3つのAmpliconが出て
きてしまうので、特異的とは言えない。
次のPrimerPairの候補を探し、In-silico=1
になるものを探す。

>ACTB_F1
CCTCACCGAGCGCGGCTACAGCTTCACCAC

>ACTB_R1
AGCCGTGGCCATCTCTTGCTCGAAGTCCAG



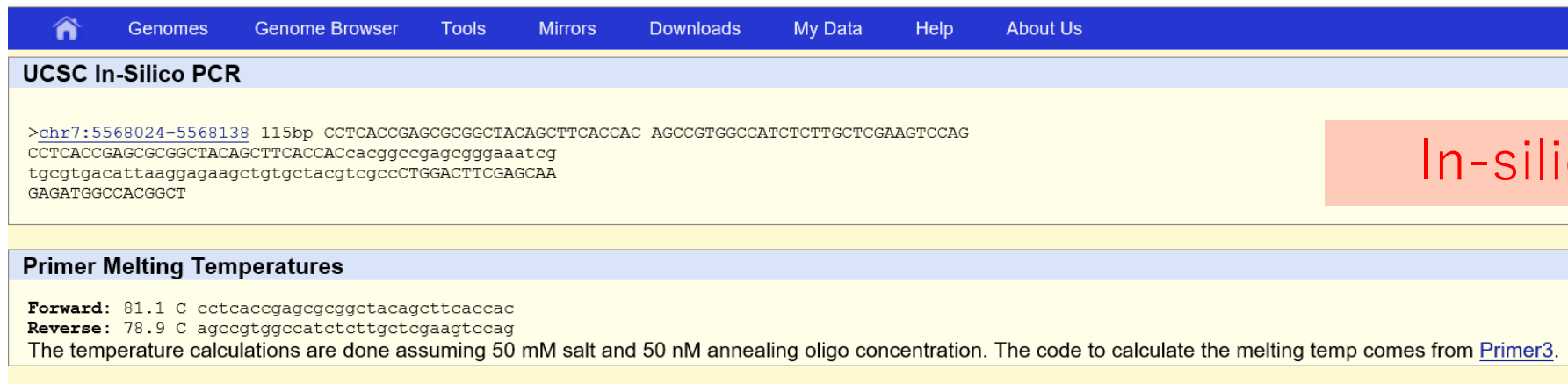
UCSC In-Silico PCR

Genome: Assembly: Target:

Max Product Size: Min Perfect Match: Min Good Match:

Forward Primer: Reverse Primer:

Flip Reverse Primer: ☐



UCSC In-Silico PCR

>[chr7:5568024-5568138](#) 115bp CCTCACCGAGCGCGGCTACAGCTTCACCAC AGCCGTGGCCATCTCTTGCTCGAAGTCCAG
CCTCACCGAGCGCGGCTACAGCTTCACCACcaccggccgagcgggaaatcg
tgcgtagacattaaggagaagctgtgctacgtcgccCTGGACTTCGAGCAA
GAGATGGCCACGGCT

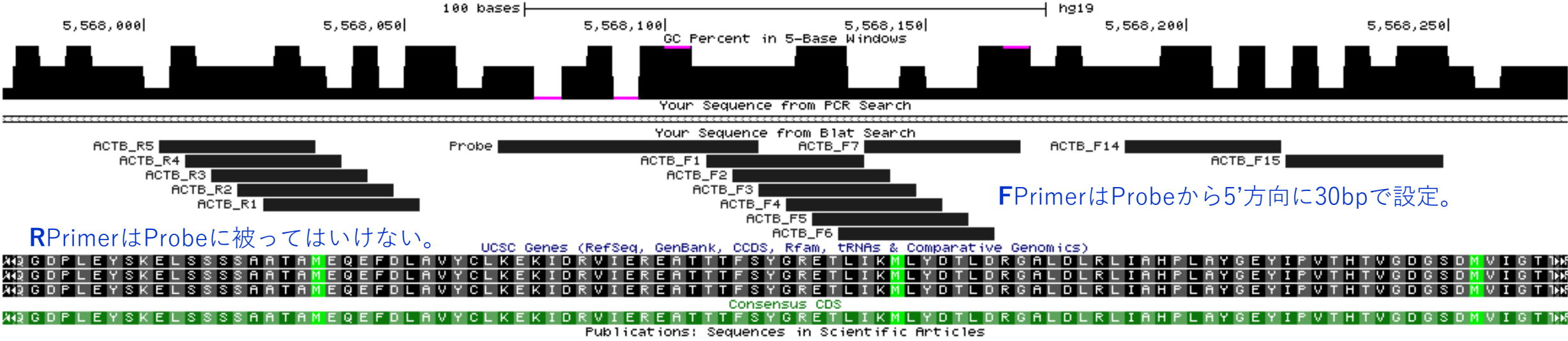
Primer Melting Temperatures

Forward: 81.1 C cctcaccgagcgcggctacagcttcaccac
Reverse: 78.9 C agccgtggccatctcttgctcgaagtccag
The temperature calculations are done assuming 50 mM salt and 50 nM annealing oligo concentration. The code to calculate the melting temp comes from [Primer3](#).

In-silico=1

このように、候補PrimerからIn-silico=1になるようなPrimerを選んでいく。

作成したPrimer&Probe



【In-Silico結果】 これができるのはGenome データベースにあるものだけ

	NGR1	NGR2	NGR3	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
F1	3	3	3	1	1	1	1	1	2	2
F2	2	2	3	1	1	1	1	1	1	1
F3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
F4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
F5	1	1	1	1	1	1	1	1	6	1
F6	3	3	5	1	1	1	1	1	7	2
F7	3	3	5	1	1	1	1	1	7	2
F14	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1
F15	2	2	2	1	1	1	1	1	6	1
F16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

【Amplicon Size】

	NGR1	NGR2	NGR3	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
F1				115	120	125	130	135		
F2				120	125	130	135	140	170	208
F3	110	115	120	125	130	135	140	145	175	213
F4	115	120	125	130	135	140	145	150	180	218
F5	120	125	130	135	140	145	150	155		223
F6				140	145	150	155	160		
F7				145	150	155	160	165		
F14				195	200	205	210	215	245	283
F15				226	231	236	241	246		314
F16	272	277	282	287	292	297	302	307	337	375