サンガー法によるシングルサイト検査
ープライマーの設定と運用の実際ー

獨協医科大学病院臨床検査センター
秋山友里

獨協医科大学病院
Dokkyo Medical University Hospital

当検査室の紹介

獨協医科大学病院　臨床検査センター　血液/遺伝子・HLA検査

担当者4名（業務経験3年以上）

- 白血病関連遺伝子検査
- SARS-CoV-2リアルタイムPCR
- HLA　DNAタイピング
- がんゲノム医療コーディネーター
- 外部委託遺伝子検査の管理
- 遺伝学的検査（サンガー法）

1日2回測定を行い、
1ヵ月の検査数はで700件程

遺伝学的検査の内容

- 遺伝学的検査（サンガー法）

  ・がん遺伝子パネル検査で生殖細胞系列の変異が疑われた場合
  （シングルサイト検査）

  ・家族に生殖細胞系列の変異が見つかった場合　（保因者診断）
  （シングルサイト検査）

  ・遺伝性疾患の遺伝子解析

サンガー法の検査の流れ

核酸抽出

↓

PCR

↓

電気泳動

↓

PCR産物の精製

↓

シーケンス反応

↓

シーケンス反応産物の精製

↓

キャピラリー電気泳動

↓

結果の解析

本日のメニュー

- **解析の実際**
  - ・遺伝学的検査依頼
  - ・情報の整理
  - ・ゲノム位置の検索
  - ・ゲノムDNA配列の検索
- **プライマー作成**
  - ・Primer3の使い方
- **電気泳動での確認**
- **結果の解析**
- **参考資料**
- **最後に**

獨協医科大学病院
Dokkyo Medical University Hospital

遺伝学的検査依頼

当院では遺伝学的検査の依頼を受ける際に下記の情報をできるだけいただいています。

- 遺伝子名
- NM番号
- バリアント位置
- アミノ酸変異
- 疾患名

本日は当院のプライマー作成から解析までを
BRCA1　NM_007294　c.5096G>A　p.Arg1699Glnのバリアント情報を使って紹介します。

情報の整理

依頼先からもらったバリアント情報を整理し、プライマー作成に不足している情報を確認します。

遺伝子名：BRCA1

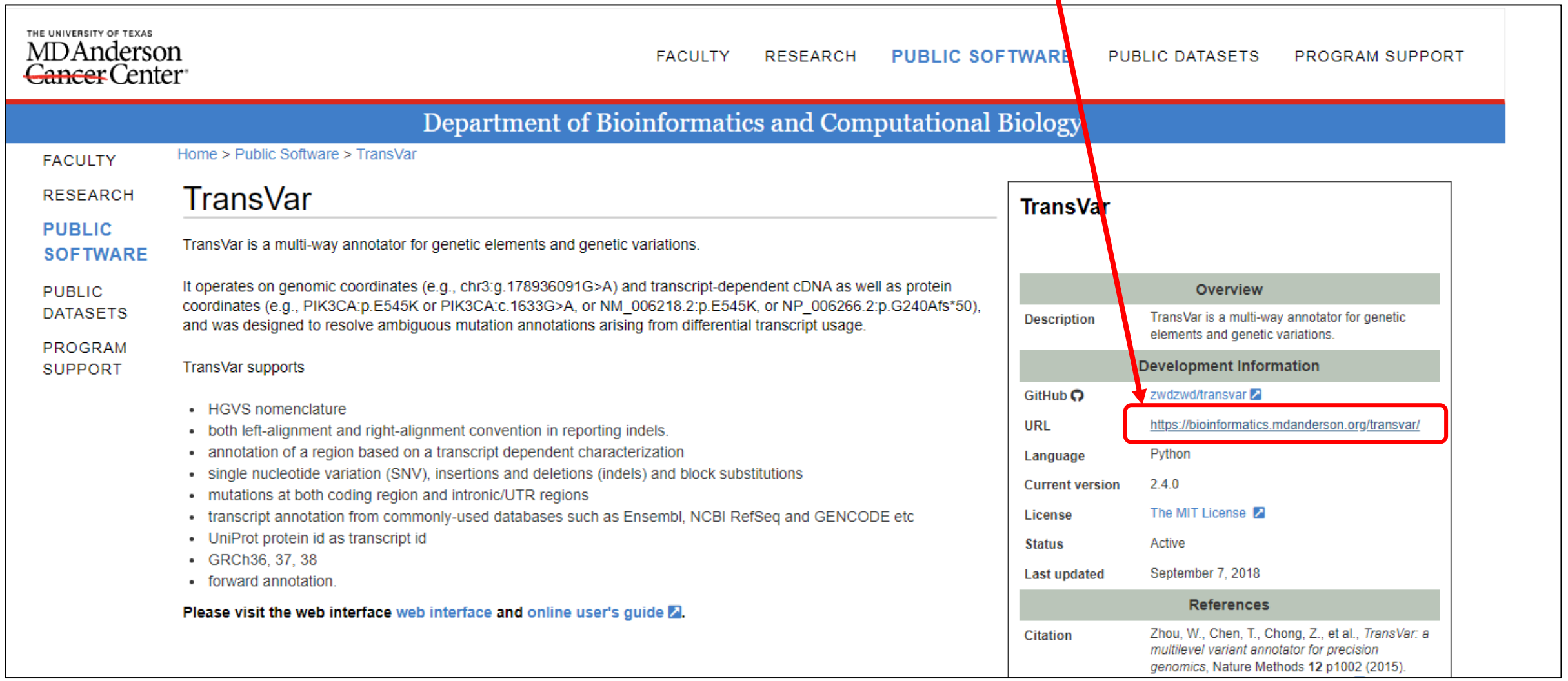
目的	Accession ID	検索場所（一例）	分かったAccession ID
ゲノムDNA配列がプライマーを作成するために必要なため	NC_	NCBI	情報なし
ゲノムDNA配列のバリアント位置を確認するため	g.（genomic DNA）	Clin var TransVar	情報なし
コーディング領域の確認とリファレンス配列の確認をするため	MN_	Clin var TransVar	NM_007294 再確認！
mRNA配列のバリアント位置を確認するため どのような変化であるか確認するため	c.（coding DNA）	Clin var TransVar	c.5096G>A 再確認！
アミノ酸配列からバリアントを確認するため	p.(protein)	Clin var TransVar	p.Arg1699Gln 再確認！

獨協医科大学病院
Dokkyo Medical University Hospital

ゲノム位置の検索

・バリアント情報からゲノム位置の検索方法の一例としてTransVarを紹介します。

・インターネットで検索するとこの画面が出てきますので、URLを開いて下さい。



獨協医科大学病院
Dokkyo Medical University Hospital

バリアント情報:BRCA1　c.5096G>A　p.Arg1699G>A

検索の結果、NM_007294　ゲノムポジションはGRCh38 g.43063930C>T　c.5096G>A はexon17に位置している事が分かった。

得られた情報を追加

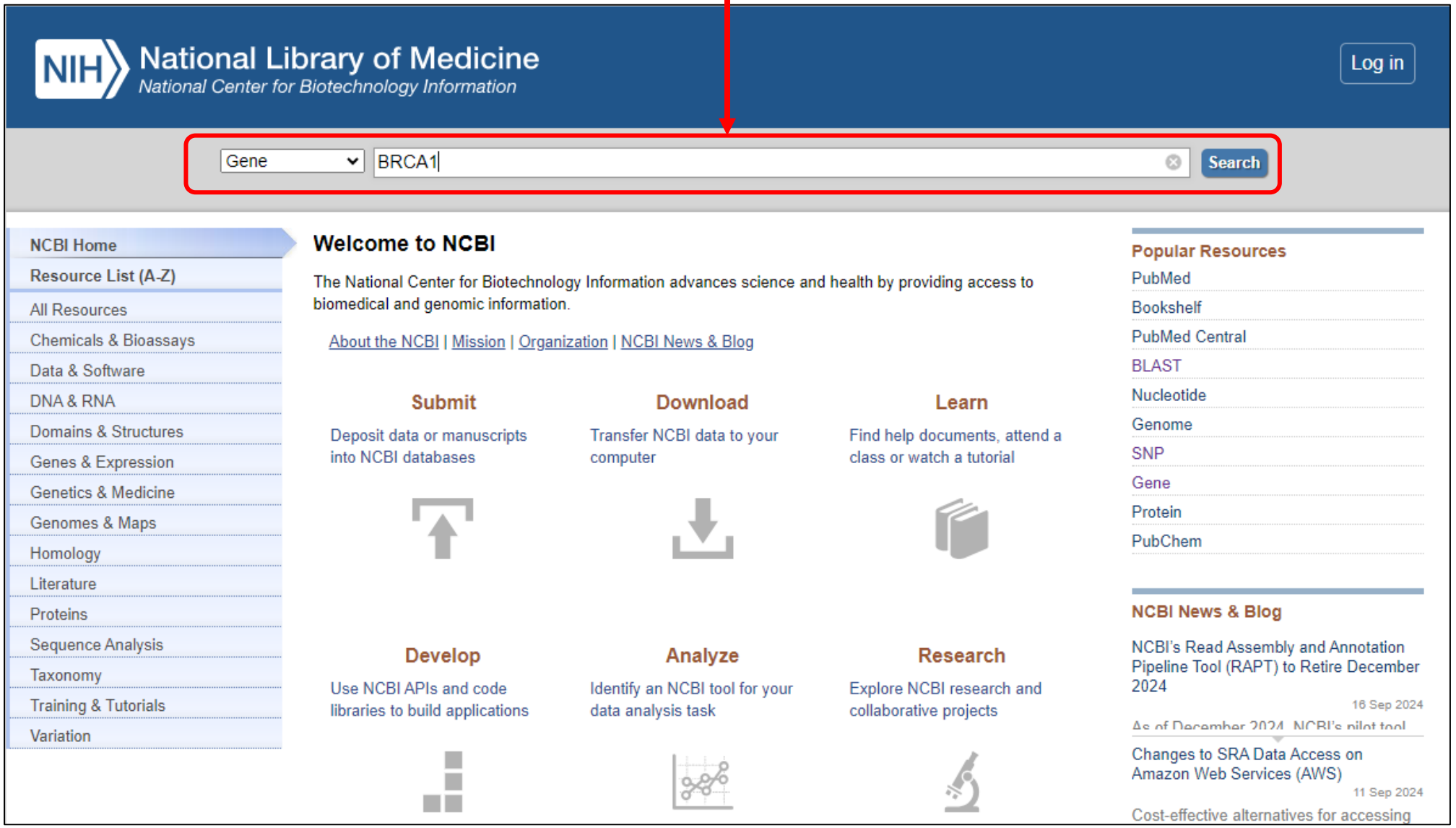
遺伝子名：BRCA1

目的	Accession ID	検索場所（一例）	分かったAccession ID
ゲノムDNA配列がプライマーを作成するために必要なため	NC_	NCBI	情報なし
ゲノムDNA配列のバリアント位置を確認するため	g.（genomic DNA）	Clin var TransVar	GRCh38 g.43063930C>T
コーディング領域の確認とリファレンス配列の確認をするため	MN_	Clin var TransVar	NM_007294 再確認！
mRNA配列のバリアント位置を確認するため どのような変化であるか確認するため	c.（coding DNA）	Clin var TransVar	c.5096G>A 再確認！ exon17
アミノ酸配列からバリアントを確認するため	p.(protein)	Clin var TransVar	p.Arg1699Gln 再確認！

獨協医科大学病院
Dokkyo Medical University Hospital

ゲノムDNA配列の検索

NCBIでGene「BRCA1」を検索する



獨協医科大学病院
Dokkyo Medical University Hospital

「Homo sapiens (human)」を選択する

National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

Log in

Gene | Gene | BRCA1 | Search
Create RSS | Save search | Advanced | Help

Gene sources
Genomic
Mitochondria
Organelles
Plasmids

Categories
Alternatively spliced
Annotated genes
Non-coding
Protein-coding
Pseudogene

Sequence content
CCDS
Ensembl
RefSeq
RefSeqGene

Status clear
✓ Current

Clear all

Show additional filters

Tabular | 20 per page | Sort by Relevance | Send to:

Hide sidebar >>

See BRCA1 BRCA1 DNA repair associated in the Gene database
brca1 in Homo sapiens | Mus musculus | Rattus norvegicus | All 510 Gene records

Search results

Items: 1 to 20 of 31254

<< First | < Prev | Page 1 of 1563 | Next > | Last >>

See also 689 discontinued or replaced items.

Name/Gene ID	Description	Location	Aliases	MIM
BRCA1 ID: 672	BRCA1 DNA repair associated [*Homo sapiens* (human)]	Chromosome 17, NC_000017.11 (43044295..43170327, complement)	BRCAI, BRCC1, BROVCA1, FANCS, IRIS, PNCA4, PPP1R53, PSCP, RNF53	113705
Brca1 ID: 12189	breast cancer 1, early onset [*Mus musculus* (house mouse)]	Chromosome 11, NC_000077.7 (101379587..101442808, complement)		
Brca1 ID: 497672	BRCA1, DNA repair associated [*Rattus norvegicus* (Norway rat)]	Chromosome 10, NC_086028.1 (86917693..86978012, complement)	BRCA-1	
BRCA1 ID: 403437	BRCA1 DNA repair associated [*Canis lupus familiaris* (dog)]	Chromosome 9, NC_051813.1 (20677057..20743989)		
BRCA1 ID: 373983	BRCA1 DNA repair associated [*Gallus gallus* (chicken)]	Chromosome 27, NC_052558.1 (5148367..5169536, complement)		
BRCA1 ID: 353120	BRCA1 DNA repair associated [*Bos taurus* (domestic cattle)]	Chromosome 19, NC_037346.1 (43069050..43140040, complement)		
BRCA1 ID: 827854	breast cancer susceptibility1 [*Arabidopsis thaliana* (thale cress)]	Chromosome 4, NC_003075.7 (11247991..11252757)	AT4G21070, ARABIDOPSIS THALIANA BREAST CANCER SUSCEPTIBILITY1, AT breast cancer susceptibility1	
BRCA1 ID: 712634	BRCA1 DNA repair associated [*Macaca mulatta* (Rhesus monkey)]	Chromosome 16, NC_041769.1 (54186473..54273232, complement)		
BRCA1 ID: 449497	BRCA1 DNA repair associated [*Pan troglodytes* (chimpanzee)]	Chromosome 19, NC_072417.2 (25025791..25106592)	CK820_G0038928	
BRCA1 ID: 554178	BRCA1 DNA repair associated [*Monodelphis domestica* (gray short-tailed opossum)]	Chromosome 2, NC_077228.1 (193283792..193360325)		

Filters: Manage Filters

Results by taxon

Top Organisms [Tree]
Homo sapiens *(1543)*
Mus musculus *(133)*
Strongylocentrotus purpuratus *(83)*
Triticum aestivum *(66)*
Rattus norvegicus *(56)*
All other taxa *(29373)*
More...

Find related data

Database: Select

Find items

Search details

```
BRCA1[All Fields] AND alive[prop]
```

Search | See more...

Recent activity

Turn Off | Clear

BRCA1 AND (alive[prop]) (31254) Gene

(70064[AlleleID]) OR (70065[AlleleID]) OR (46192[AlleleID]) (3) ClinVar

Homo sapiens BRCA1 DNA repair associated (BRCA1), transcript variant

下にスクロールする

BRCA1 BRCA1 DNA repair associated [*Homo sapiens* (human)]

Download Datasets

Gene ID: 672, updated on 12-Sep-2024

Summary

Official Symbol BRCA1 provided by HGNC
Official Full Name BRCA1 DNA repair associated provided by HGNC
Primary source HGNC:HGNC:1100
See related Ensembl:ENSG00000012048 MIM:113705; AllianceGenome:HGNC:1100
Gene type protein coding
RefSeq status REVIEWED
Organism Homo sapiens
Lineage Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo
Also known as IRIS; PSCP; BRCAI; BRCC1; FANCS; PNCA4; RNF53; BROVCA1; PPP1R53
Summary This gene encodes a 190 kD nuclear phosphoprotein that plays a role in maintaining genomic stability, and it also acts as a tumor suppressor. The BRCA1 gene contains 22 exons spanning about 110 kb of DNA. The encoded protein combines with other tumor suppressors, DNA damage sensors, and signal transducers to form a large multi-subunit protein complex known as the BRCA1-associated genome surveillance complex (BASC). This gene product associates with RNA polymerase II, and through the C-terminal domain, also interacts with histone deacetylase complexes. This protein thus plays a role in transcription, DNA repair of double-stranded breaks, and recombination. Mutations in this gene are responsible for approximately 40% of inherited breast cancers and more than 80% of inherited breast and ovarian cancers. Alternative splicing plays a role in modulating the subcellular localization and physiological function of this gene. Many alternatively spliced transcript variants, some of which are disease-associated mutations, have been described for this gene, but the full-length natures of only some of these variants has been described. A related pseudogene, which is also located on chromosome 17, has been identified. [provided by RefSeq, May 2020]
Expression Broad expression in testis (RPKM 5.2), lymph node (RPKM 3.3) and 23 other tissues See more
Orthologs mouse all

NEW Try the new Gene table
Try the new Transcript table

Genomic context

Location: 17q21.31

Exon count: 31

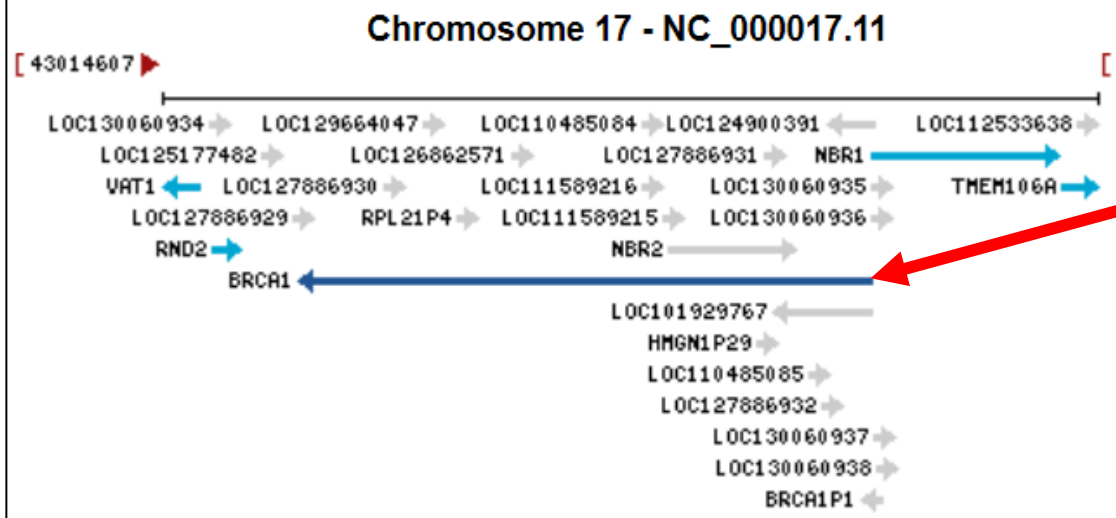
Annotation release	Status	Assembly	Chr	Location

・リファレンスゲノムがTrans Varと同じGRCh38が選択されていることを確認する。

・GRCh38ではNC_000017.11がgDNAのAccession IDとなる。

・リファレンスゲノム上でのバリアント位置g.43063930を検索する。

・検索した場所の塩基はCであり、g.43063930C＞Tと一致する。



・染色体での遺伝子の位置を確認する。

・BRCA1は転写の向きがリファレンスゲノムとは逆方向であるためNM番号上で確認する場合は下の配列を見る。

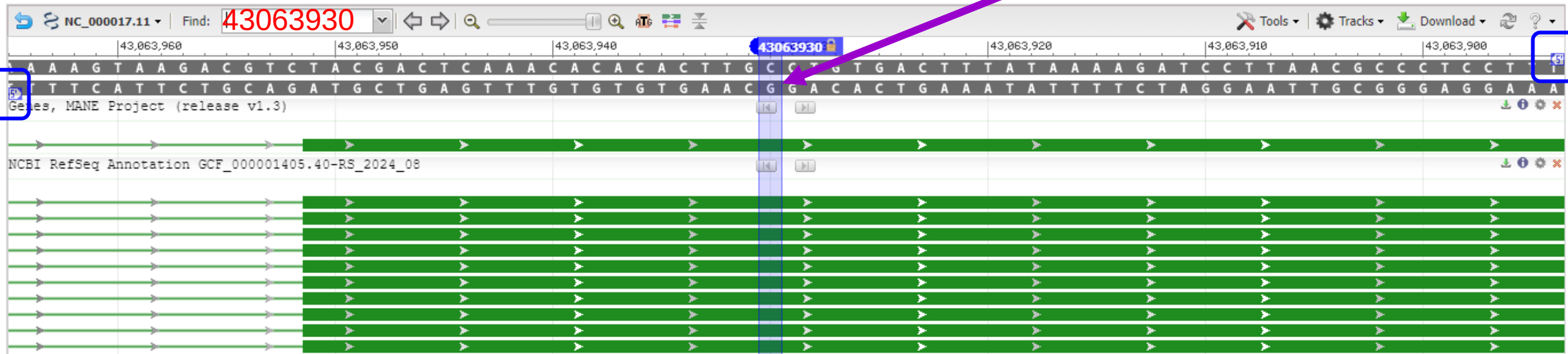
今回c.5096G>Aとなっており一致する。

Genomic regions, transcripts, and products

Go to reference sequence details

Genomic Sequence: NC_000017.11 Chromosome 17 Reference GRCh38.p14 Primary Assembly

Go to nucleotide: Graphics FASTA GenBank



得られた情報を追加

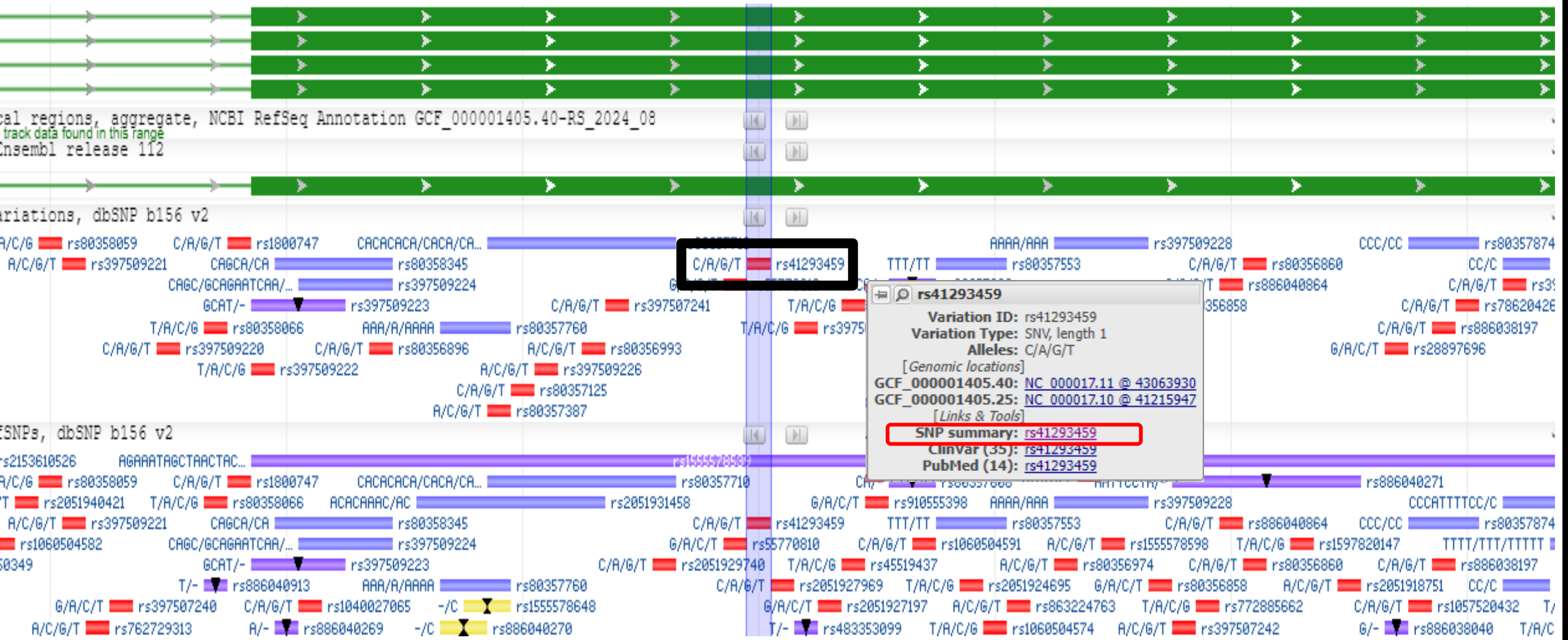
遺伝子名：BRCA1

目的	Accession ID	検索場所（一例）	分かったAccession ID
ゲノムDNA配列がプライマーを作成するために必要なため	NC_	NCBI	NC_000017.11
ゲノムDNA配列のバリアント位置を確認するため	g.（genomic DNA）	Clin var TransVar	g.43063930C>T
コーディング領域の確認とリファレンス配列の確認をするため	MN_	Clin var TransVar	NM_007294 再確認！
mRNA配列のバリアント位置を確認するため どのような変化であるか確認するため	c.（coding DNA）	Clin var TransVar	c.5096G>A 再確認！ exon17に位置する
アミノ酸配列からバリアントを確認するため	p.(protein)	Clin var TransVar	p.Arg1699Gln 再確認！

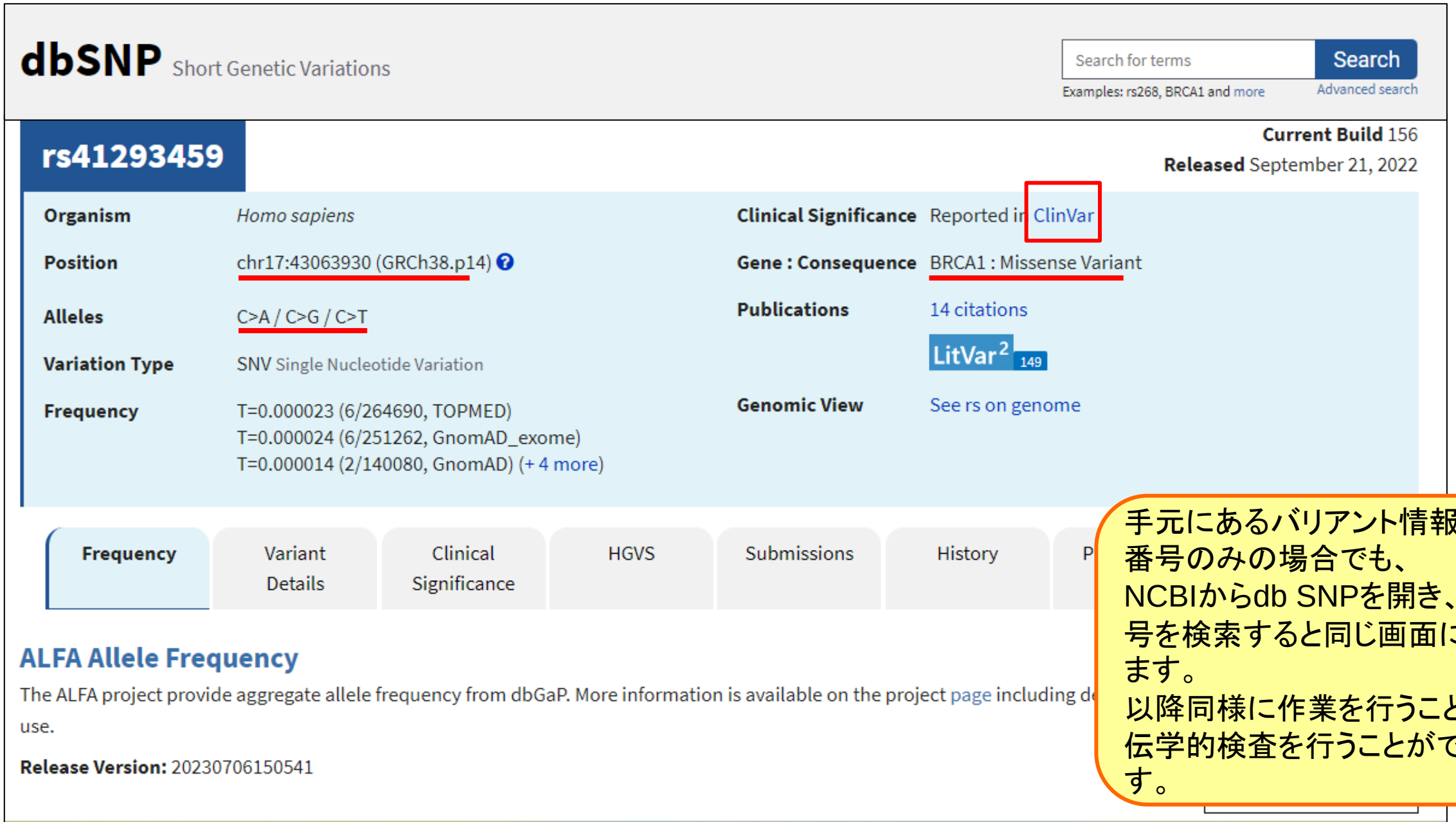
獨協医科大学病院
Dokkyo Medical University Hospital

バリアントの確認とリファレンス(NM_)の検索

・下にスクロールするとバリアントが表示されているので、目的のバリアント(g.43063930C＞T)と同じrs番号を探す。
・rs番号にカーソルを合わせSNP summaryを押とdb SNPを開くことができる。



目的のバリアント情報（ BRCA1　GRCh38 g.43063930C>T）と一致しているか確認し、ClinVarを開く



手元にあるバリアント情報がrs番号のみの場合でも、NCBIからdb SNPを開き、rs番号を検索すると同じ画面になります。
以降同様に作業を行うことで遺伝学的検査を行うことができます。

獨協医科大学病院
Dokkyo Medical University Hospital

目的のバリアント(BRCA1　c.5096G>A　p.Arg1699Gln)を選択し開く

ClinVar

ClinVar ((70064[AlleleID])OR(70065[AlleleID])OR(46192[AlleleID])) Search

Create alert　Advanced

Home | About | Access | Help | Submit | Statistics | FTP

We've updated the ClinVar website to better support classifications of somatic variants!

Read more about changes to the website in our web release notes; more information about somatic variants in ClinVar is available on GitHub.

Classification type
- Germline (3)
- Somatic (0)

Germline classification
- Conflicting classifications (1)
- Benign (0)
- Likely benign (0)
- Uncertain significance (0)
- Likely pathogenic (1)
- Pathogenic (1)

Types of conflicts
- P/LP vs LB/B (0)
- P/LP vs VUS (1)
- VUS vs LB/B (0)

Molecular consequence
- Frameshift (0)
- Missense (3)
- Nonsense (0)
- Splice site (0)
- ncRNA (3)
- Near gene (0)
- UTR (0)

Display options ▾ Sort by Location ▾ Download ▾　Items: 3

Search results

Variation	Gene (Protein Change)	Type (Consequence)	Condition	Classification, Review status
NM_007294.4(BRCA1):c.5096G>T (p.Arg1699Leu)	BRCA1 (R1699L +78 more)	Single nucleotide variant (missense variant +1 more)	Hereditary breast ovarian cancer syndrome +1 more	G Likely pathogenic ★★
NM_007294.4(BRCA1):c.5096G>C (p.Arg1699Pro)	BRCA1 (R1699P +78 more)	Single nucleotide variant (missense variant +1 more)	Familial cancer of breast +3 more	G Conflicting classifications of pathogenicity ★
NM_007294.4(BRCA1):c.5096G>A (p.Arg1699Gln)	BRCA1 (R1699Q +78 more)	Single nucleotide variant (missense variant +1 more)	Breast-ovarian cancer, familial, susceptibility to, 1	G Pathogenic ★★★

Display options ▾ Sort by Location ▾ Download ▾　Items: 3

獨協医科大学病院 Dokkyo Medical University Hospital

NM_007294.4(BRCA1):c.5096G>A (p.Arg1699Gln)

Cite Follow Print Download

On this page

- Classification Summary
- Variant Details
- Genes
- Germline
  - Conditions
  - Submissions
  - Functional Evidence
  - Citations
- Text mined Citations

Germline

Top reviewed classifications are shown here. Submission summary: 48 submissions 47 submitters 10 conditions

Reviewed by expert panel ★★★☆

Pathogenic May 2017 by Evidence-based...

for Breast-ovarian cancer, familial, susceptibility to, 1

Somatic

No data submitted for somatic clinical impact

Somatic

No data submitted for oncogenicity

Variant Details

Identifiers: NM_007294.4(BRCA1):c.5096G>A (p.Arg1699Gln)

Variation ID: 37636 Accession: VCV000037636.128

Type and length: single nucleotide variant, 1 bp

Location: Cytogenetic: 17q21.31 17: 43063930 (GRCh38) [NCBI UCSC] 17: 41215947 (GRCh37) [NCBI UCSC]

Timeline in ClinVar:

	First in ClinVar	Last submission	Last evaluated
Germline	Apr 1, 2014	Aug 25, 2024	May 10, 2017

HGVS:

Nucleotide	Protein	Molecular consequence
NM_007294.4:c.5096G>A MANE SELECT	NP_009225.1:p.Arg1699Gln	missense
NM_001407571.1:c.4883G>A	NP_001394500.1:p.Arg1628Gln	missense
NM_001407581.1:c.5162G>A	NP_001394510.1:p.Arg1721Gln	missense

... more HGVS

Protein change: R1699Q, R1652Q, R595Q, R1720Q, R1572Q, R1611Q, R1627Q, R1657Q, R1671Q, R1672Q, R1698Q, R1721Q, R287Q, R469Q, R516Q, R529Q, R547Q, R548Q, R555Q, R556Q, R557Q, R569Q, R592Q, R593Q, R617Q, R1402Q, R1571Q, R1587Q, R1651Q, R1656Q, R1680Q, R1697Q, R506Q, R525Q, R528Q, R549Q, R553Q, R570Q, R618Q, R830Q, R1530Q, R1570Q, R1586Q, R1588Q, R1610Q, R1629Q,

「MANE SELECT」がついたNM番号をリファレンスとして使用する。

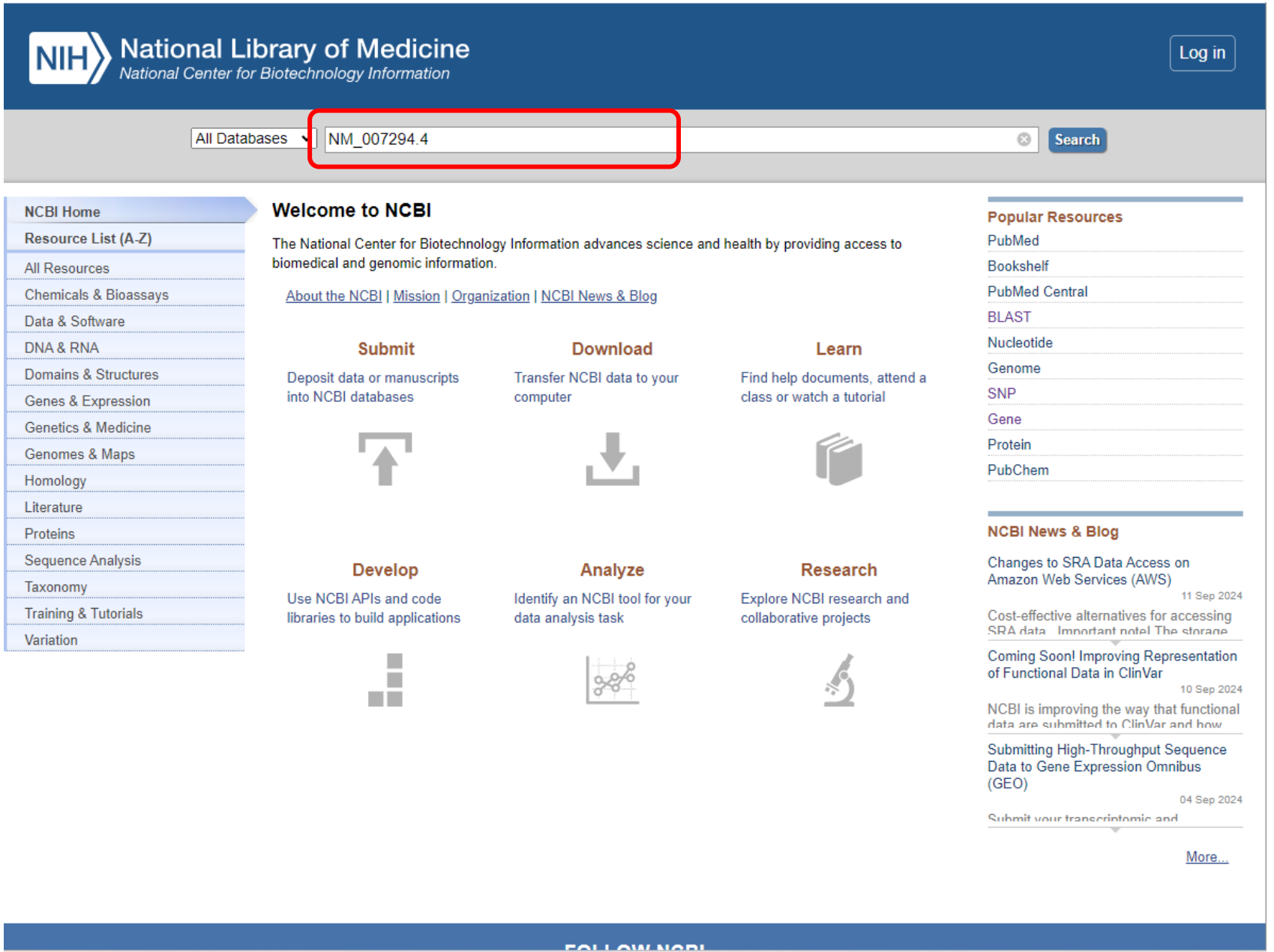
今回はNM_007294.4となり、バリアント位置やアミノ酸変異の情報を再確認する事ができた。

得られた情報を追加

遺伝子名：BRCA1

目的	Accession ID	検索場所（一例）	分かったAccession ID
ゲノムDNA配列がプライマーを作成するために必要なため	NC_	NCBI	NC_000017.11
ゲノムDNA配列のバリアント位置を確認するため	g.（genomic DNA）	Clin var TransVar	g.43063930C>T
コーディング領域の確認とリファレンス配列の確認をするため	MN_	Clin var TransVar	NM_007294
mRNA配列のバリアント位置を確認するため どのような変化であるか確認するため	c.（coding DNA）	Clin var TransVar	c.5096G>A exon17に位置する
アミノ酸配列からバリアントを確認するため	p.(protein)	Clin var TransVar	p.Arg1699Gln

mRNAの配列上でバリントを確認するため、NCBIで先ほど調べたリファレンスのNM番号を検索する



Search NCBI | NM_007294.4 | Search

Results found in 6 databases

NUCLEOTIDE SEQUENCE

Homo sapiens BRCA1 DNA repair associated (BRCA1), transcript variant 1, mRNA

Homo sapiens
7,088 bp mRNA sequence
NM_007294.4

FASTA Gene

BLAST Download

Literature	
Bookshelf	0
MeSH	0
NLM Catalog	0
PubMed	4
PubMed Central	239

Genes	
Gene	1
GEO DataSets	0
GEO Profiles	0
PopSet	0

Proteins	
Conserved Domains	0
Identical Protein Groups	1
Protein	0
Protein Family Models	0
Structure	0

Genomes	
Assembly / Genome NCBI Datasets	

Clinical	
ClinicalTrials.gov	0

PubChem	
BioAssays	0

GenBank

Send to:

Homo sapiens BRCA1 DNA repair associated (BRCA1), transcript variant 1, mRNA

NCBI Reference Sequence: NM_007294.4

FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       NM_007294              7088 bp    mRNA    linear   PRI 17-MAR-2024
DEFINITION  Homo sapiens BRCA1 DNA repair associated (BRCA1), transcript
            variant 1, mRNA.
ACCESSION   NM_007294
VERSION     NM_007294.4
KEYWORDS    RefSeq; MANE Select.
SOURCE      Homo sapiens (human)
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
            Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini;
            Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 7088)
  AUTHORS   Orban,T.I. and Olah,E.
  TITLE     Emerging roles of BRCA1 alternative splicing
  JOURNAL   Mol Pathol 56 (4), 191-197 (2003)
   PUBMED   12890739
  REMARK    Review article
REFERENCE   2  (bases 1 to 7088)
  AUTHORS   Orban,T.I. and Olah,E.
  TITLE     Expression profiles of BRCA1 splice variants in asynchronous and in
            G1/S synchronized tumor cell lines
  JOURNAL   Biochem Biophys Res Commun 280 (1), 32-38 (2001)
   PUBMED   11162473
REFERENCE   3  (bases 1 to 7088)
  AUTHORS   Paterson,J.W.
  TITLE     BRCA1: a review of structure and putative functions
  JOURNAL   Dis Markers 13 (4), 261-274 (1998)
   PUBMED   9553742
  REMARK    Review article
REFERENCE   4  (bases 1 to 7088)
  AUTHORS   Xu,C.F., Chambers,J.A., Nicolai,H., Brown,M.A., Hujeirat,Y.,
            Mohammed,S., Hodgson,S., Kelsell,D.P., Spurr,N.K., Bishop,D.T. and
```

Change region shown

Customize view

Analyze this sequence
Run BLAST
Pick Primers
Highlight Sequence Features
Find in this Sequence
Show in Genome Data Viewer

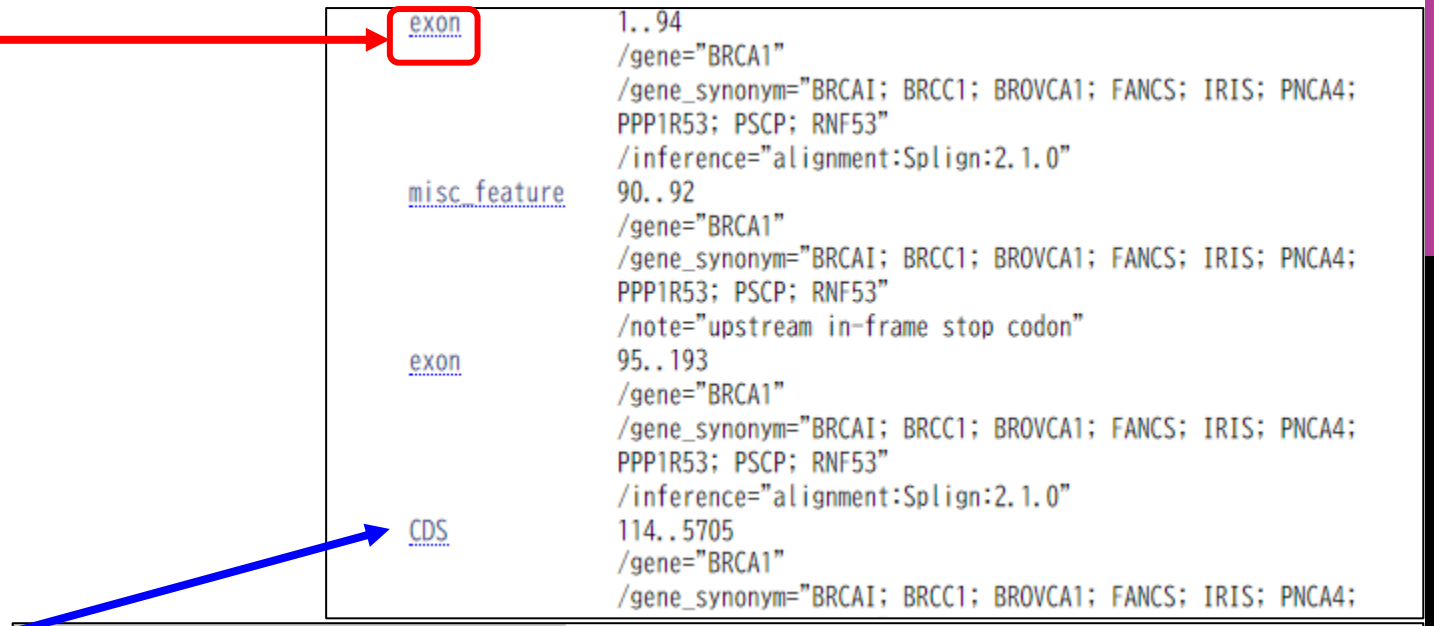
Articles about the BRCA1 gene
Constitutional BRCA1 and MGMT Methylation Are Significant Risk Factors f [Int J Mol Sci. 2024]
Preliminary insights on the mutational spectrum of BRCA1 and BRCA2 genes ir [Neoplasia. 2024]
BRCA1 deficiency enhances the aggressiveness of breast cancer cells expressing [Biol Cell. 2024]
See all...

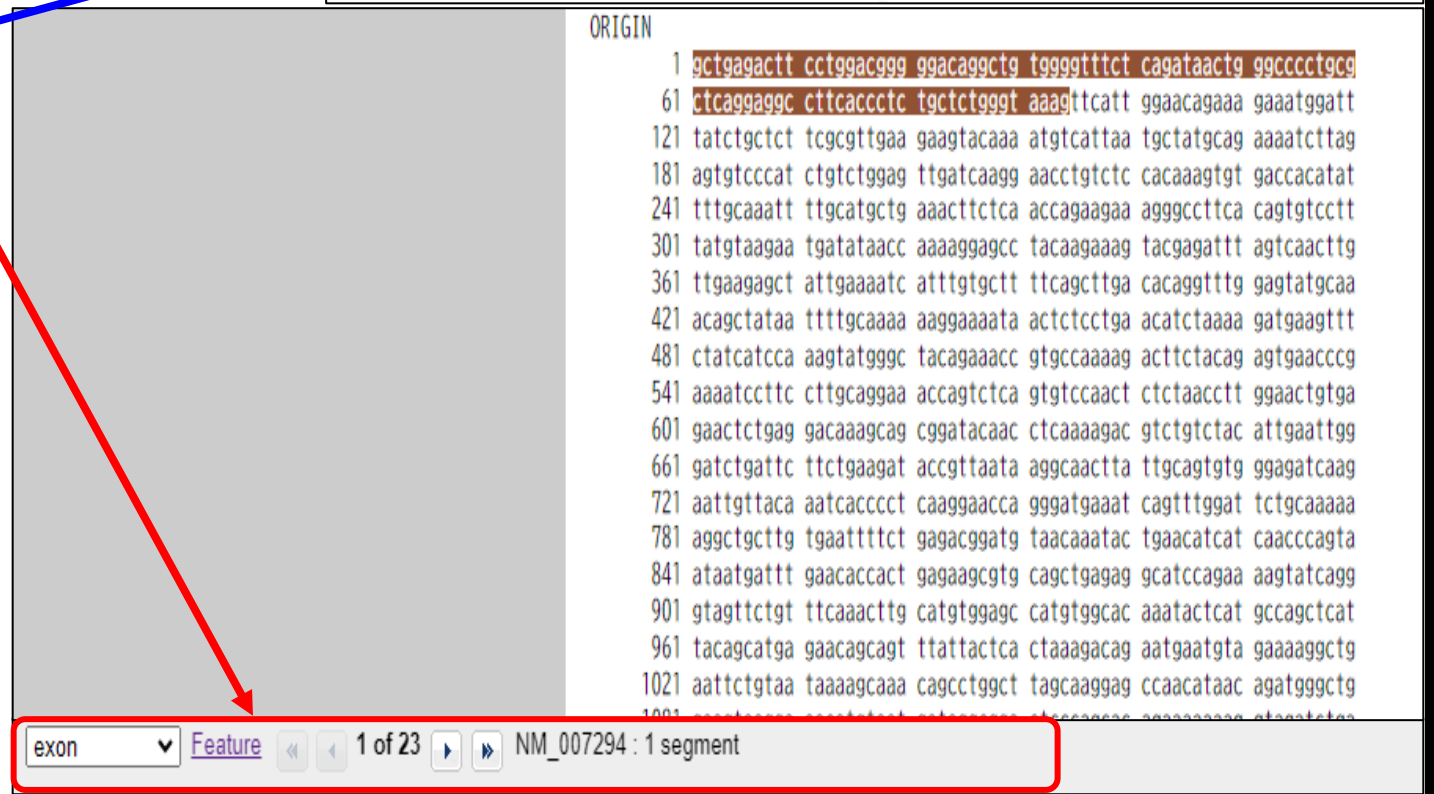
Reference sequence information
RefSeq alternative splicing
See 368 reference mRNA sequence splice variants for the BRCA1 gene.
RefSeq protein product
See the reference protein sequence for breast cancer type 1 susceptibility protein isoform 1 (NP_009225.1).

・exon1がBRCA1の1番から94番までの塩基に位置していることを示す。

・「exon」を押すとexon1の塩基配列に移動する。（茶色の配列＝ exon1）
また、画面左下のツールを使って各exonへ移動し塩基配列を確認する事ができる。
※この機能を使ってバリアントのあるexon17を探す。

・タンパク質に翻訳されるコーディング領域が114番目から5705番目の塩基まででであることを示す。





バリアント（c.5096G>A）位置の探し方

・コーデング領域の開始点＋バリアントの位置－1（塩基）＝実際のバリアント位置

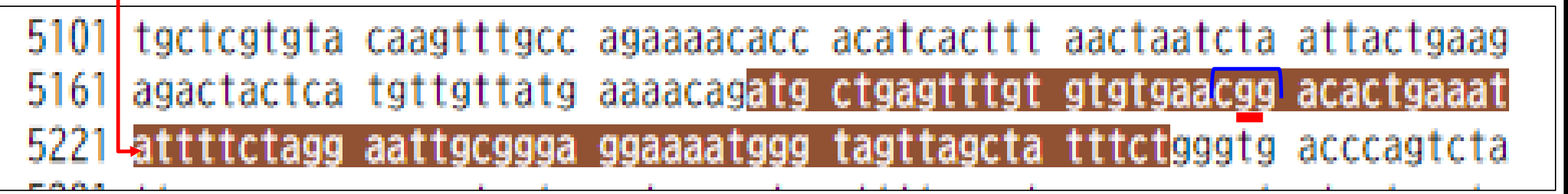
今回は114+5096-1=5209

5209番目にGがある。

c.5096G>A　p.Arg1699Glnのアミノ酸配列の確認方法

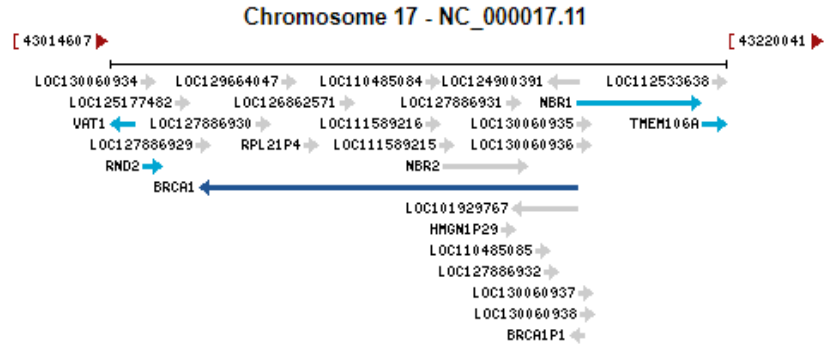
- コーディングDNAでのバリアント位置÷3＝小数点以下が3の場合コドンの1番目の塩基
  小数点以下が6の場合コドンの2番目の塩基
  小数点以下が9の場合コドンの3番目の塩基
- 5096÷3=1698.6666….
  小数以下が6なのでc.5096のGはコドンの2番目の塩基となる。
  よってCGG=Arg　Aに変化した場合はCAG=Glnとなる。

茶色の配列
＝ exon17



NM番号で検索したexon17とGRCh38で検索したバリアント位置のexon17の配列が一致しているか確認する

```
5101 tgctcgtgta caagtttgcc agaaaacacc acatcacttt aactaatcta attactgaag
5161 agactactca tgttgttatg aaaacagatg ctgagtttgt gtgtgaacgg acactgaaat
5221 attttctagg aattgcggga ggaaaatggg tagttagcta tttctgggtg acccagtcta
```



Genomic regions, transcripts, and products

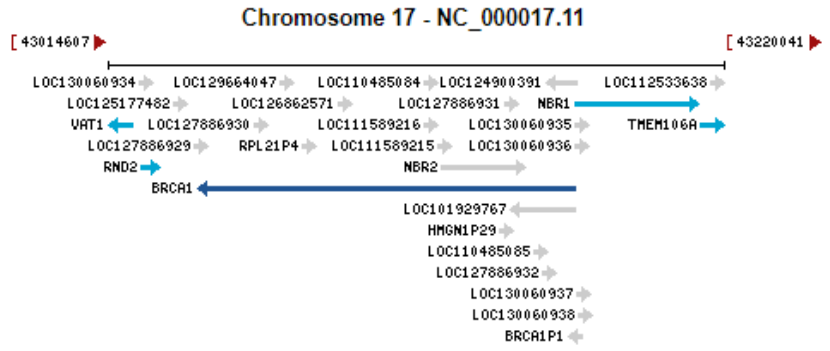
Go to reference sequence details

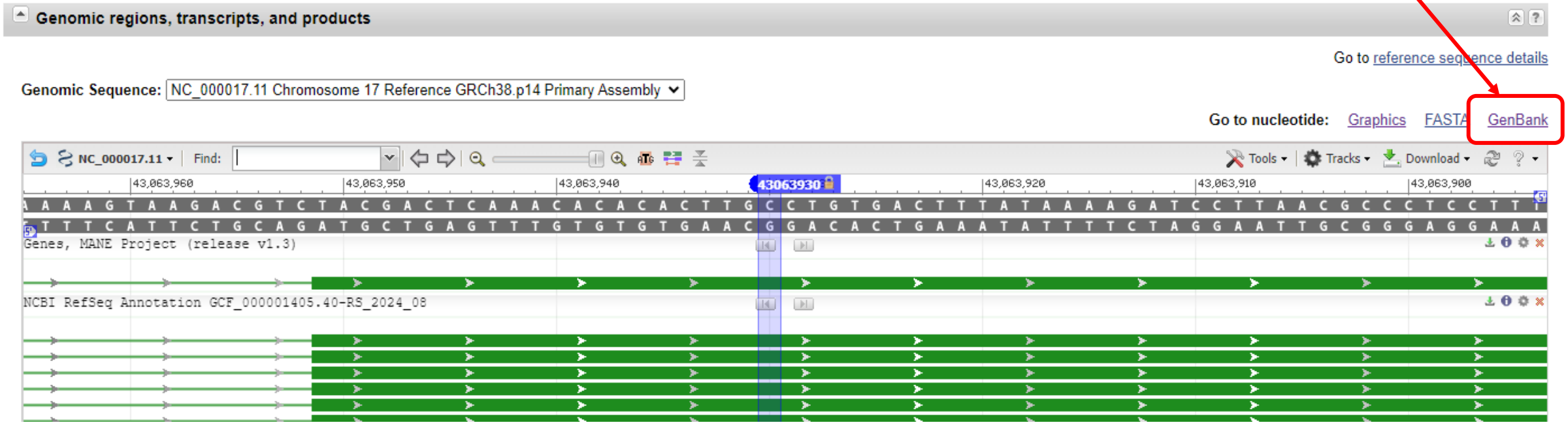
Genomic Sequence: NC_000017.11 Chromosome 17 Reference GRCh38.p14 Primary Assembly

Go to nucleotide: Graphics FASTA GenBank

プライマーの作成に必要なデータをダウンロードする

・NCBIでGene「BRCA1」を検索→Homo sapiens (human)選択して開いたページに戻る。（スライド12枚目）
・プライマー作成に必要なGneBankのデータをダウンロードする。





GenBank

Send to:

Homo sapiens chromosome 17, GRCh38.p14 Primary Assembly

NCBI Reference Sequence: NC_000017.11

FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       NC_000017            126033 bp    DNA     linear   CON 26-AUG-2024
DEFINITION  Homo sapiens chromosome 17, GRCh38.p14 Primary Assembly.
ACCESSION   NC_000017 REGION: complement(43044295..43170327)
VERSION     NC_000017.11
DBLINK      BioProject: PRJNA168
            Assembly: GCF_000001405.40
KEYWORDS    RefSeq.
SOURCE      Homo sapiens (human)
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
            Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini;
            Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 126033)
  AUTHORS   Zody,M.C., Garber,M., Adams,D.J., Sharpe,T., Harrow,J.,
            Lupski,J.R., Nicholson,C., Searle,S.M., Wilming,L., Young,S.K.,
            Abouelleil,A., Allen,N.R., Bi,W., Bloom,T., Borowsky,M.L.,
            Bugalter,B.E., Butler,J., Chang,J.L., Chen,C.K., Cook,A., Corum,B.,
            Cuomo,C.A., de Jong,P.J., DeCaprio,D., Dewar,K., FitzGerald,M.,
            Gilbert,J., Gibson,R., Gnerre,S., Goldstein,S., Grafham,D.V.,
            Grocock,R., Hafez,N., Hagopian,D.S., Hart,E., Norman,C.H.,
            Humphray,S., Jaffe,D.B., Jones,M., Kamal,M., Khodiyar,V.K.,
            LaButti,K., Laird,G., Lehoczky,J., Liu,X., Lokyitsang,T.,
            Loveland,J., Lui,A., Macdonald,P., Major,J.E., Matthews,L.,
            Mauceli,E., McCarroll,S.A., Mihalev,A.H., Mudge,J., Nguyen,C.,
            Nicol,R., O'Leary,S.B., Osoegawa,K., Schwartz,D.C., Shaw-Smith,C.,
            Stankiewicz,P., Steward,C., Swarbreck,D., Venkataraman,V.,
            Whittaker,C.A., Yang,X., Zimmer,A.R., Bradley,A., Hubbard,T.,
            Birren,B.W., Rogers,J., Lander,E.S. and Nusbaum,C.
  TITLE     DNA sequence of human chromosome 17 and analysis of rearrangement
            in the human lineage
  JOURNAL   Nature 440 (7087), 1045-1049 (2006)
   PUBMED   16625196
```

Complete Record
Coding Sequences
Gene Features

Choose Destination

File Clipboard
Collections Analysis Tool

Download 1 item.

Format

GenBank

Show GI

Create File

shown

nce (abbreviated view)

on

to: 43170327

Update View

iew

es

A, and CDS features only

ns

rse complement

Show gap features

Update View

Analyze this sequence

Run BLAST

Pick Primers

Highlight Sequence Features

Find in this Sequence

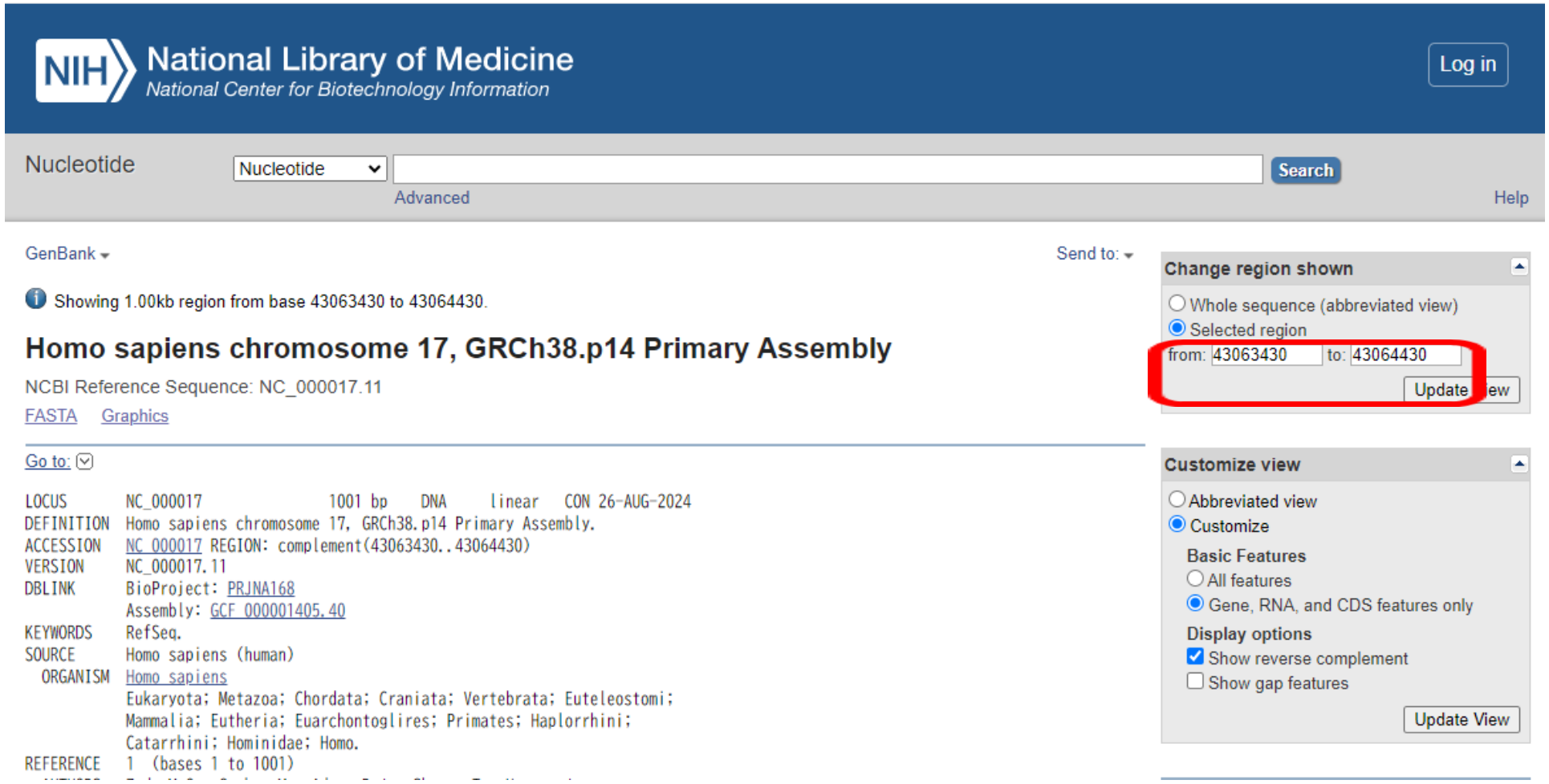
Related information

Assembly

BioProject

Protein

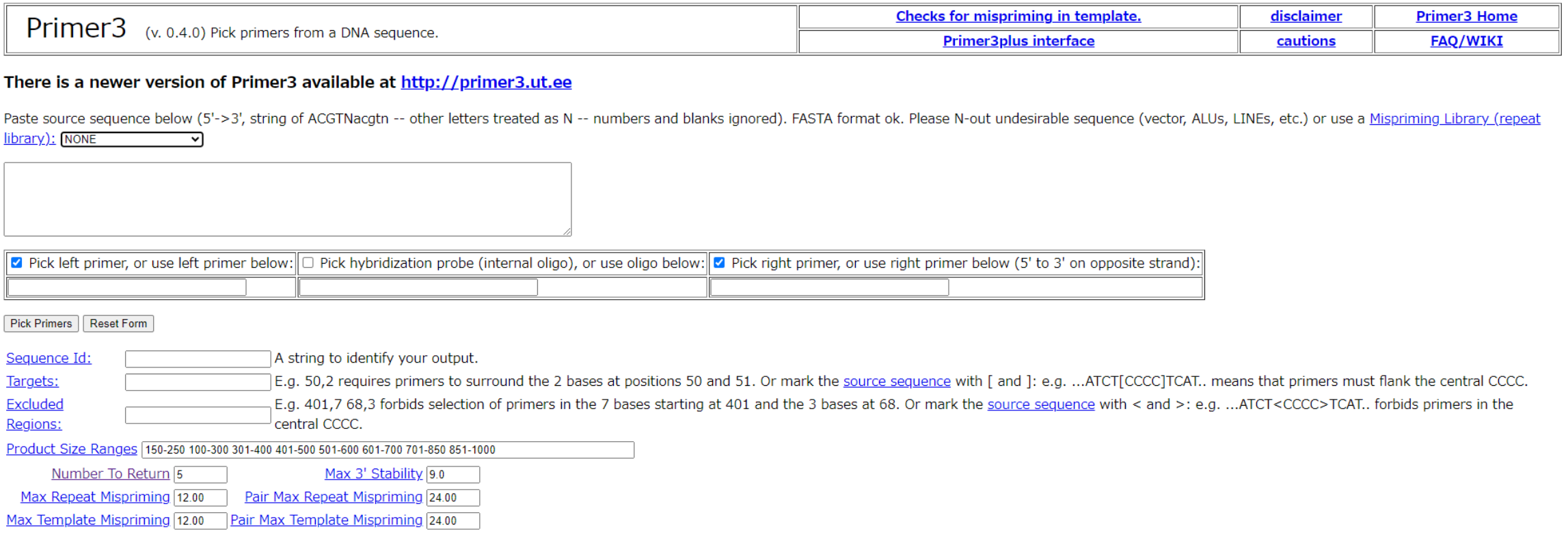
PubMed



BRCA1遺伝子は大きいため、ダウンロードデータも多いので、バリアント位置から前後500bpのデータに絞ってダウンロードする。

プライマーの作成

PCRを行う際にはプライマーを適切に設計することが重要です。
しかし、プライマーを設計する際には様々な条件に注意する必要があり塩基配列から目視で見つけ出すことは容易ではありません。
そこでプログラムを使って自動でプライマーを作成してくれる「Primer3」を使用します。



https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/

獨協医科大学病院
Dokkyo Medical University Hospital

パラメータの設定方法

何の配列を使用するか選択します。

Paste source sequence below (5'->3', string of ACGTNacgtn -- other letters treated as N -- numbers and blanks ignored). FASTA format ok. Please N-out undesirable sequence (vector, ALUs, LINEs, etc.) or use a Mispriming Library (repea library): HUMAN

Pick left primer, or use left primer below:	Pick hybridization probe (internal oligo), or use oligo below:	Pick right primer, or use right primer below (5' to 3' on opposite strand):

Pick Primers Reset Form

Sequence Id: A string to identify your output.

Targets: E.g. 50,2 requires primers to surround the 2 bases at positions 50 and 51. Or mark the source sequence with [and]: e.g. ...ATCT[CCCC]TCAT.. means that primers must flank the central CCCC.

Excluded Regions: E.g. 401,7 68,3 forbids selection of primers in the 7 bases starting at 401 and the 3 bases at 68. Or mark the source sequence with < and >: e.g. ...ATCT<CCCC>TCAT.. forbids primers in the central CCCC.

Product Size Ranges: 200-800

Number To Return: 50 Max 3' Stability: 9.0

Max Repeat Mispriming: 12.00 Pair Max Repeat Mispriming: 24.00

Max Template Mispriming: 12.00 Pair Max Template Mispriming: 24.00

Pick Primers Reset Form

General Primer Picking Conditions

Primer Size Min: 20 Opt: 23 Max: 25

Primer Tm Min: 58.0 Opt: 63.0 Max: 65.0 Max Tm Difference: 4.0 Table of thermodynamic parameters: Breslauer et al. 1986

Product Tm Min: Opt: Max:

Primer GC% Min: 30.0 Opt: Max: 70.0

Max Self Complementarity: 5.00 Max 3' Self Complementarity: 1.00

Max #N's: 0 Max Poly-X: 3

Inside Target Penalty: Outside Target Penalty: 0 Note: you can set Inside Target Penalty to allow primers inside a target.

First Base Index: 1 CG Clamp: 0

Concentration of monovalent cations: 50.0 Salt correction formula: Schildkraut and Lifson 1965

Concentration of divalent cations 0.0 Concentration of dNTPs 0.0

・デフォルトで数値が入力されている項目がありますが、
当検査室では赤い四角で囲った項目の再設定を行っています。

Objective Function Penalty Weights for Primers

Tm	Lt:	0.0	Gt:	0.0
Size	Lt:	0.0	Gt:	0.0
GC%	Lt:	0.0	Gt:	0.0

Self Complementarity	0.5
3' Self Complementarity	1.0
#N's	0.0
Mispriming	0.0
Sequence Quality	0.0
End Sequence Quality	0.0
Position Penalty	0.0
End Stability	0.0
Template Mispriming	0.0

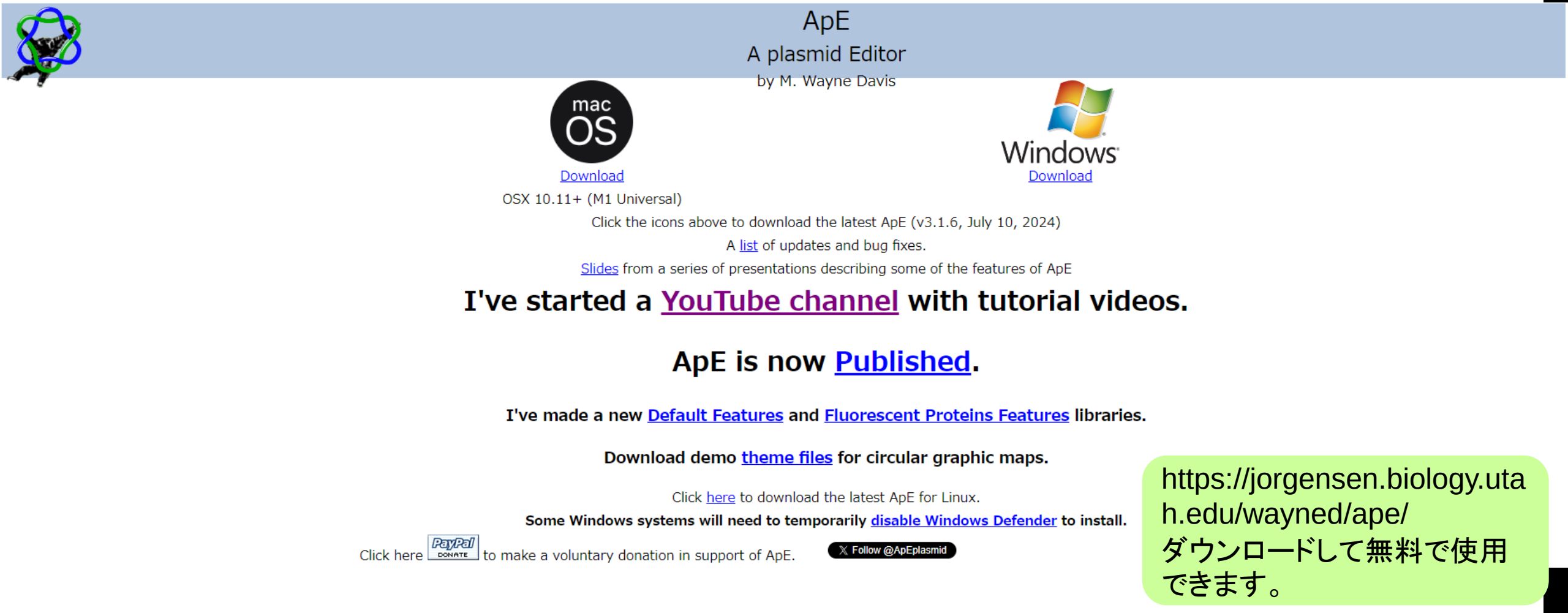
Objective Function Penalty Weights for Primer *Pairs*

Product Size	Lt:	0.0	Gt:	0.0
Product Tm	Lt:	0.0	Gt:	0.0

Tm Difference	0.0
Any Complementarity	0.5
3' Complementarity	1.0
Pair Mispriming	0.0
Primer Penalty Weight	0.0
Hyb Oligo Penalty Weight	0.0
Primer Pair Template Mispriming Weight	0.0

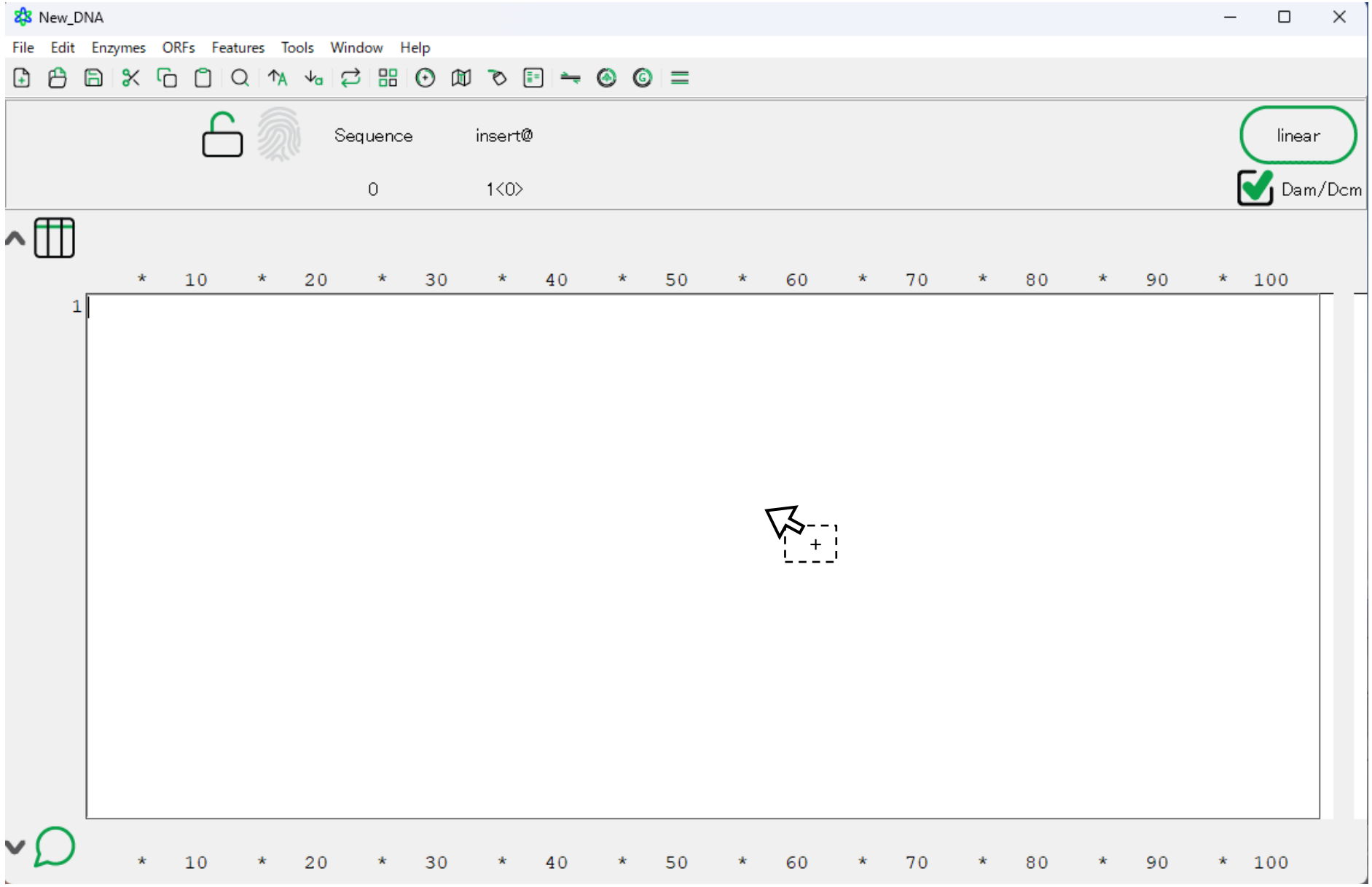
・プライマーを設定する場所は、バリアントのみを増幅するように作るのではなく、バリアントのあるexon17全体を増幅するように設定します。

・先程ダウンロードしたGneBankのデータからexonとintronの配列を検索するために、A plasmid Editorというプログラムを使います。



https://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/ape/
ダウンロードして無料で使用できます。

A plasmid Editorのプログラムを開き、ダウンロードしたGneBankファイルをドラッグ&ドロップする。



NC.000017.11 BRCA1 GRCh38 GB 43063930-+500.gb

File Edit Enzymes ORFs Features Tools Window Help

Sequence	Start	Length	End	ORF	Tm	%GC	linear
1001	480<2>	78<0>	557<1>	M-/-	73.5° C	40%	Dam/Dcm

Feature	Directi	Type	Location
Hidden			
BRCA1	>>>	gene	1..1001
BRCA1 DNA repair associated, transcript variant 317	>>>	mRNA	480..557
BRCA1 DNA repair associated, transcript variant 233	>>>	mRNA	480..557
BRCA1 DNA repair associated, transcript variant 226	>>>	mRNA	480..557

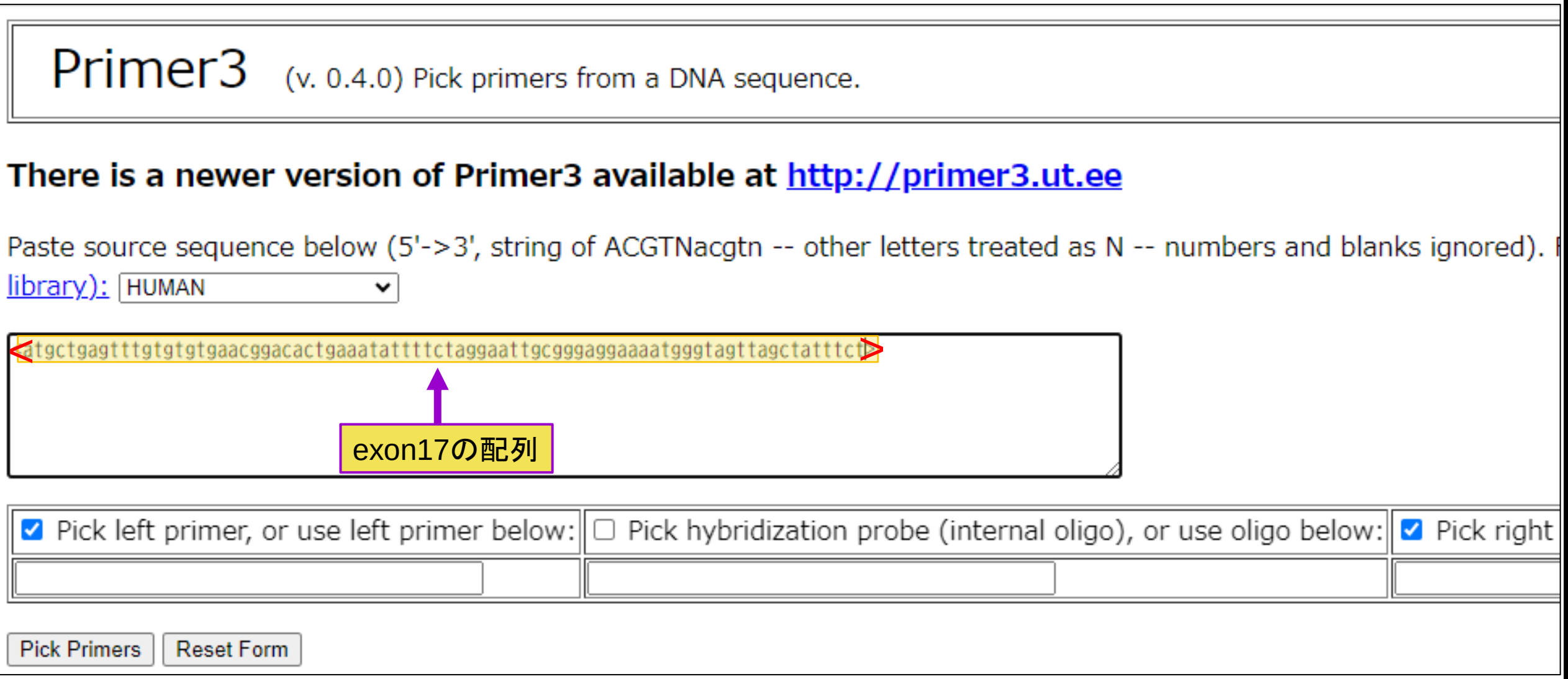
```
        *   10    *   20    *   30    *   40    *   50    *   60    *   70    *   80    *   90    *  100
    1 ttaggactccccaggtagacattctaggggtgaaaatttgtcattacattgacatttcagatttaggttttcaacaatactgttttcttctttcacatat
  101 tgccatctagtaatatagatgttctccgtccacattaatcaaaactattgacatggataattcctaattccttgaacactataatggagatctatagcta
  201 gccttggcgtctagaagatgggtgttgagaagagggagtggacagatatttcctctggtcttaacttcatatcagcctcccctagacttccaaatatcca
  301 tacctgctggttataattagtggtgttttcagcctctgattctgtcaccaggggttttagaatcataaatccagattgatcttgggagtgtaaaaaactg
  401 aggctctttagcttcttaggacagcacttcctgattttgttttcaacttctaatcctttgagtgtttttcattctgcagatgctgagtttgtgtgtgaac
  501 ggacactgaaatattttctaggaattgcgggaggaaaatgggtagttagctatttctgtaagtataatactatttctcccctcctccctttaacacctca
  601 gaattgcatttttacacctaacgtttaacacctaaggtttttgctgatgctgagtctgagttaccaaaaggtctttaattgtaatactaaactacttttta
  701 tctttaatatcactttgttcagataagctggtgatgctgggaaaatgggtctcttttataactaataggacctaatctgctcctagcaatgttagcatat
  801 gagctagggatttatttaatagtcggcaggaatccatgtgcagcaggcaaacttataatgtttaaattaaacatcaactctgtctccagaaggaaactgc
  901 tgctacaagccttattaaagggctgtggctttagagggaaggacctctcctctgtcattcttcctgtgctcttttgtgaatcgctgacctctctatctcc
 1001 g
```

黄色：exon17の配列

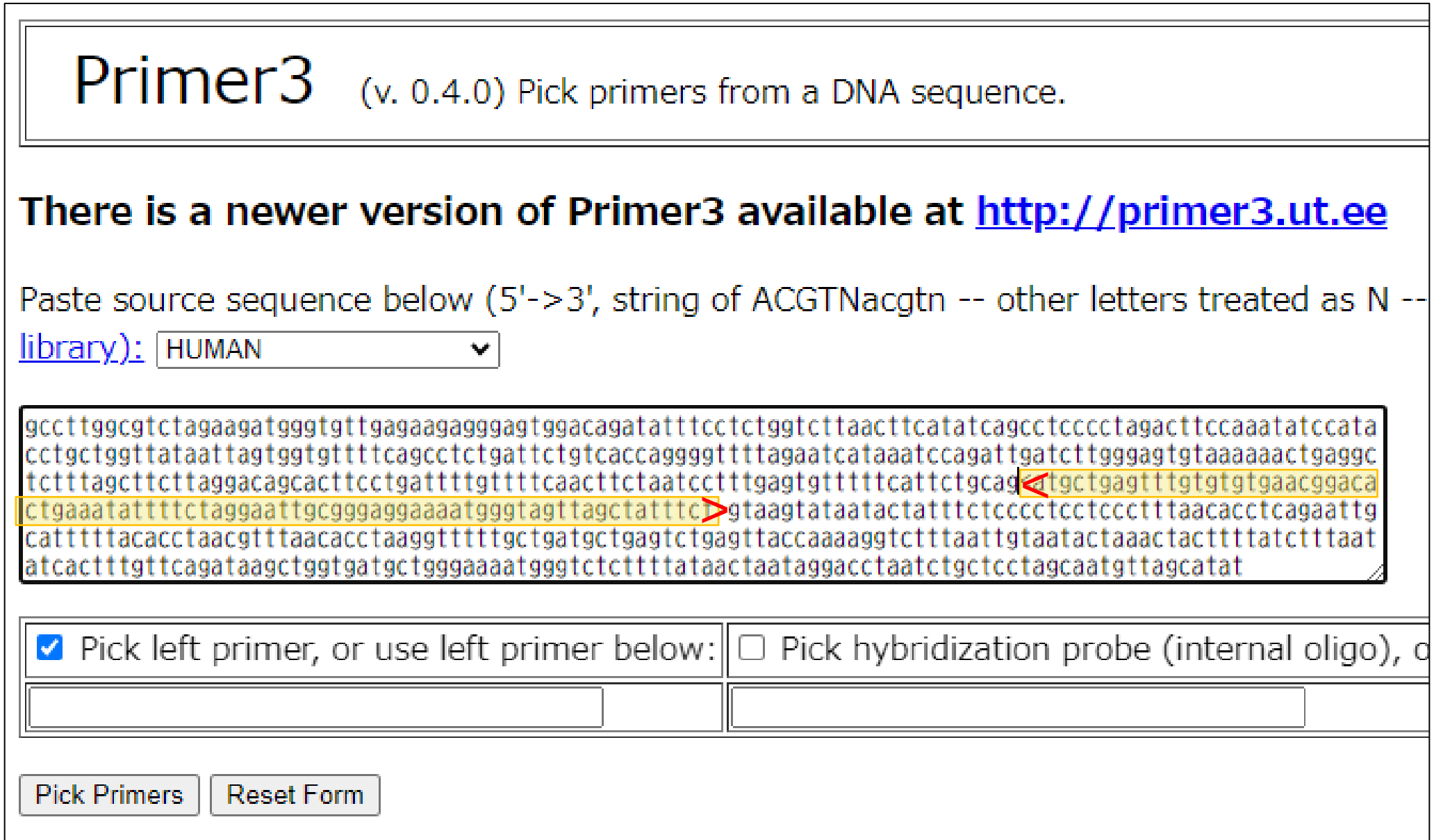
赤色： intronの配列

・Primer3ではプライマーを設定したくない領域を<>内に入力します。

・A plasmid Editor からexon17の配列全てコピーしてPrimer3の<>内に貼付けます。



・次にexon17の前後100～200bpのintronの配列をA plasmid Editor からコピーしてPrimer3に貼付けます。



Primer3 Output

```
Using mispriming library humrep_and_simple.txt
Using 1-based sequence positions
OLIGO            start  len      tm     gc%   any    3'     rep seq
LEFT PRIMER         14   22   60.11   50.00  2.00  0.00 12.00 gaagatgggtgttgagaagagg
RIGHT PRIMER       403   22   60.10   45.45  4.00  0.00 12.00 ttctgaggtgttaaagggagga
SEQUENCE SIZE: 600
INCLUDED REGION SIZE: 600

PRODUCT SIZE: 390  PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 0.00
EXCLUDED REGIONS (start, len)*: 280,78

     1 gccttggcgtctagaagatgggtgttgagaagagggagtggacagatatttcctctggtc
forwardプライマー >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
    61 ttaacttcatatcagcctcccctagacttccaaatatccatacctgctggttataattag

   121 tggtgttttcagcctctgattctgtcaccaggggttttagaatcataaatccagattgat

   181 cttgggagtgtaaaaaactgaggctctttagcttcttaggacagcacttcctgattttgt

   241 tttcaacttctaatcctttgagtgtttttcattctgcagatgctgagtttgtgtgtgaac
                                          XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
   301 ggacactgaaatattttctaggaattgcgggaggaaaatgggtagttagctatttctgta
       XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
   361 agtataatactatttctcccctcctcccttttaacacctcagaattgcatttttacaccta
                           <<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<< reverseプライマー
   421 acgtttaacacctaaggtttttgctgatgctgagtctgagttaccaaaaggtctttaatt

   481 gtaatactaaactacttttatctttaatatcactttgttcagataagctggtgatgctgg

   541 gaaaatgggtctcttttataactaataggacctaatctgctcctagcaatgttagcatat

KEYS (in order of precedence):
XXXXXX excluded region
>>>>>> left primer
<<<<<< right primer

ADDITIONAL OLIGOS
                  start  len      tm     gc%   any    3'     rep seq
 1 LEFT PRIMER       14   22   60.11   50.00  2.00  0.00 12.00 gaagatgggtgttgagaagagg
   RIGHT PRIMER     404   23   60.35   43.48  4.00  0.00 12.00 attctgaggtgttaaagggagga
   PRODUCT SIZE: 391, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 0.00

 2 LEFT PRIMER       14   22   60.11   50.00  2.00  0.00 12.00 gaagatgggtgttgagaagagg
   RIGHT PRIMER     405   24   61.48   41.67  4.00  0.00 12.00 aattctgaggtgttaaagggagga
   PRODUCT SIZE: 392, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 0.00

 3 LEFT PRIMER       14   22   60.11   50.00  2.00  0.00 12.00 gaagatgggtgttgagaagagg
   RIGHT PRIMER     406   25   63.77   44.00  4.00  0.00 12.00 caattctgaggtgttaaagggagga
   PRODUCT SIZE: 393, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 0.00

 4 LEFT PRIMER       14   22   60.11   50.00  2.00  0.00 12.00 gaagatgggtgttgagaagagg
```

・自動作成されたプライマー情報と配列

・自動で作成されたプライマーは>>>>>で示されます。

・先程＜＞で囲んだプライマー設定しない領域XXXXX で示されます。

・塩基配列の読み始めは綺麗に読めないので、当検査室ではプライマーの位置を目的の配列より60～100bp離して設定しています。

・今回はreverseプライマーがexon17に近過ぎるためパラメーターのプロダクトサイズ設定を390より大きくし、他の配列のプライマーが自動で作られよう再設定しました。

・プライマー作成されない場合はパラメーターの設定条件を緩めると作成される事が多くあります。

再設定後のプライマー

```
Using mispriming library humrep_and_simple.txt
Using 1-based sequence positions
OLIGO            start  len      tm      gc%    any     3'     rep seq
LEFT PRIMER         80   25   60.31    44.00   4.00   0.00  10.00 ccctagacttccaaatatccatacc
RIGHT PRIMER       541   20   60.62    55.00   4.00   1.00  10.00 cccagcatcaccagcttatc
SEQUENCE SIZE: 600
INCLUDED REGION SIZE: 600

PRODUCT SIZE: 462, PAIR ANY COMPL: 3.00, PAIR 3' COMPL: 0.00
EXCLUDED REGIONS (start, len)*: 280,78

    1 gccttggcgtctagaagatgggtgttgagaagagggagtggacagatatttcctctggtc


   61 ttaacttcatatcagcctcccctagacttccaaatatccatacctgctggttataattag
                        >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
      forwardプライマー
  121 tggtgttttcagcctctgattctgtcaccaggggttttagaatcataaatccagattgat


  181 cttgggagtgtaaaaaactgaggctctttagcttcttaggacagcacttcctgattttgt


  241 tttcaacttctaatcctttgagtgtttttcattctgcagatgctgagtttgtgtgtgaac
                                                 XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

  301 ggacactgaaatattttctaggaattgcgggaggaaaatgggtagttagctatttctgta
      XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

  361 agtataatactatttctcccctcctccctttaacacctcagaattgcatttttacaccta


  421 acgtttaacacctaaggtttttgctgatgctgagtctgagttaccaaaaggtctttaatt


  481 gtaatactaaactacttttatctttaatatcactttgttcagataagctggtgatgctgg
                                                 <<<<<<<<<<<<<<<<<< reverseプライマー

  541 gaaaatgggtctcttttataactaataggacctaatctgctcctagcaatgttagcatat
      <
```

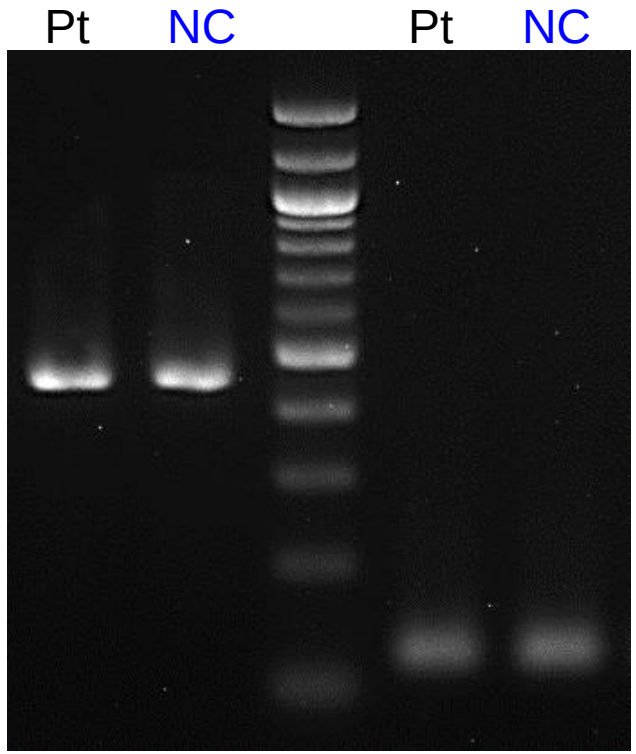
プライマー配列に問題がないか確認し注文します。

このプライマーを使ってPCRを行います。

電気泳動での確認

・増幅後、PCR産物の電気泳動を行い目的の長さの増幅産物が得られたか、非特異的反応はなかったかを確認する。

・当院では新しく作ったプライマーでPCRを行う際に、MasterMIXや検体の抽出不良等があってプライマーが働かないのかを確認するためにGAPDHも同時に増幅しています。



電気泳動での確認

- 非特異的反応があった場合にはPCRのグラジエント機能を使ってアニーリングの至適温度を検討する
- 非特異的反応を抑えるためにDMSOを使用する
- ゲルカットをして目的の増幅産物だけを回収する

・領域を少しずらしてプライマーを新たに設定する
・Forward・Reverseプライマーの組み合わせを変える

PCR産物の精製から測定まで

PCR産物の精製

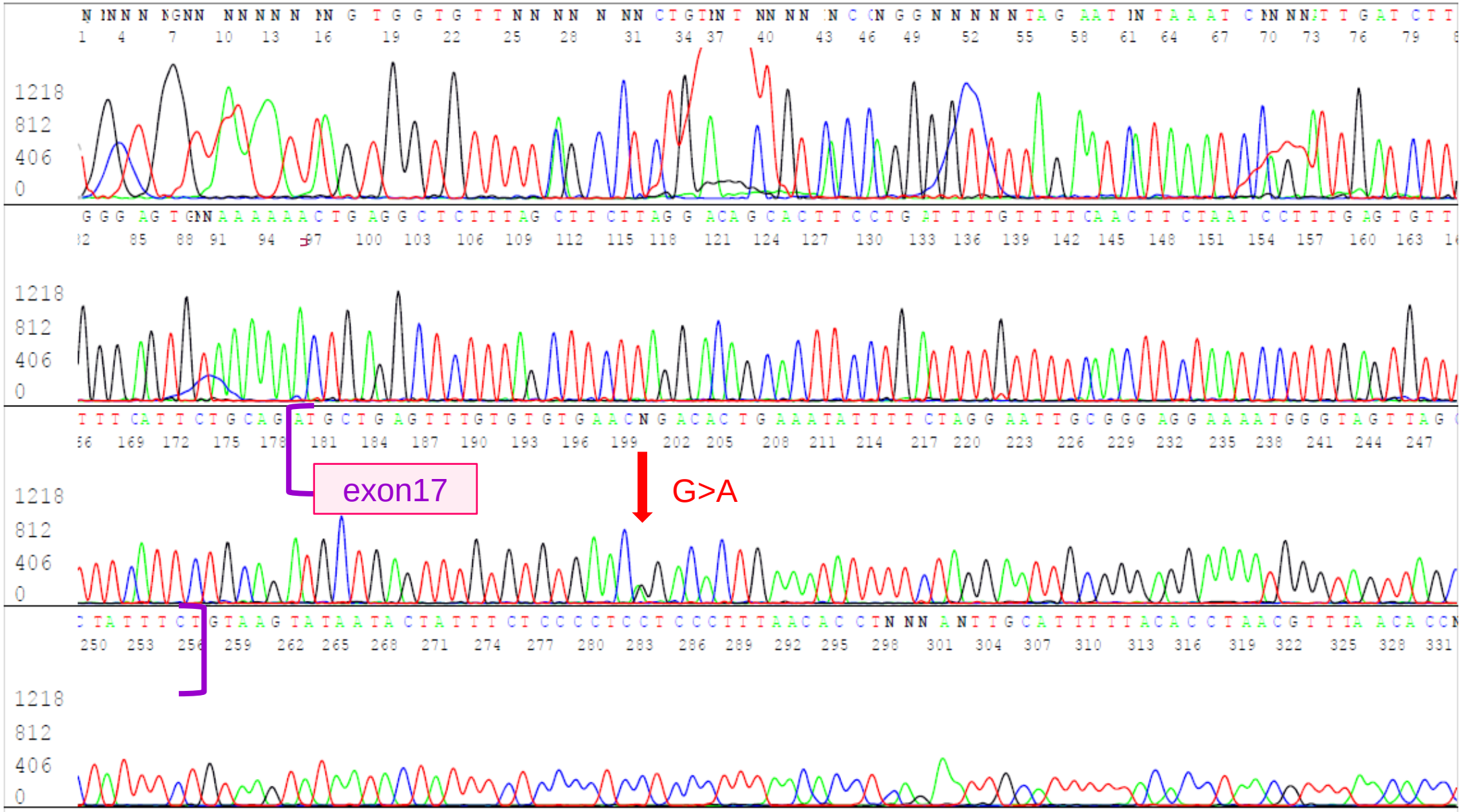
シーケンス反応

シーケンス反応産物の精製
（エタノール沈殿）

キャピラリー電気泳動

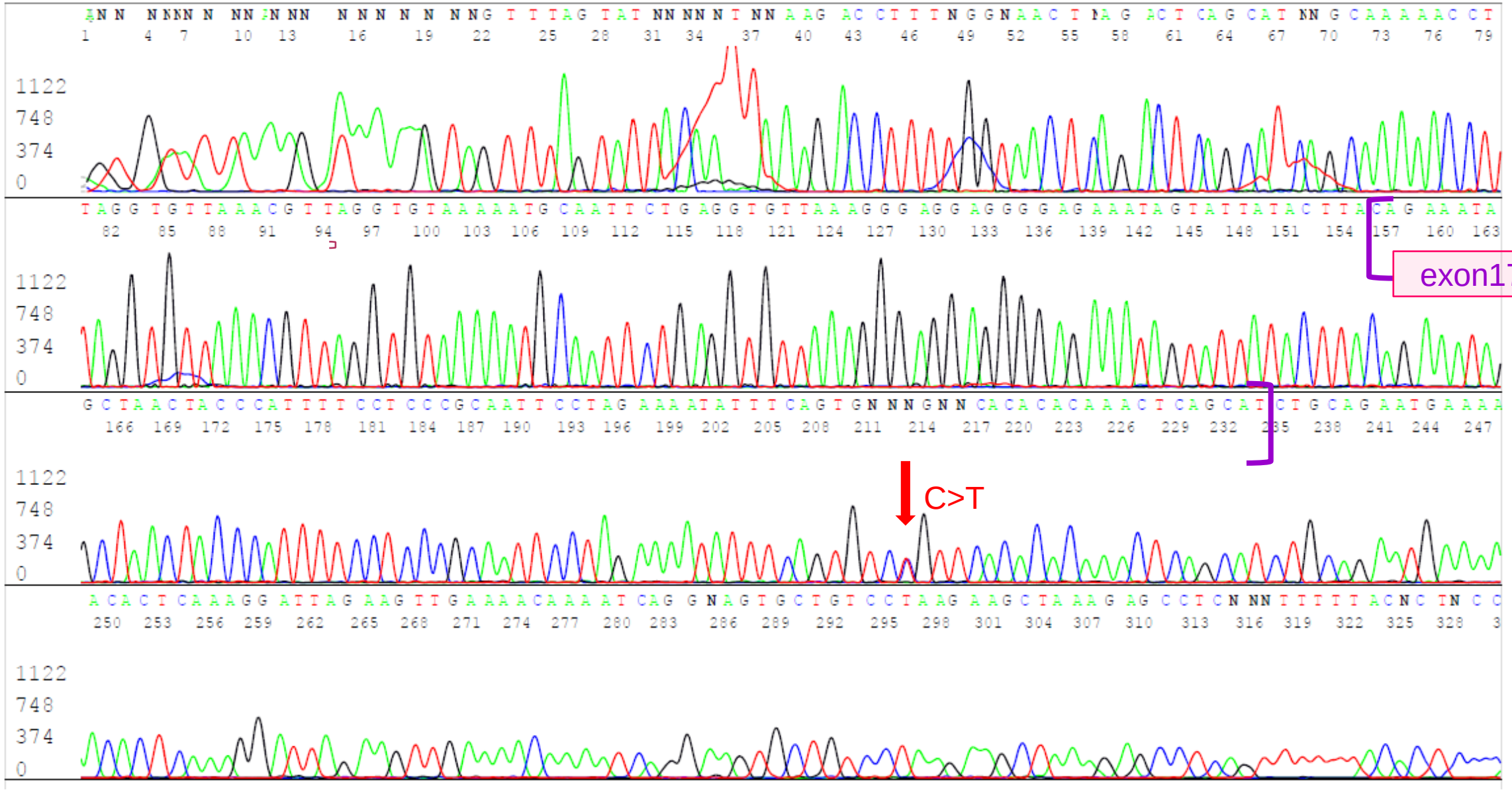
結果の解析

forwardプライマーを使用した結果



結果の解析

reverseプライマーを使用した結果



参考資料

- 「遺伝子診療よくわかるガイドマップ」や「医療に役立つ遺伝子関連Web情報検索」
- メーカーHPに公開されているハンドブック
- 過去の臨床遺伝情報検索講習会資料

https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/global/forms/sanger-sequencing-guide-download.html

著者：中村　智祥
出版社：メディカル・サイエンス・インターナショナル

最後に

・今日ご紹介した方法は、当初プライマーを設計したことがなかった私たちが試行錯誤しながら行っている方法です。

・皆さんも是非チャレンジして、より良い方法を見つけて頂きたいと思います。

ご清聴ありがとうございました