

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

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カ月の検査数はで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

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
- ◆ バリエント位置
- ◆ 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のバリエ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エーション情報を整理し、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配列のバリエーション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配列のバリエーション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エーションを確認するため	p. (protein)	Clin var TransVar	p.Arg1699Gln 再確認!

ゲノム位置の検索

- ・バリエーション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。

THE UNIVERSITY OF TEXAS
MD Anderson
Cancer Center

FACULTY RESEARCH **PUBLIC SOFTWARE** PUBLIC DATASETS PROGRAM SUPPORT

Department of Bioinformatics and Computational Biology

Home > Public Software > TransVar

TransVar

TransVar is a multi-way annotator for genetic elements and genetic variations.

It operates on genomic coordinates (e.g., chr3:g.178936091G>A) and transcript-dependent cDNA as well as protein coordinates (e.g., PIK3CA:p.E545K or PIK3CA:c.1633G>A, or NM_006218.2:p.E545K, or NP_006266.2:p.G240Afs*50), and was designed to resolve ambiguous mutation annotations arising from differential transcript usage.

TransVar supports

- HGVS nomenclature
- both left-alignment and right-alignment convention in reporting indels.
- annotation of a region based on a transcript dependent characterization
- single nucleotide variation (SNV), insertions and deletions (indels) and block substitutions
- mutations at both coding region and intronic/UTR regions
- transcript annotation from commonly-used databases such as Ensembl, NCBI RefSeq and GENCODE etc
- UniProt protein id as transcript id
- GRCh36, 37, 38
- forward annotation.

Please visit the web interface [web interface](#) and [online user's guide](#).

TransVar

Overview

Description TransVar is a multi-way annotator for genetic elements and genetic variations.

Development Information

GitHub [zwdzwd/transvar](#)

URL <https://bioinformatics.mdanderson.org/transvar/>

Language Python

Current version 2.4.0

License [The MIT License](#)

Status Active

Last updated September 7, 2018

References

Citation Zhou, W., Chen, T., Chong, Z., et al., *TransVar: a multilevel variant annotator for precision genomics*, Nature Methods **12** p1002 (2015).

バリエント情報:BRCA1 c.5096G>A p.Arg1699G>A

TransVar

Annotate Abo

Select a task:

HGVS.cのバリエントから検索します。

Reverse Annotation: Protein Reverse Annotation: cDNA Forward Annotation: gDNA Codon Search: Protein

Select a reference genome:

GRCh38/hg38 GRCh37/hg19 GRCh36/hg18

検索及び変換したい参照配列を選択します。

Select one or more annotation databases:

Ensembl CCDS RefSeq GENCODE UCSC AceView

バリエントの情報をどのデータベースの結果として得るのかを選択します。Accession IDを入手するため、(NCBI)RefSeqを選択します。

Upload and/or Enter Identifiers:

Upload a **plain text** file of identifiers, one identifier per line, case sensitive

ファイルを選択 選択されていません

Reset

Enter up to 100 identifiers, one identifier per line, case sensitive

BRCA1:c.5096G>A

検索したいバリエントの情報を入力します。

BRCA1:c.5096G>A

Submit

TransVar Results

Search:

Copy

CSV

TSV

input	transcript	gene	strand	coordinates(gDNA/cDNA/protein)	region	info
-------	------------	------	--------	--------------------------------	--------	------

BRCA1:c.5096G>A	NM_007294 (protein_coding)	BRCA1	-	chr17:g.43063930C>T/c.5096G>A/p.R1699Q	inside_[cds_in_exon_17]	CSQN=Missense;reference_codon=CGG;alternative_codon=CAG;dbxref=GeneID:6
-----------------	----------------------------	-------	---	--	-------------------------	---

coordinatesにgDNA、cDNA、proteinが表記されます。

持っているバリエント情報と比較、確認を行います。

New Search

Previous 1 Next

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配列のバリエーション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配列のバリエーション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エーションを確認するため	p. (protein)	Clin var TransVar	p.Arg1699Gln 再確認!

ゲノムDNA配列の検索

NCBIでGene「BRCA1」を検索する

The screenshot displays the NCBI homepage with a search bar at the top. The search bar contains the text 'Gene' in a dropdown menu and 'BRCA1' in the input field. A red box highlights the search bar, and a red arrow points from the text above to the search bar. The page features a navigation menu on the left, a central 'Welcome to NCBI' section with various service tiles (Submit, Download, Learn, Develop, Analyze, Research), and a right sidebar with 'Popular Resources' and 'NCBI News & Blog'.

NIH National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

Log in

Gene BRCA1 Search

NCBI Home
Resource List (A-Z)
All Resources
Chemicals & Bioassays
Data & Software
DNA & RNA
Domains & Structures
Genes & Expression
Genetics & Medicine
Genomes & Maps
Homology
Literature
Proteins
Sequence Analysis
Taxonomy
Training & Tutorials
Variation

Welcome to NCBI
The National Center for Biotechnology Information advances science and health by providing access to biomedical and genomic information.
[About the NCBI](#) | [Mission](#) | [Organization](#) | [NCBI News & Blog](#)

Submit
Deposit data or manuscripts into NCBI databases

Download
Transfer NCBI data to your computer

Learn
Find help documents, attend a class or watch a tutorial

Develop
Use NCBI APIs and code libraries to build applications

Analyze
Identify an NCBI tool for your data analysis task

Research
Explore NCBI research and collaborative projects

Popular Resources
PubMed
Bookshelf
PubMed Central
BLAST
Nucleotide
Genome
SNP
Gene
Protein
PubChem

NCBI News & Blog
NCBI's Read Assembly and Annotation Pipeline Tool (RAPT) to Retire December 2024
16 Sep 2024
As of December 2024, NCBI's pilot tool
Changes to SRA Data Access on Amazon Web Services (AWS)
11 Sep 2024
Cost-effective alternatives for accessing

「Homo sapiens (human)」を選択する

Gene [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
- Current
- [Clear all](#)
- [Show additional filters](#)

Tabular ▾ 20 per page ▾ Sort by Relevance ▾ Send to ▾

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 of 1563 Next > Last >>

[See also 689 discontinued or replaced items.](#)

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

Search details

[See more...](#)

Recent activity

- [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](#)

Gene Advanced

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

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:ENSG0000012048](#) [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](#)
 [Try the new Gene table](#)
 [Try the new Transcript table](#)

Genomic context

Location: 17q21.31
Exon count: 31

Annotation release	Status	Assembly	Chr	Location

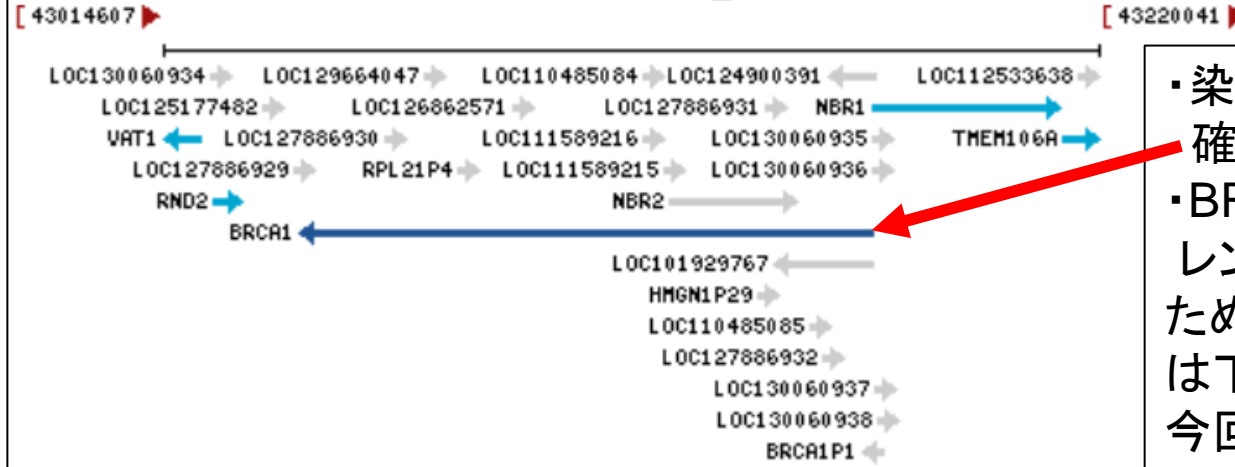
Table of contents

- Summary
- Genomic context
- Genomic regions, transcripts, and products
- Expression
- Bibliography
- Phenotypes
- Variation
- HIV-1 interactions
- Pathways from PubChem
- Interactions
- General gene information
 - Markers, Related pseudogene(s), Potential readthrough, Homology, Gene Ontology
- General protein information
- NCBI Reference Sequences (RefSeq)
- Related sequences
- Additional links
 - Locus-specific Databases

Genome Browsers

- Variation Viewer (GRCh37.p13)
- Variation Viewer (GRCh38)
- Ensembl
- UCSC

Chromosome 17 - NC_000017.11



・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Gで一致する。

- ・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エーション位置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。

Genomic regions, transcripts, and products

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

Go to reference sequence details

Go to nucleotide: Graphics FASTA GenBank

Find: 43063930

43,063,968 | 43,063,958 | 43,063,948 | 43063930 | 43,063,920 | 43,063,910 | 43,063,900

A A A G T A A G A C G T C T A C G A C T C A A A C A C A C A C T T G C C T G T G A C T T T A T A A A A G A T C C T T A A C G C C C T C C T T T C A T T C T G C A G A T G C T G A G T T T G T G T G T G A A C G G A C A C T G A A A T A T T T T C T A G G A A T T G C G G G A G G A A A

Genes, MANE Project (release v1.3)

NCBI RefSeq Annotation GCF_000001405.40-RS_2024_08

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配列のバリエーション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配列のバリエーション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エーションを確認するため	p. (protein)	Clin var TransVar	p.Arg1699Gln 再確認!

バリエーション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エーションが表示されているので、目的のバリエーション(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を押すとdb SNPを開くことができる。

Genomic browser showing a list of SNPs. The following table represents the data visible in the browser's SNP list:

Allele 1	rs ID	Allele 2
A/C/G	rs80358059	CACACACA/CACA/CA...
A/C/G/T	rs397509221	CAGCA/CA
CAGC/GCAGATCAA/...	rs397509224	
GCAT/-	rs397509223	
T/A/C/G	rs80358066	AAA/A/AAA
C/A/G/T	rs397509220	C/A/G/T
T/A/C/G	rs397509222	A/C/G/T
A/C/G/T	rs80358059	CACACACA/CACA/CA...
CAGCA/CA	rs80358345	
GCAT/-	rs397509223	
AAA/A/AAA	rs80357760	
C/A/G/T	rs80358066	AAA/A/AAA
C/A/G/T	rs80358096	A/C/G/T
A/C/G/T	rs80358993	
T/A/C/G	rs397509222	A/C/G/T
A/C/G/T	rs80357125	
A/C/G/T	rs80357387	
C/A/G/T	rs1800747	CACACACA/CACA/CA...
CAGCA/CA	rs80358345	
GCAT/-	rs397509223	
AAA/A/AAA	rs80357760	
C/A/G/T	rs397507241	T/A/C/G
T/A/C/G	rs397509226	
A/C/G/T	rs80357760	AAA/A/AAA
A/C/G/T	rs80358096	A/C/G/T
A/C/G/T	rs80358993	
T/A/C/G	rs397509222	A/C/G/T
A/C/G/T	rs80357125	
A/C/G/T	rs80357387	
C/A/G/T	rs41293459	TTT/TT
TTT/TT	rs80357553	
C/A/G/T	rs80356860	
TTT/TT	rs80357553	
C/A/G/T	rs886040864	
TTT/TT	rs80356860	
C/A/G/T	rs78620426	
C/A/G/T	rs886038197	
G/A/C/T	rs28897696	
C/A/G/T	rs1800747	CACACACA/CACA/CA...
ACACAAAC/AC	rs2051931458	
CAGCA/CA	rs80358345	
CAGC/GCAGATCAA/...	rs397509224	
GCAT/-	rs397509223	
C/A/G/T	rs41293459	TTT/TT
TTT/TT	rs80357553	
C/A/G/T	rs886040864	
CCC/CC	rs80357874	
CAGCA/CA	rs80358345	
GCAT/-	rs397509223	
G/A/C/T	rs91855398	AAA/A/AAA
AAA/A/AAA	rs397509228	
CCC/CC	rs80357874	
CAGCA/CA	rs80358345	
GCAT/-	rs397509223	
G/A/C/T	rs55770810	C/A/G/T
C/A/G/T	rs1060504591	A/C/G/T
A/C/G/T	rs1555578598	T/A/C/G
T/A/C/G	rs1597820147	TTTT/TT/TTTT
C/A/G/T	rs2051929740	T/A/C/G
T/A/C/G	rs45519437	A/C/G/T
A/C/G/T	rs80356974	C/A/G/T
C/A/G/T	rs80356860	C/A/G/T
C/A/G/T	rs886038197	
T/-	rs886040913	AAA/A/AAA
AAA/A/AAA	rs80357760	
C/A/G/T	rs2051927969	T/A/C/G
T/A/C/G	rs2051924695	G/A/C/T
G/A/C/T	rs80356858	A/C/G/T
A/C/G/T	rs2051918751	CC/C
G/A/C/T	rs2051927197	A/C/G/T
A/C/G/T	rs863224763	T/A/C/G
T/A/C/G	rs772885662	C/A/G/T
C/A/G/T	rs1057520432	T/
T/-	rs483353099	T/A/C/G
T/A/C/G	rs1060504574	A/C/G/T
A/C/G/T	rs397507242	
G/-	rs886038040	T/A/C

目的のバリエーション情報 (BRCA1 GRCh38 g.43063930C>T) と一致しているか確認し、ClinVarを開く

dbSNP Short Genetic Variations

Examples: rs268, BRCA1 and more Search
[Advanced search](#)

rs41293459

Current Build 156
Released September 21, 2022

Organism *Homo sapiens*

Position chr17:43063930 (GRCh38.p14) ?

Alleles C>A / C>G / C>T

Variation Type SNV Single Nucleotide Variation

Frequency T=0.000023 (6/264690, TOPMED)
T=0.000024 (6/251262, GnomAD_exome)
T=0.000014 (2/140080, GnomAD) (+ 4 more)

Clinical Significance Reported in ClinVar

Gene : Consequence BRCA1 : Missense Variant

Publications 14 citations
LitVar² 149

Genomic View See rs on genome

- Frequency
- Variant Details
- Clinical Significance
- HGVS
- Submissions
- History
- P

ALFA Allele Frequency

The ALFA project provide aggregate allele frequency from dbGaP. More information is available on the project [page](#) including details on use.

Release Version: 20230706150541

手元にあるバリエーション情報が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。

目的のバリエーション(BRCA1 c.5096G>A p.Arg1699Gln)を選択し開く

ClinVar

[Create alert](#) [Advanced](#)

[Home](#) [About](#) [Access](#) [Help](#) [Submit](#) [Statistics](#) [FTP](#)

i 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)

[Display options](#) [Sort by Location](#) [Download](#)

Items: 3

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

Search results

Variation	Gene (Protein Change)	Type (Consequence)	Condition	Classification, Review status
<input type="checkbox"/> 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 ★★
<input type="checkbox"/> 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 ★
<input type="checkbox"/> 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 ★★★

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

[Display options](#) [Sort by Location](#) [Download](#)

Items: 3

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



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
<u>NM_007294.4:c.5096G>A</u> 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、バリエーション位置やアミノ酸変異の情報を再確認することができた。

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配列のバリエーション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配列のバリエーション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エーションを確認するため	p. (protein)	Clin var TransVar	p.Arg1699Gln

mRNAの配列上でバリエーションを確認するため、 NCBIで先ほど調べたリファレンスのNM番号を検索する

The screenshot shows the NCBI homepage with a search bar containing the accession number NM_007294.4. The search bar is highlighted with a red box. The page layout includes a navigation menu on the left, a central 'Welcome to NCBI' section with various service tiles (Submit, Download, Learn, Develop, Analyze, Research), and a 'Popular Resources' list on the right. The search bar is located at the top of the page, below the NCBI logo and 'National Library of Medicine' text. The search bar has a dropdown menu set to 'All Databases' and a 'Search' button to its right. The search results are not visible, only the search input field.

NIH National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

All Databases Search

NCBI Home
Resource List (A-Z)
All Resources
Chemicals & Bioassays
Data & Software
DNA & RNA
Domains & Structures
Genes & Expression
Genetics & Medicine
Genomes & Maps
Homology
Literature
Proteins
Sequence Analysis
Taxonomy
Training & Tutorials
Variation

Welcome to NCBI
The National Center for Biotechnology Information advances science and health by providing access to biomedical and genomic information.
[About the NCBI](#) | [Mission](#) | [Organization](#) | [NCBI News & Blog](#)

Submit
Deposit data or manuscripts into NCBI databases

Download
Transfer NCBI data to your computer

Learn
Find help documents, attend a class or watch a tutorial

Develop
Use NCBI APIs and code libraries to build applications

Analyze
Identify an NCBI tool for your data analysis task

Research
Explore NCBI research and collaborative projects

Popular Resources
PubMed
Bookshelf
PubMed Central
BLAST
Nucleotide
Genome
SNP
Gene
Protein
PubChem

NCBI News & Blog
Changes to SRA Data Access on Amazon Web Services (AWS) 11 Sep 2024
Cost-effective alternatives for accessing SRA data - Important note! The strange
Coming Soon! Improving Representation of Functional Data in ClinVar 10 Sep 2024
NCBI is improving the way that functional data are submitted to ClinVar and how
Submitting High-Throughput Sequence Data to Gene Expression Omnibus (GEO) 04 Sep 2024
Submit your transcriptomic and
[More...](#)

FOLLOW NCBI

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

Nucleotide

Nucleotide

Advanced

Search

Help

GenBank

Send to:

Change region shown

Customize view

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., Hujeriat, Y., Mohammed, S., Hodgson, S., Kelsell, D. P., Spurr, N. K., Bishop, D. T. and

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エーションのある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番目の塩基までであることを示す。

```
exon 1..94
/gene="BRCA1"
/gene_synonym="BRCA1; BRCC1; BROVCA1; FANCS; IRIS; PNCA4; PPP1R53; PSCP; RNF53"
/inference="alignment:Splign:2.1.0"

misc_feature 90..92
/gene="BRCA1"
/gene_synonym="BRCA1; BRCC1; BROVCA1; FANCS; IRIS; PNCA4; PPP1R53; PSCP; RNF53"
/note="upstream in-frame stop codon"

exon 95..193
/gene="BRCA1"
/gene_synonym="BRCA1; BRCC1; BROVCA1; FANCS; IRIS; PNCA4; PPP1R53; PSCP; RNF53"
/inference="alignment:Splign:2.1.0"

CDS 114..5705
/gene="BRCA1"
/gene_synonym="BRCA1; BRCC1; BROVCA1; FANCS; IRIS; PNCA4;
```

```
ORIGIN
1 gctgagactt cctggacggg ggacaggctg tggggtttct cagataactg ggccccctgcg
61 ctcaggaggc cttcacccct tgctctgggt aaagttcatt ggaacagaaa gaaatggatt
121 tatctgctct tcgcttgaa gaagtacaaa atgtcattaa tgctatgcag aaaatcttag
181 agtgtcccat ctgtctggag ttgatcaagg aacctgtctc cacaaagtgt gaccacatat
241 tttgcaaatt ttgatgctg aaacttctca accagaagaa agggccttca cagtgtcctt
301 tatgtaagaa tgatataacc aaaaggagcc tacaagaaag tacagagatt agtcaacttg
361 ttgaagagct attgaaaatc atttgtgctt ttcagcttga cacaggtttg gagtatgcaa
421 acagctataa ttttgcaaaa aaggaaaata actctcctga acatctaaaa gatgaagttt
481 ctatcatcca aagtatggc tacagaaacc gtgccaaaag acttctacag agtgaaccg
541 aaaatccttc cttgcaggaa accagctca gtgtccaact ctctaacctt ggaactgtga
601 gaactctgag gacaaagcag cggatacaac ctcaaagac gtctgtctac attgaattgg
661 gatctgattc ttctgaagat accgttaata aggcaactta ttgagtggtg ggagatcaag
721 aattgttaca aatcacccct caaggaacca gggatgaaat cagtttggat tctgcaaaaa
781 aggctgcttg tgaattttct gagacggatg taacaaatac tgaacatcat caaccagta
841 ataatgattt gaacaccact gagaagcgtg cagctgagag gcatccagaa aagtatcagg
901 gtagtctgtt tcaaaacttg catgtggagc catgtggcac aaatactcat gccagctcat
961 tacagcatga gaacagcagt ttattactca ctaaagacag aatgaatgta gaaaaggctg
1021 aattctgtaa taaaagcaaa cagcctgctt tagcaaggag ccaacataac agatgggctg
```

exon Feature 1 of 23 NM_007294 : 1 segment

バリエント(c.5096G>A)位置の探し方

・コーディング領域の開始点+バリエントの位置-1(塩基)=実際のバリエント位置

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でのバリエント位置 $\div 3$ =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

・ $5096 \div 3 = 1698.6666\dots$

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。

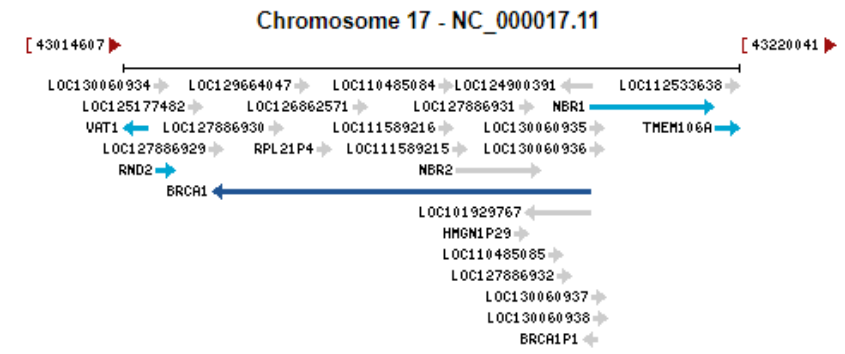
茶色の配列
= exon17

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


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 tgttggtatg aaaacagatg ctgagtttgt gtgtgaacgg aactgaaat
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](#)

NC_000017.11 | Find: | Tools | Tracks | Download | ?

43,063,960 | 43,063,950 | 43,063,940 | **43063930** | 43,063,920 | 43,063,910 | 43,063,900

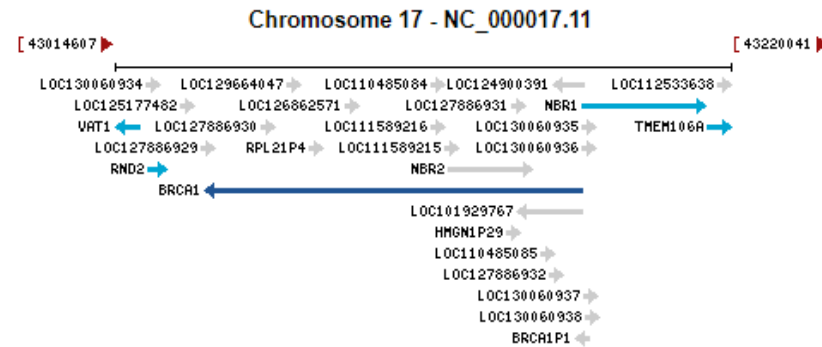
A A A G T A A G A C G T C T A C G A C T C A A A C A C A C A C T T G C C T G T G A C T T T A T A A A A G A T C C C T T A A C G C C C T C C T T
 T T T C A T T C T G C A G A T G C T G A G T T T G T G T G T G A A C G G A C A C T G A A A T A T T T T C T A G G A A T T G C G G G A G G A A A

Genes, MANE Project (release v1.3)

NCBI RefSeq Annotation GCF_000001405.40-RS_2024_08

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。



Genomic regions, transcripts, and products

Go to [reference sequence details](#)

Genomic Sequence:

Go to nucleotide: [Graphics](#) [FASTA](#) [GenBank](#)



Nucleotide Advanced

Help

GenBank

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., Lehoczy, 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](#)

Send to:

Complete Record
 Coding Sequences
 Gene Features

Choose Destination
 File Clipboard
 Collections Analysis Tool

Download 1 item.
 Format

 Show GI

Change region shown

Sequence (abbreviated view)
 Position
 to:

View
 view
 es
 S
 A, and CDS features only
 ons
 s
 Show gap features

Analyze this sequence

Run BLAST

 Pick Primers

 Highlight Sequence Features

 Find in this Sequence

 Related information

Assembly

 BioProject

 Protein

 PubMed

Nucleotide

Nucleotide

Advanced

Search

Help

GenBank

Send to

Showing 1.00kb region from base 43063430 to 43064430.

Homo sapiens chromosome 17, GRCh38.p14 Primary Assembly

NCBI Reference Sequence: NC_000017.11

[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to:

LOCUS NC_000017 1001 bp DNA linear CON 26-AUG-2024
DEFINITION Homo sapiens chromosome 17, GRCh38.p14 Primary Assembly.
ACCESSION [NC_000017](#) REGION: complement(43063430..43064430)
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 1001)

Change region shown

- Whole sequence (abbreviated view)
 Selected region

from: 43063430 to: 43064430

Update View

Customize view

- Abbreviated view
 Customize

Basic Features

- All features
 Gene, RNA, and CDS features only

Display options

- Show reverse complement
 Show gap features

Update View

BRCA1遺伝子は大きいので、ダウンロードデータも多いので、バリエーション位置から前後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。

Primer3 (v. 0.4.0) Pick primers from a DNA sequence.	Checks for mispriming in template.	disclaimer	Primer3 Home
	Primer3plus interface	cautions	FAQ/WIKI

There is a newer version of Primer3 available at <http://primer3.ut.ee>

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 \(repeat library\)](#):

<input checked="" type="checkbox"/> Pick left primer, or use left primer below:	<input type="checkbox"/> Pick hybridization probe (internal oligo), or use oligo below:	<input checked="" type="checkbox"/> Pick right primer, or use right primer below (5' to 3' on opposite strand):
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

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:
 Number To Return: Max 3' Stability:
 Max Repeat Mispriming: Pair Max Repeat Mispriming:
 Max Template Mispriming: Pair Max Template Mispriming:

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 \(repository\)](#):

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):

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
Number To Return **Max 3' Stability**
Max Repeat Mispriming **Pair Max Repeat Mispriming**
Max Template Mispriming **Pair Max Template Mispriming**

General Primer Picking Conditions

Primer Size Min: Opt: Max:
Primer Tm Min: Opt: Max: **Max Tm Difference:** **Table of thermodynamic parameters:**
Product Tm Min: Opt: Max:
Primer GC% Min: Opt: Max:
Max Self Complementarity: **Max 3' Self Complementarity:**
Max #N's: **Max Poly-X:**
Inside Target Penalty: **Outside Target Penalty:** Note: you can set Inside Target Penalty to allow primers inside a target.
First Base Index: **CG Clamp:**
Concentration of monovalent cations: **Salt correction formula:**
Concentration of divalent cations **Concentration of dNTPs**

・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: Gt:
[Size](#) Lt: Gt:
[GC%](#) Lt: Gt:

[Self Complementarity](#)
[3' Self Complementarity](#)
[#N's](#)
[Mispriming](#)
[Sequence Quality](#)
[End Sequence Quality](#)
[Position Penalty](#)
[End Stability](#)
[Template Mispriming](#)


Objective Function Penalty Weights for Primer *Pairs*


[Product Size](#) Lt: Gt:
[Product Tm](#) Lt: Gt:
[Tm Difference](#)
[Any Complementarity](#)
[3' Complementarity](#)
[Pair Mispriming](#)
[Primer Penalty Weight](#)
[Hyb Oligo Penalty Weight](#)
[Primer Pair Template Mispriming Weight](#)

- ・プライマーを設定する場所は、バリエーションのみを増幅するように作るのではなく、バリエーションのある **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。



ApE
A plasmid Editor
by M. Wayne Davis

 [Download](#)
OSX 10.11+ (M1 Universal)

 [Download](#)

Click the icons above to download the latest ApE (v3.1.6, July 10, 2024)
A [list](#) of updates and bug fixes.
[Slides](#) from a series of presentations describing some of the features of ApE

I've started a [YouTube channel](#) with tutorial videos.


ApE is now [Published](#).

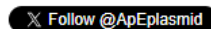
I've made a new [Default Features](#) and [Fluorescent Proteins Features](#) libraries.

Download demo [theme files](#) for circular graphic maps.

Click [here](#) to download the latest ApE for Linux.

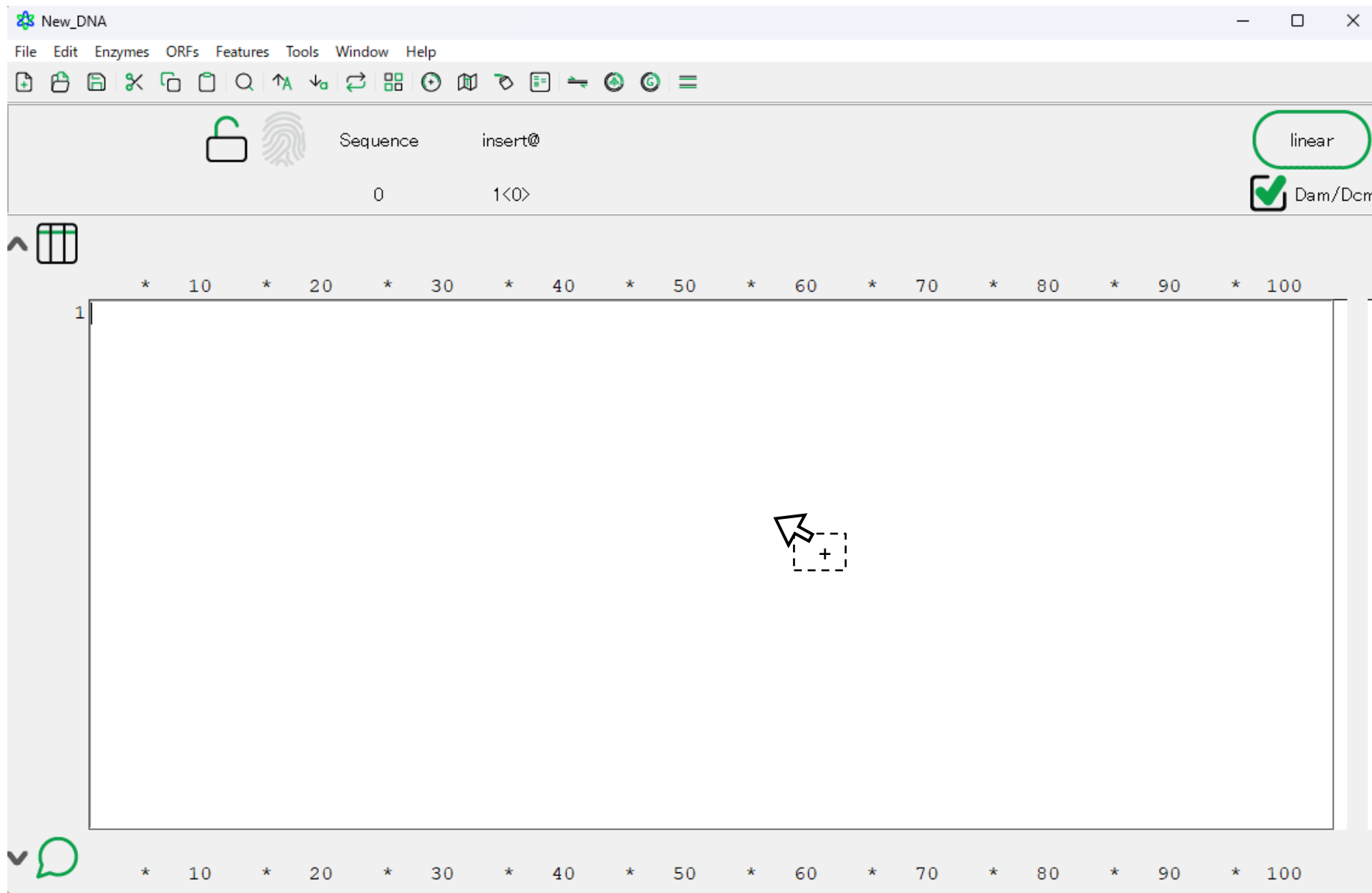
Some Windows systems will need to temporarily [disable Windows Defender](#) to install.

Click here  to make a voluntary donation in support of ApE.



<https://jorgensen.biology.uta.h.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	Direction	Type	Location
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 ttaggactccccaggtagacattctaggggtgaaaatttgtcattacattgacatttcagatttaggtttcaacaatactgttttcttctttcacatat
101 tgccatctagtaatatagatgttctccgtccacattaatcaaaactattgacatggataattcctaattccttgaacactataatggagatctatagcta
201 gccttggcgtctagaagatgggtgttgagaagaggagtgacagatatttctctggcttaacttcatatcagcctcccctagacttccaaatatcca
301 tacctgctggttataaattagtggtgtttcagcctctgattctgtcaccaggggttttagaatcataaatccagattgatcttgggagtgtaaaaaactg
401 aggctcttagcttcttaggacagcacttctgattttgttttcaacttctaactcttgagtggttttcattctgcagatgctgagtttggtggtggaac
501 ggacactgaaatatttctaggaattgctggggaggaaaatgggtagtttagctatttctgtaagtataatactatttctcccctcctcctttaacacctca
601 gaattgcatttttacacctaacgtttaacacctaaagggttttgctgatgctgagctgagttaccaaaaggctttaaattgtaataactaaactacttta
701 tctttaatatcactttgttcagataagctgggtgatgctgggaaaatgggtctcttttataactaataggacctaatctgctcctagcaatgtagcatat
801 gagctagggatttatttaaatagtcggcaggaatccatgtgcagcaggcaaaacttataatgtttaaatataacatcaactctgtctccagaaggaaactgc
901 tgctacaagccttattaaaggctgtggcttagaggggaaggacctctcctctgtcattcttctctgtgctcttttgtaatcgctgacctctctatctcc
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。

Primer3 (v. 0.4.0) Pick primers from a DNA sequence.

There is a newer version of Primer3 available at <http://primer3.ut.ee>

Paste source sequence below (5'→3', string of ACGTNacgtn -- other letters treated as N -- numbers and blanks ignored).
library):

<atgctgagtttgtgtggaacggacactgaaatattttctaggaattgcgggagggaaaaatgggtagttagctatttct>

↑
exon17の配列

Pick left primer, or use left primer below:

Pick hybridization probe (internal oligo), or use oligo below:

Pick right

Pick Primers

Reset Form

- ・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 (v. 0.4.0) Pick primers from a DNA sequence.

There is a newer version of Primer3 available at <http://primer3.ut.ee>

Paste source sequence below (5'->3', string of ACGTNacgtn -- other letters treated as N -- library):

```
gccttggcgtctagaagatgggtggtgagaagagggagtgacagatatttcttctggcttacttcataatcagcctcccctagacttccaaatatccata  
cctgctggttataattagtggtggtttcagcctctgattctgtcaccaggggttttagaatcataatccagattgatcttgggagtgtaaaaaactgaggc  
tcttagcttcttaggacagcacttctgattttggtttcaacttctaactcttgagtggtttcattctgcag<tgctgagtttggtggaacggaca  
ctgaaatatttctaggaattgcgggaggaataatgggtagttagctatttc>gtaagtataatactatttctccccctcctcctttaacacctcagaattg  
cattttacacctaacgtttaaaccctaagggttttgcctgagctgagctgagttaccaaaaggctttaattgtaataactaaactacttttatctttaat  
atcactttggtcagataagctgggtgatgctgggaaaatgggtctctttataactaataggacctaatctgctcctagcaatgtagcatat
```

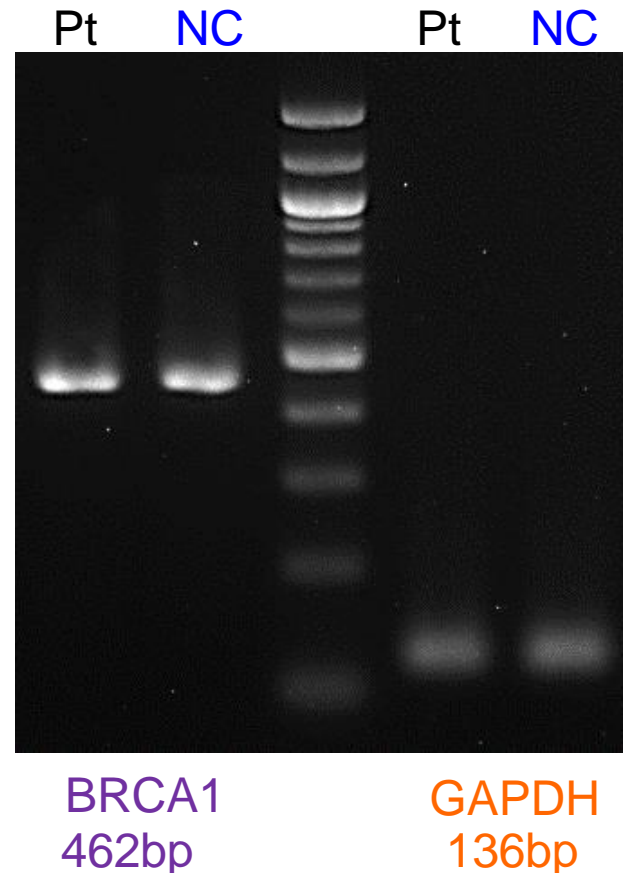
Pick left primer, or use left primer below: Pick hybridization probe (internal oligo), o

Pick Primers

Reset Form

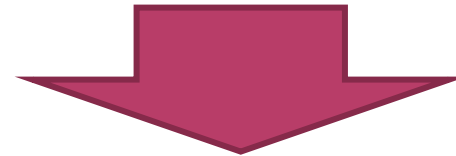
電気泳動での確認

- ・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る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



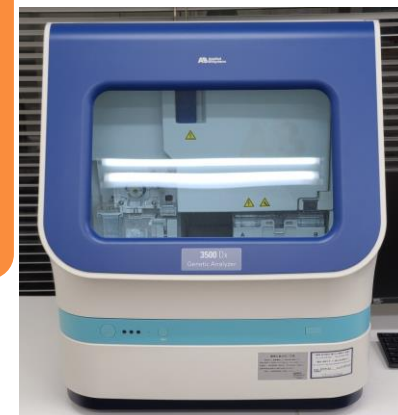
シーケンス反応



シーケンス反応産物の精製
(エタノール沈殿)

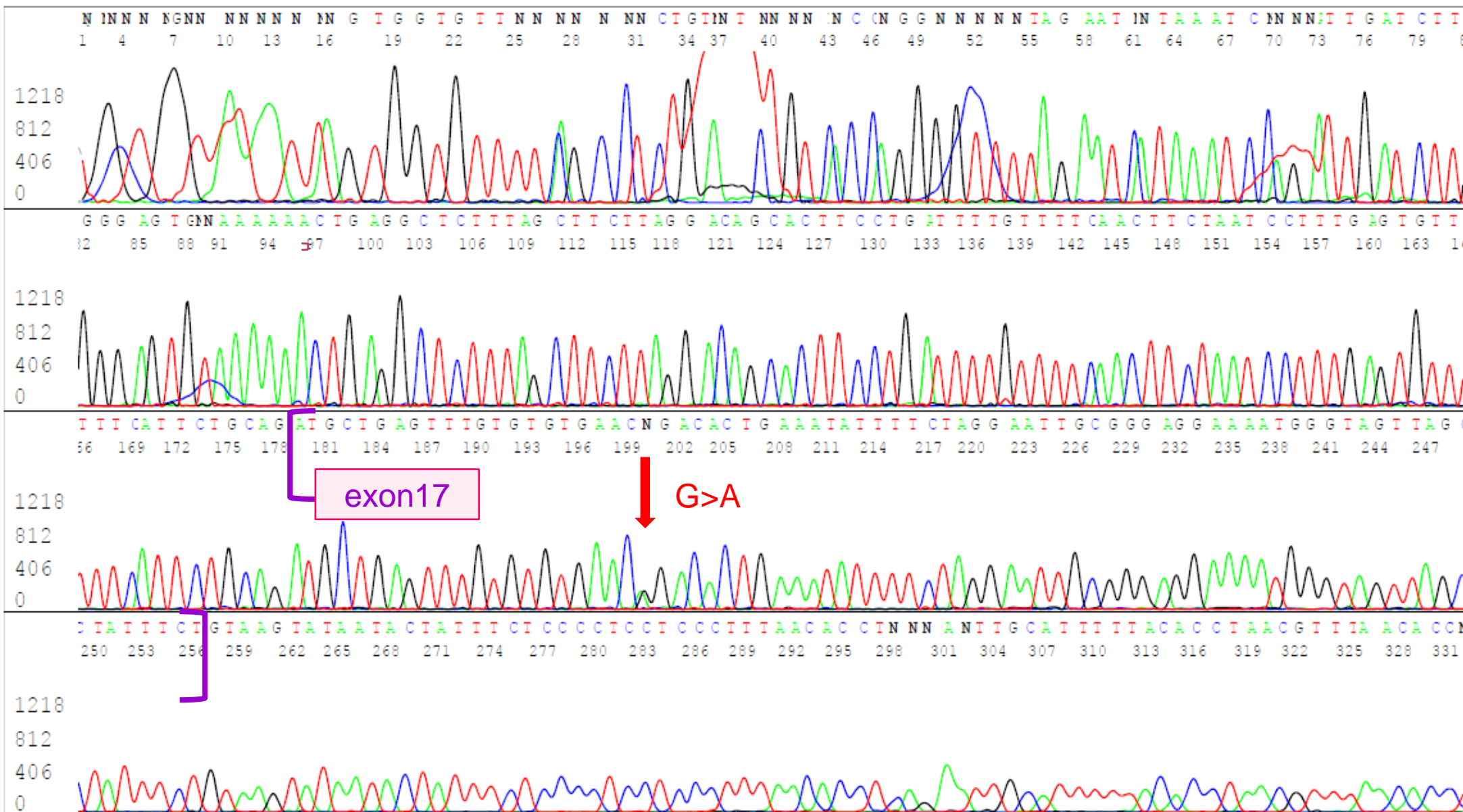


キャピラリー電気泳動



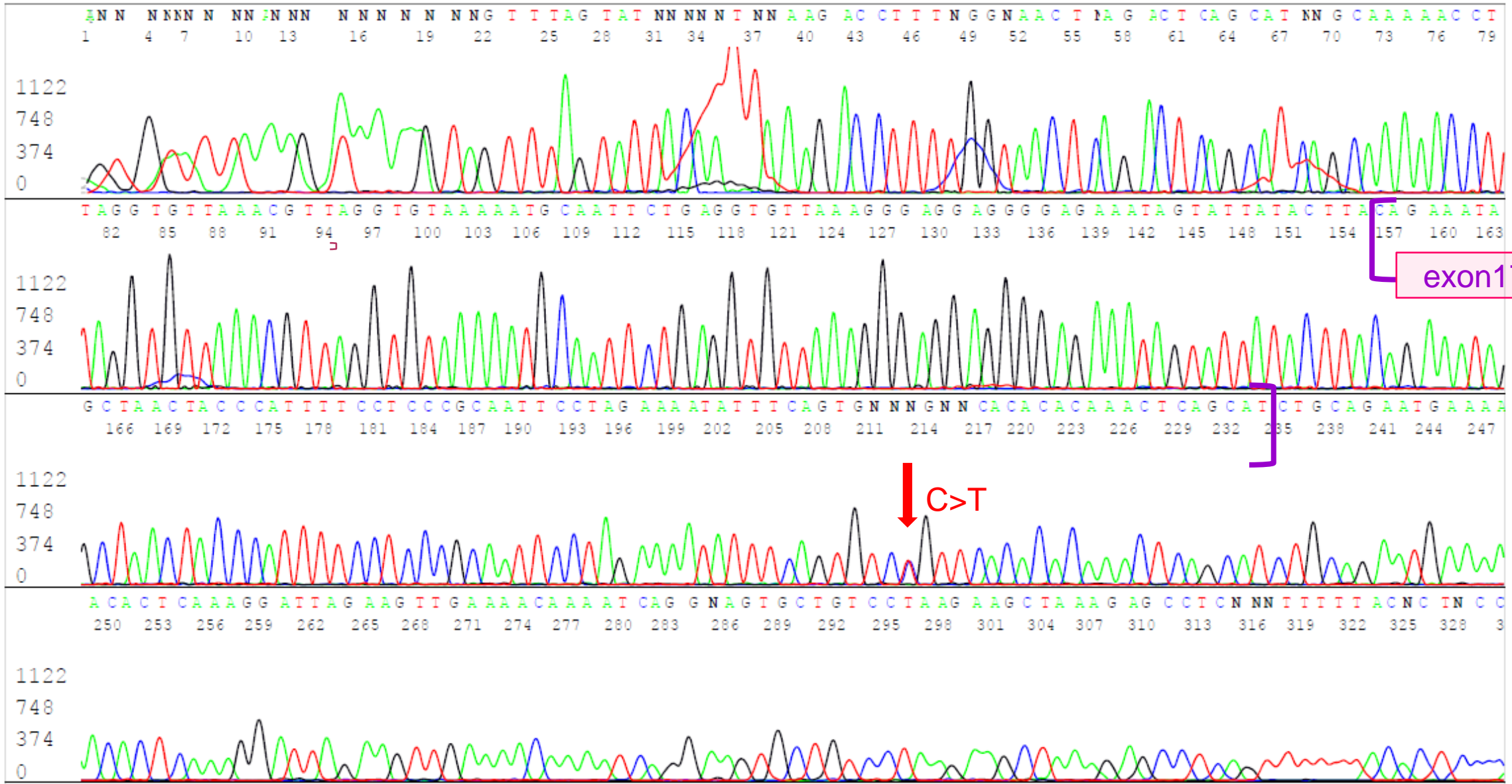
結果の解析

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

