

■ Primer Stabilizer 評価試験

任意の5種類の遺伝子A、B、C、D、Eを選び、それぞれのForwardまたはReverseプライマーをTrityl-ONで合成しました。

その後 OPC カートリッジ精製を施し、各プライマーの溶液を得ました。このプライマー溶液について『Primer Stabilizer (+)』、『Primer Stabilizer (-)』のサンプルを準備しました。このサンプルについて4℃、25℃および37℃の条件で保存試験を実施し、保存安定性の経時変化をMALDI TOF/MSによる分子量分析によって比較しました。

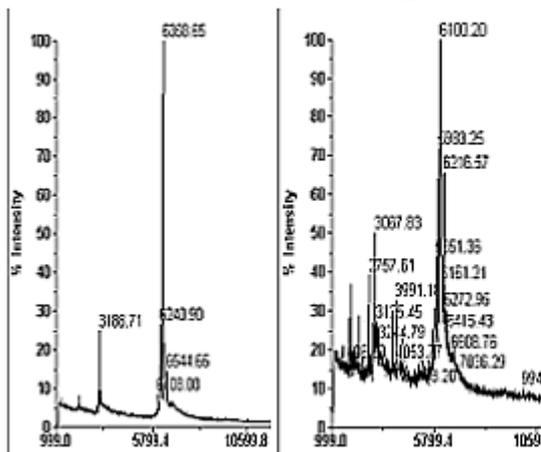
準備したサンプルプライマーのデータを以下に示しました。

		CG%	AG%	Tm値
遺伝子A	Forward	47.6	42.9	71.6
	Reverse	50	35	69.5
遺伝子B	Forward	60	55	71.4
	Reverse	60	65	71.9
遺伝子C	Forward	47.6	42.8	69.8
	Reverse	63.2	42.1	70.7
遺伝子D	Forward	54.5	59.1	70.6
	Reverse	48	32	70.1
遺伝子E	Forward	55	50	74

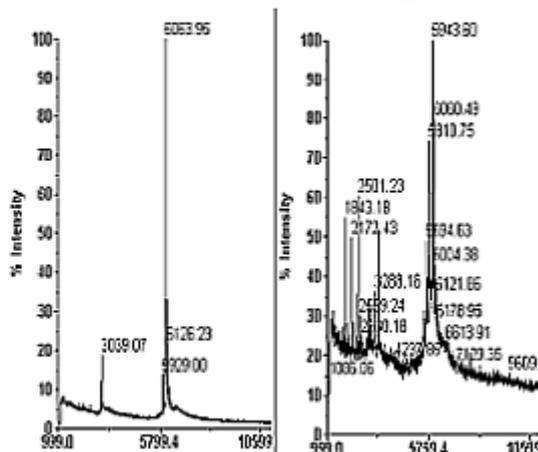
【分析結果】

MALDI TOF/MS 分子量分析の代表例を以下に示しました。

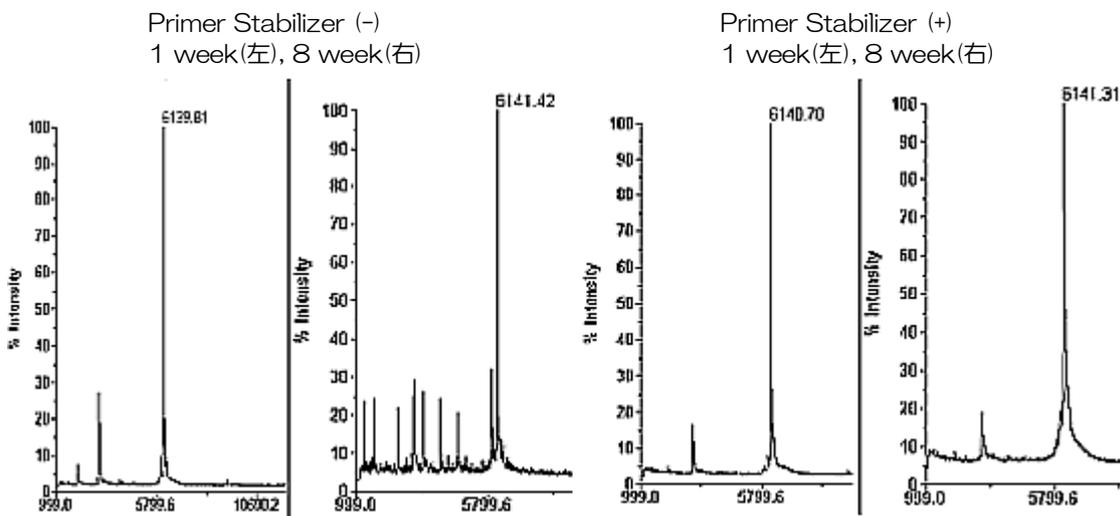
Primer Stabilizer(-) 25℃
遺伝子 A /Forward Primer
1 month(左), 7 month(右)



Primer Stabilizer(-) 25℃
遺伝子 A /Reverse Primer
1 month(左), 7 month(右)



37°C保存試験 遺伝子 E、Forward Primer



- 4°C 半年ぐらいから少し基線が乱れ始めます。(Data not shown)
- 25°C 1ヶ月目でアプリン酸 2 倍になり、4ヶ月目以降アプリン酸が何重にも発生し、基線の乱れもかなり発生しました。
- 37°C 1週間目でアプリン酸が 2~3 倍になり、1ヶ月目でアプリン酸が何重にも発生し、基線の乱れもかなり発生しました。

一般的に体外診断用キットなどのプライマーは、使用后-20°Cなどの凍結保管が推奨されています。しかしながら、我々が見出した Primer Stabilizer をプライマー溶液に添加することにより、37°Cでの負荷的な保存試験においてもプライマーの分解が抑制されていることがわかりました。

【考察】

通常のプライマー溶液中では、時間の経過と共にプライマーの切断を促進させる物質が生成します。その一つに酸素ラジカルがあります。この Primer Stabilizer は酸素ラジカルのスカベンジャーとして機能し、プライマーの切断が抑制されると考えられます。