

■ Primer Stabilizer 至適濃度確認

1. リアルタイムPCR 反応確認

Primer Stabilizer 濃度を 0~2.5mM に変化させて、SYBR 法、加水分解プローブ法によりリアルタイムPCR を行い、比較しました。

【材料・方法】

反応サンプル: cDNA(ヒト WT1、ヒト bcr/abl)

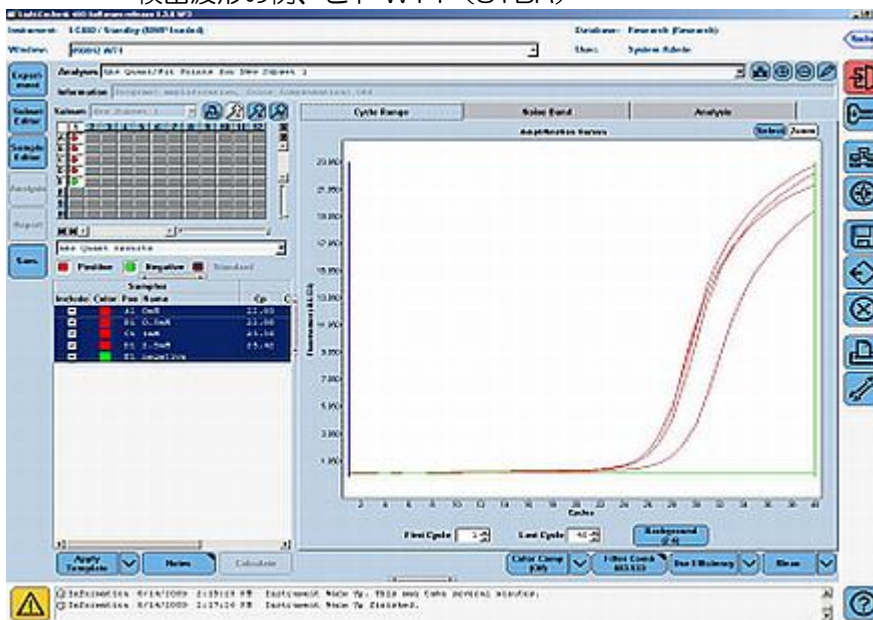
使用機器: LightCycler®480

使用酵素: LightCycler®480 SYBR Green I Master、
および LightCycler® Probe Master

【結果】

Primer Stabilizer 濃度	ヒトWT1	ヒトbcr/abl
	SYBR検出	加水分解プローブ検出
Primer Stabilizer 濃度	CP値	CP値
0 mM	22.85	23.05
0.5 mM	22.88	22.77
1 mM	23.36	22.58
2.5 mM	25.42	22.91

検出波形の例、ヒト WT1 (SYBR)



【考察】

Primer Stabilizer の至適濃度は反応系終濃度で 0.5~1.0mM で、上記のリアルタイム PCR において阻害は見られませんでした。この濃度範囲の Primer Stabilizer 添加プライマーは通常どおり、ワーキングソリューションへ希釈するだけで使用可能です。

2. 高解像度誘拐曲線分析の確認

【目的】

Primer Stabilizer のメルティングカーブに及ぼす影響を、HR-1 コントロールキットにて評価しました。

【材料・機器】

プライマー: HR-1 コントロールキットのプライマー (Human β 3 adrenergic receptor)

マスターミックス: LightCycler®480 High Resolution Melting Master

機器: LightCycler® 480

サンプル: ゲノムDNA10ng(C/T ヘテロ、唾液から抽出した DNA)

【方法】

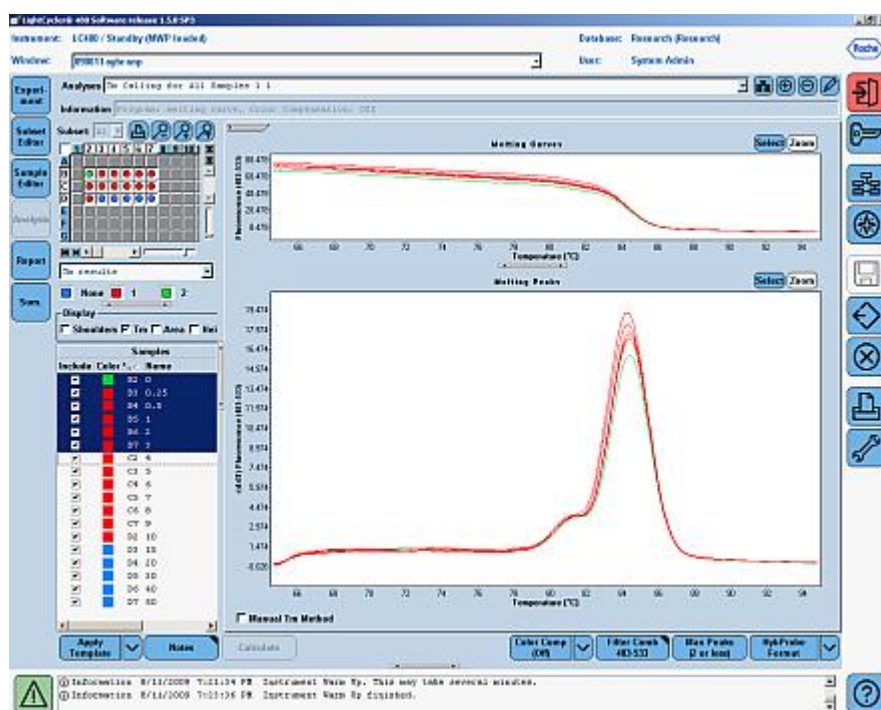
反応組成: プライマー濃度 0.5 μ M、テンプレート 10ng、その他はマスターミックスキット添付の標準プロトコルに従いました。

Primer Stabilizer 濃度: 反応系終濃度を 0、0.25、0.50、1.0、2.0、3.0mM となるように添加しました。

温度条件: アニリング温度 60°C、伸長反応時間 5sec、その他はマスターミックスキット添付の標準プロトコルに従いました。

【結果】

Primer Stabilizer の終濃度 0~3.0mM において、メルティングカーブへの変化は見られませんでした。



【考察】

この結果より、実験(1)で得られた Primer Stabilizer 至適濃度 0.5~1.0mM では、メルティングカーブへの影響は見られませんでした。定量・定性・SNP 解析など PCR 反応において、Primer Stabilizer 添加による阻害は見られませんでした。