

## 通常のデザイン方法

下記の基準に合致するデザインを検索します。  
ご要望がございました際は、ご相談ください。

### プライマー

項目	基準（許容範囲）
プライマーの長さ	18mer-22mer（17mer-25mer）
プライマーの T <sub>m</sub> 値	60.0°C-62.0°C（59.5°C-63.0°C） T <sub>m</sub> 値は Nearest Neighbor 法により下記条件にて計算した値となります。 Primer-BLAST などの Web サイトで計算が可能です。  Table of thermodynamic parameters = SantaLucia 1998 による Salt correction formula = SantaLucia 1998 による Concentration of monovalent cations = 50mM Concentration of divalent cations = 3mM Concentration of dNTPs = 0.8mM 転換式 = Ahsen et al., 2001. による Annealing Oligo Concentration 300nM  * SantaLucia 1998 <a href="http://www.pnas.org/content/95/4/1460.full">http://www.pnas.org/content/95/4/1460.full</a> * Ahsen et al., 2001. $[Monovalent\ cations] = [Monovalent\ cations] + 120 * (\sqrt{[divalent\ cations] - [dNTP]})$
プライマー間の T <sub>m</sub> 値の差	1°C 以内（2°C 以内）
プライマーの GC%	45-55%（40-60%）
プライマーの 同一塩基の連続数	A あるいは T : 4nt 以内 G あるいは C : 3nt 以内 ※ただし 3' 末端 5nt 領域を除く。
プライマーの 2 塩基の繰り返し	4 リピート以内 ※ただし 3' 末端 5nt 領域を除く。
プライマーのヘアピン	3' 末端：なし（-2kcal/mol 以上） 内部：なし（-3kcal/mol 以上かつ T <sub>m</sub> < 50°C） OLIGO software による計算値となります。
プライマーの相補性（ホモダイ マーおよびヘテロダイマー）	3' 末端と 3' 末端：-2kcal/mol 以上（-3kcal/mol 以上） 3' 末端と内部：-3kcal/mol 以上（-5kcal/mol 以上） 内部と内部：-6kcal/mol 以上（-10kcal/mol 以上） OLIGO software による計算値となります。
プライマーの 3' 末端 5nt 領域 の GC の数	2nt 以上 3nt 以内（1nt 以上 3nt 以内） ※3' 末端 2nt 以内に 1nt を含む（3' 末端 3nt 以内に 1nt を含む）
プライマーの 3' 末端 5nt の ΔG	-6~-9kcal/mol（-5.5~-10kcal/mol） OLIGO software による計算値となります。
プライマーの特異性	① BLAST により、他の遺伝子領域と類似性のある領域を検索し、この類似領域を避けてプライマーを設計します。Database は reference sequence を使用します。（配列上難しい場合は、類似領域内においてプライマーを設計し、少なくとも一方のプライマーの 3' 末端の 2 塩基以内に 1 塩基、かつ 3' 末端の 5 塩基以内に 3 塩基の塩基相違を確保します。） <a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&amp;PAGE_TYPE=BlastSearch&amp;LINK_LOC=blasthome">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&amp;PAGE_TYPE=BlastSearch&amp;LINK_LOC=blasthome</a> ② ターゲット内の他の領域に Efficiency100 を超えるフォールスプライミングサイトがないこと。（難しい場合は Efficiency160 以内とするか、あるいは Efficiency100 を超えるプライミングサイトとの間に 2000bp の増幅リスクがないようにします） ※Efficiency は Oligo Software による数値となります。 ③ Primer BLAST により Primer Pair Specificity Checking を行います。パラメーターは Default 値に設定します。ターゲットのみがヒットすることを確認します。（難しい場合は、2000bp 以上の非特異増幅リスクは許容します。） <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/</a>

### 加水分解プローブ

項目	基準（許容範囲）
プローブの長さ	30mer 以内（35mer 以内）

プローブの Tm	68°C-70°C
プローブの GC%	40-60% (35-65%)
5' 末端	G を避ける
プローブ内の 同一塩基の連続数	A あるいは T : 4nt 以内 G あるいは C : 3nt 以内
プローブのヘアピン	内部 : なし (Tm < 60°C) OLIGO software による計算値となります。
プローブの相補性	ホモダイマー : -6kcal/mol 以上 (-10kcal/mol 以上) プライマーとのヘテロダイマー : -6kcal/mol 以上 (-10kcal/mol 以上)。 ただし、プライマーの 3' 末端は -3kcal/mol 以上 (-5kcal/mol 以上) OLIGO software による計算値となります。
ストランド	G よりも C が多い方が好ましい。
プローブの位置	同じストランドのプライマーにできるだけ近い位置が好ましい。

#### デザイン領域およびアンプリコン

項目	基準 (許容範囲)
オルタナティブプライシングバリエーション	お客様のご指定がない場合は、オルタナティブプライシングバリエーションに共通の領域でデザインします。オルタナティブプライシングバリエーションは reference sequence に登録があるもののみを対象とします。(難しい場合は、できる限り多くのバリエーションを検出できるようにデザインします)
CDS	CDS 内で設計します。より 3' 側の領域を優先的に選択します。 (難しい場合は、3' UTR あるいは 5' UTR の領域も利用します。)
エクソン/エクソン境界 (RT-qPCR の場合)	少なくとも一方のプライマーをエクソン/エクソン境界上にプライマーを位置させるか、あるいは 4000bp 以上 (2000bp 以上) のイントロンを挟むように設計します。エクソン/エクソン境界上にプライマーを位置させる場合は、プライマーの 3' 末端の 3/4nt、5/6nt、6/7nt あるいは 7/8nt にエクソン/エクソン境界が位置するようにしています。 難しい場合は、2000bp 以下のイントロンを挟むようにし、できる限りエクソン/エクソン境界上にプローブを設計するようにします。 それでも難しい場合は、同一エクソン内で設計します。
アンプリコンサイズ	SYBRGreen の場合 : 100-150bp (70-250bp) 加水分解プローブの場合 : 80-120bp (70-150bp) Hypercool primer&probe の場合 : 70bp 以下 ※その他、研究の目的に応じて設定いたします。
アンプリコンの Tm と GC%	90°C 以下, 66.7% 以下
アンプリコンのメルティングドメイン	uMelt によりアンプリコン内のメルティングドメインを解析し、アンプリコン内に顕著なメルティングドメインがないことを確認します。 (困難な場合は、プローブ法に限り、メルティングドメインを含むことを許容します。) *uMelt <a href="https://www.dna.utah.edu/umelt/um.php">https://www.dna.utah.edu/umelt/um.php</a>
アンプリコンの 2 次構造	プライマーのアニールリングサイトに 2 次構造がないこと。 (2 次構造がある場合は、55°C まで許容) プローブのアニールリングサイトに 2 次構造がないこと。 (2 次構造がある場合は、63°C まで許容) 2 次構造の Tm は mFOLD の DNA folding form により下記の条件にて計算した値となります。 Folding temperature : 60°C [Na+] : 50mM, [Mg++]: 3mM *mFOLD DNA folding form <a href="http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/dna-folding-form">http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/dna-folding-form</a>
SNP	Minor Allele Frequency > 0.01 の SNP がプライマーおよびプローブのアニールリングサイトに位置しないようにします。 注意)本サービスでは Minor Allele Frequency < 0.01 あるいは頻度が不明なレアな SNP、CNV や CNA、体細胞突然変異の Hotspot は考慮しません。ご希望の場合はご相談ください。