

Hypercool Primer & Probe™ デザイン方法

- 1) 弊社ホームページからダウンロード可能な「通常のデザイン方法」に従い、アンプリコンサイズは 70bp 以下としてプライマー・プローブを設計します。

★ポイント

プライマー・プローブの GC% は 40~60% に設定してください。T_m 値はソフトでの設計段階でプライマーが 60℃ 以下、プローブが 68℃ 以下になっても構いません。後に「2-amino-dA」(2aA), 「5-Methyl-dC」(5mC) を導入することにより、T_m を上げることができるためです。また、プライマーとプローブの長さを短く設計することが好ましいです。プライマーとプローブの長さを短くすることで、アンプリコンサイズをより短くできるためです。プライマーとプローブ間の距離は、プローブと同じストランドのプライマーについては 1nt まで、プローブと違うストランドのプライマーについては 0nt まで短くすることができます。配列中に A 及び C がいない場合は T_m 上昇効果が得られませんので含まれるデザインを行ってください。

- 2) プライマー・プローブ配列中に含まれるアデニン塩基、シトシン塩基の一部をそれぞれ「2-amino-dA」(2aA), 「5-Methyl-dC」(5mC) に置換し、T_m 上昇効果で最終的にプライマーの T_m 値は 59.5~63℃、プローブの T_m 値は 68℃ 以上になるようにします。置換後の T_m 値はホームページ上の「T_m 値算出シート(ひな形)」を用いて、その算出例を参考に計算してください。

★ポイント

プライマーが 5' 末端から 3 塩基までと 3' 末端から 5 塩基まで、プローブの場合は 5' 及び 3' 末端から 3 塩基までの領域は、「2-amino-dA」(2aA), 「5-Methyl-dC」(5mC) の導入を避けてください。またプライマーの自己相補性やプライマー・プローブ間の相補性、及び 3' 相補性がある部位はなるべく避けるようにします。

(※) 2-amino-dA (2aA) の導入は配列中に 5 個までの制限があります。