

## KASP assay design – Anchoring

AnchoringはKASP<sup>TM</sup>アッセイデザインのための特別なアプローチ法です。このアプローチ法を利用することで非常に類似した2つ（以上）の配列をKASPアッセイで識別することが可能です。アッセイプライマーは対象の配列にのみ存在し、かつ、ゲノム上に起こりうる類似の配列には見られない単一の固有の塩基を使用するように設計されています。その塩基を同定できたならば、固有の塩基を使用することによってアッセイを対象の領域に「Anchor(固定)」できます。

### Anchoringのしくみ

典型的なKASPアッセイは3つのプライマーを使用します。3つのプライマー: 対立遺伝子特異的フォワードプライマーを2つと共通のリバースプライマーを1つ。2つの対立遺伝子特異的プライマーは3'末端の塩基のみ異なり、各プライマーはジェノタイピングされる異なる対立遺伝子の1つに特異的です。PCR反応が終了すると、対立遺伝子特異的プライマーが蛍光シグナルを生成します。標準的なアッセイ (non-anchored) では、共通のリバースプライマーはPCR反応を走らせるためだけに必要とされます。

Anchoringはその共通のリバースプライマーを活用しますが、隣接配列に1つ以上の塩基の存在を必要とします。その塩基は標的のSNP / InDelの70bp以内で、かつ目的の配列に対して固有である必要があります。これらの固有の塩基を「Anchoring point (固定点)」として使用して、アッセイを対象領域のみに特異的にすることができます。Anchoringアッセイにおいて共通のリバースプライマーは、3'末端に固有の塩基を使用した設計がされています。これはAnchoredアッセイが固定点を含む領域を優先的に増幅することを意味します。

共通のリバースプライマーを介したアッセイの固定は、対立遺伝子特異的フォワードプライマーの機能に似ており、3'末端に正しい相補的な塩基を持つプライマーが優先的にアニーリングおよび伸長します。Taqポリメラーゼ複合体はプライマーの3'末端から伸長を開始するため、プライマーの3'末端（対立遺伝子特異的と共通のアンカーの両方）は反応に特異性を導入する上で重要です。プライマーの3'末端にミスマッチまたは非相補的な配列があると、PCRが停止します。

## Anchoring Assayが役立つケース

Anchoringにより、対象領域（標的のSNP / InDelを含む領域）に非常に類似した複数の配列を含むDNAサンプルのSNPまたはInDelの遺伝子型の特定にKASPアッセイを利用できるようになります。

これらにAnchoringを利用しない場合、非常に類似した配列の存在が反応の特異性に悪影響を及ぼし、すべての遺伝子型を正確に報告できないアッセイやジェノタイピングのクラスター間の分離の欠如を引き起こす可能性があります。

Anchored KASPアッセイが最も有用な2つのシナリオは次のとおりです。

- Homology – KASPアッセイの標的配列がゲノム内で固有ではなく、標的配列と非常に類似した配列が同じゲノム上に1つ以上に存在する場合、KASPアッセイのAnchoring が推奨されます。
- Polyploid genomes – KASPアッセイのAnchoringは、異質倍数体生物のジェノタイピングを行う際に役立ちます（つまり2つ以上の祖先種に由来する複数のゲノムをもつ生物）。Anchoringは通常複数のゲノムに1つ以上存在するオーソログ配列の結果として標的配列が複数のゲノム内で固有でない場合に使用できます。

## Anchoring用に配列を提出する方法

適切なLGC SNP提出フォームを使用し、標的のSNP / InDelsの配列情報を送信してください。隣接配列を入力する際に、Anchoring pointとして使用するすべての塩基を<>で囲む必要があります。

SNP ID	Sequence
Example01	ATAACTACTTTTAAAGGCACATTATTCAACCTCACT<G>TGCATTTTCATCCTC[A/T]TG CATAATGACAGTTATTCTCTCCCAAGTCTCCTTCTGGGACAGTTAAAG

図1. LGC社SNP提出フォームに入力された配列の例

標的SNP（ピンクの丸で囲まれた）は []で囲まれ、Anchor point（青で囲まれた）は<>で囲まれている必要があります。

提出する配列のフォーマットの詳細は、Assay design factsheetのセクション2をご参照ください。

最良の結果を得るにはAnchoring pointをできるだけ標的の多型に近づける必要があります。標的の多型から70bp以上離れたAnchoring pointを持つ配列を提出しないでください。これらは多型から離れすぎており堅牢なKASPアッセイを設計できないため、LGCのアッセイ設計ソフトウェアでは無視されます。

## Examples

### Example 1 – Homology

標的の多型の周囲の配列が相同性によって影響を及ぼす場合、AnchoringはKASPアッセイを標的配列に特異的にするために使用できます。下記に例を示します。



SNP@Chr6:6638363	AACATGGCGTCCGGGGGTAAGATAAGACCKAACCGTAAATACCCACTGCAGCCAAGAGTT
Chr3:54828053	TGGCGTCCGGGGGTATGATAAGACCTAACCGTAAATACCGACTGCAGCCAAGAGTT
Chr6:3395586	CATGGCGTCCCTGGGGTAAGATAAGACCTAACCGTAAATACCGACTGCA
Chr14:14221507	GGTATGATAAGACCTAACCGTAAATACCCACTGCAGCCAAGCAAT
Chr11:2891379	CCGGGGGTATGATAAGACCTAACCGTAAATACCGACTGCA
Chr7: 67545571	GGGGGTAAGATAAGGCCTAACCGTAAATAC

図2. 標的SNPの隣接配列および相同配列のアライメント例。 標的SNPはピンク色、Anchor pointは青色、標的配列と一致しない塩基はオレンジ色

上記のアライメントで一番上の配列が標的SNPとその隣接配列です。下の5つはゲノムの他の場所にある相同性を持つ配列を示しています。使用される可能性のある標的配列の固有の塩基がAnchoring pointとして示されています。

この配列をAnchored KASPアッセイの設計用に提出する際は、LGCのSNP提出フォームに以下のように入力する必要があります。

SNP ID	Sequence
Example02	AAACATGGCGTCCGGGGGTAAGATAAGACC[T/G]AACCGTAA<G>TACCCACTGCAGCCAAGAGTT

図3. 図2の標的SNPの配列。  
LGC社SNP提出フォームに[SNP]と<anchor point>の両方を入力されると、正しく配列が認識されます。

## Example 2 – Polyploid genome

倍数体ゲノムを持つ生物をジェノタイピングするとき、AnchoringはKASPアッセイを単一の標的ゲノムに特異的にするために使用されます。下記に例を示します。



図4. 3つの (A、B、D) ゲノムを示す倍数体生物のアライメントの例。上部および下部の配列に存在するSNPは、IUPAC ambiguityコード「S」で示されています。

この例では、3つのゲノム (A、B、D) を示しています。DとBの両方のゲノムにSNPが存在します。この例ではAnchoringを使用して、DまたはBゲノムのいずれかをターゲットとするKASPアッセイを設計できます。

このシーケンスをAnchored KASP assay design用に提出するには、LGCのSNP提出フォームに入力する必要があります。それぞれのAnchorは単一のゲノムにのみ特異的であり、もし両方のゲノム特異的アッセイが必要な場合、以下に示すように配列を別々の行に入力し提出する必要がありますのでご注意ください。

SNP ID	Sequence
D-genomeSNP	CCGTTAGGGTCGCGTCCT<C>ACTCAGCGG[C/G]GGTCCAAATTGGAGTCGGTT TGATCGCAAGG
B-genomeSNP	CCGTTAGGGTCGCGTCCTAACTCAGCGG[C/G]GGTC<T>AAATTGGAGTCGGTT TGATCGCAAGG

図5. 図4のSNPの配列。

LGC社SNP提出フォームに [SNP]と<anchor point>の両方を入力すると、正しく配列が認識されます。

### Example 3 – Multiple anchor points

標的の多型の隣接配列に利用可能な潜在的なAnchoring siteが複数ある場合、提出する配列にそれらをすべて含めることができます。下記にその例に示します。

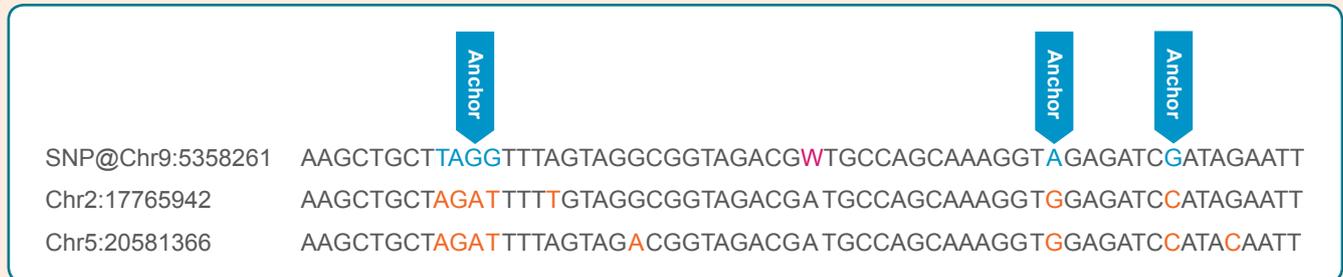


図6. 標的SNPの隣接配列および相同配列をアライメントした例。この例には複数のアンカーポイントが含まれています。複数のAnchor pointを含む配列を提出される場合、そのすべての潜在的なAnchorを<>で囲む必要があります。Anchor pointが複数の塩基で構成されている場合、これらすべてを<>で囲む必要があります。LGCのアッセイ設計ソフトウェアは、提出された配列で同定されたすべてのAnchorの中から最適なAnchorを使用します。

図6に示すような配列をAnchored KASP assay design 用に提出する際は、LGC社のSNP提出フォームに以下のように入力する必要があります。

SNP ID	Sequence
Example03	AAGCTGCT<TAGG>TTTAGTAGGCGGTAGACG[AT]TGCCAGCAAAGGT<A>GAGATC<G>ATAGAATT

図7. 図6のSNP配列。LGC社SNP提出フォームに [SNP]と複数の<anchor point>の両方を入力すると、正しく配列が認識されます。

## Useful links

### LGC Genotyping services SNP submission template

ジェノタイピングサービスプロジェクトに配列情報を提出する際はこのフォームをご利用ください。

### LGC KOD and KBD SNP submission template

ご自身の研究室でKASPアッセイを使用する際は、このフォームをご利用下さい。

### Assay design factsheet

LGCへ提出するDNA配列情報（様々なパターンのSNP/Indelとその隣接配列情報を記入する）方法を説明したFactsheet.

### Request a free KASP trial kit

ご自身のラボで初めてKASP Assayを試される際は無償のKASP trial kitをご利用いただけます。

#### 【お問い合わせ】

プライムテック株式会社 ライフサイエンス事業部

バイオ試薬ソリューション部

TEL : 03-3816-0851

電子メール : reagents@primetech.co.jp

[www.lgcgroup.com/genomics](http://www.lgcgroup.com/genomics) • [genomics@lgcgroup.com](mailto:genomics@lgcgroup.com)

Science for a safer world

Australia • Brazil • Bulgaria • China • France • Germany • Hungary • India • Ireland • Italy • Netherlands  
Nordic countries • Poland • Romania • Russia • South Africa • Spain • Turkey • United Kingdom • USA

All trademarks and registered trademarks mentioned herein are the property of their respective owners. All other trademarks and registered trademarks are the property of LGC and its subsidiaries. Specifications, terms and pricing are subject to change. Not all products are available in all countries. Please consult your local sales representative for details. No part of this publication may be reproduced or transmitted in any form or by any means, electronic or mechanical, including photocopying, recording or any retrieval system, without the written permission of the copyright holder. © LGC Limited, 2015. All rights reserved. 4469/CF/0815.



お問い合わせ :

**プライムテック株式会社**

[www.primetech.co.jp](http://www.primetech.co.jp)

**ライフサイエンス事業部 バイオ試薬ソリューション部**

東京都文京区小石川1-3-25 小石川大国ビル2F

Phone : 03-3816-0851 (代表) Fax : 03-3814-5080

E-mail : reagents@primetech.co.jp