

# マニュアル

## KASPジェノタイピング日本語マニュアル

---

本製品は研究用です。診断用には使用しないでください。

# Manual

KASP genotyping manual

## 目次

|                      |   |
|----------------------|---|
| 1. イントロダクション .....   | 3 |
| 2. キットの内容と保存条件.....  | 3 |
| 3. 使用条件.....         | 4 |
| 4. プロトコル.....        | 4 |
| 4.1 準備.....          | 4 |
| 4.2 手順.....          | 4 |
| 5. トラブルシューティング ..... | 6 |
| 6. 自動化プロトコル.....     | 8 |
| 7. サポート.....         | 8 |

# Manual

## KASP genotyping manual

### 1. イントロダクション

**KASP技術**は、シンプルで正確かつフレキシブルなエンドポイントジェノタイピング法です。KASPは競合的アレル特異的PCR法を独自に利用した技術で、一塩基多型(SNP)の両アレルを検出し、さらに挿入欠失(InDel)も検出することができます。KASPはサーマルサイクラーを用いて反応を行い、FRET測定のできるプレートリーダー（対応するフィルターを有するもの）やqPCR装置で蛍光を測定します。

ウェブサイトにはKASPアッセイの原理や資料に加えて、一般的なqPCR装置に応じた[ガイド](#)もごさいます。

上記サイトにご使用の機種種の掲載が無い場合、KASP適合性があるかをバリデーションキットで判断していただくことが可能ですので、reagents@primetech.co.jpまでご連絡ください。

### 2. キットの内容と保存条件

KASPジェノタイピングアッセイには、Biosearch Technologies™が販売する以下の二種類の試薬が必要です：

1. KASPアッセイミックス：お客様にご提供いただいた配列で設計したターゲット特異的なプライマーが含まれます。
2. KASP-TFマスターミックス：KASPジェノタイピングアッセイに共通の試薬です。2×濃度のマスターミックスになっており、Taqポリメラーゼと最適化されたバッファー、およびパッシブリファレンスとしてROX™が含まれています。

|                 | 4 °C | -20 °C | -80 °C |
|-----------------|------|--------|--------|
| KASPアッセイミックス    | 14 日 | ≥1 年   | n/a    |
| KASP-TFマスターミックス | 7 日  | 1 年    | ≥1 年   |

表1 KASP試薬の推奨保存条件

KASP試薬は凍結融解の繰り返しによるダメージを防ぐために、使用量に応じて分注して保存してください。KASP-TFマスターミックスは遮光チューブで保存してください。

# Manual

## KASP genotyping manual

### 3. 使用条件

KASPジェノタイピングアッセイをお客様のラボで行う際には、以下の条件が必要となります。

1. サンプルDNA – クラスター解析には、一度のジェノタイピングアッセイにつき、最少で22のDNAサンプルが必要です。KASPジェノタイピングアッセイ液中のDNA最終濃度は2.5 ng/μL以上を推奨しています。つまり、1反応あたり10μLの系では25 ng、5μLの系では12.5 ngのDNAを使用します。このDNA量はヒトゲノムサイズを基準にしています。必要DNA量の詳細についてはトラブルシューティングをご参照ください（表6b）。
2. KASPアッセイで得られる蛍光を測定するには、FRET測定のできるプレートリーダーかqPCR装置が必要です。表2に遺伝子型を区別するために使用している蛍光物質（FAM™およびHEX™）とパッシブリファレンスダイ(ROX)の蛍光・励起波長を示しています。

| 蛍光物質 | 励起波長 (nm) | 蛍光波長(nm) |
|------|-----------|----------|
| FAM  | 485       | 520      |
| HEX  | 535       | 556      |
| ROX  | 575       | 610      |

表2 KASPで使用している蛍光物質の蛍光・励起波長

3. PCRプレート – 通常96あるいは384ウェルプレートを使用します。
4. プレートシール - PCR用で、光学的に透明な蛍光を測定できるものを使用してください。

### 4. プロトコル

#### 4.1 準備

- DNAサンプルを加えたプレートを準備してください。クラスター解析には、一度のジェノタイピングアッセイにつき、最少で22のDNAサンプルが必要です。ジェノタイピング反応ごとにテンプレートなしコントロール(NTC)も加えてください（96ウェルプレートでは2つ、384ウェルプレートでは4つ）。
- 必要量を分注したKASP-TFマスターミックスとKASPアッセイミックスを完全に融解し、ボルテックスで混合してください。

#### 4.2 手順

- 4.2.1 十分量（ピペッティング操作を考慮して必要量の10%増）のKASPジェノタイピングミックス（KASPアッセイミックス+KASP-TFマスターミックス）を準備します。表3に96ウェルと384ウェルプレートフォーマットでの、KASPジェノタイピングミックスに必要なウェルごとの試薬量を示しています。

# Manual

## KASP genotyping manual

### DNA溶液使用

### 乾燥DNA使用

|                     | 96-ウェルプレート<br>(μL/ウェル) | 384-ウェルプレート<br>(μL/ウェル) | 96-ウェルプレート<br>(μL/ウェル) | 384-ウェルプレート<br>(μL/ウェル) |
|---------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| DNA                 | 5 *1                   | 2.5 *1                  | n/a                    | n/a                     |
| 2X KASP-TF マスターミックス | 5                      | 2.5                     | 5                      | 2.5                     |
| KASP アッセイミックス       | 0.14                   | 0.07                    | 0.14                   | 0.07                    |
| 水                   | n/a                    | n/a                     | 5 *2                   | 2.5 *2                  |
| 合計反応液量              | 10                     | 5                       | 10                     | 5                       |

表3 KASPジェノタイピングミックスに必要な試薬量 \*1 [3.1](#)あるいは[表6b](#)を参照し、適切な濃度に調整してください。

\*2 乾燥DNAを使用する場合はKASP-TFマスターミックスを1×にするために水を加えます。

4.2.2 DNAプレートの各ウェルに必要な量のKASPジェノタイピングミックスを分注します。

4.2.3 PCR用の光学的に透明なシールでプレートにシールします。

4.2.4 550×g以上でプレートを遠心分離し、反応液すべてをウェルの底に集めます。

4.2.5 反応プレートをサーマルサイクラーかqPCR装置にセットします。

4.2.6 表4に示した温度条件でKASPジェノタイピングアッセイを行います。

| ステージ                             | 温度                                                     | 時間   | ステージごとの<br>サイクル数 |
|----------------------------------|--------------------------------------------------------|------|------------------|
| ステージ 1<br>ホットスタート <i>Taq</i> 活性化 | 94 °C                                                  | 15 分 | × 1 サイクル         |
| ステージ2<br>タッチダウン                  | 94 °C                                                  | 20 秒 | × 10 サイクル        |
|                                  | 61 °C<br>(61°Cから1サイクルごと<br>に55°Cまで0.6°Cずつ<br>温度を下げます ) | 60 秒 |                  |
| ステージ 3<br>増幅                     | 94 °C                                                  | 20 秒 | × 26 サイクル        |
|                                  | 55 °C                                                  | 60 秒 |                  |
| オプション* ステージ 4<br>(qPCR装置で測定する場合) | 30 °C<br>(40°C以下であれば何°C<br>でも測定可能)                     | 60 秒 | × 1 サイクル         |

表4 KASPジェノタイピングアッセイPCRサイクル \*ステージ4はKASPジェノタイピングアッセイをqPCR装置で行う際のみ必要です。KASPジェノタイピングアッセイをサーマルサイクラーかHydrocycler2™で行う場合、必要なのはステップ1～3ですが、蛍光の測定前にプレートを40°C以下に冷却してください。

4.2.7 蛍光の測定前に確実にプレートを40°C以下に冷却してください。プレートが40°C以上で測定を行った場合、ジェノタイピングデータを解析することができません。

4.2.8 FRET測定可能なプレートリーダーかqPCR装置で蛍光の測定を行います。表2にKASPで使用している蛍光物質の詳細が示されています。

4.2.9 4.2.9. 必要な場合PCRサイクルを追加してください（リサイクリング反応）。KASPリサイクリング反応の詳細は表5に示しています。反応後は4.2.7および4.2.8に従って蛍光の測定を行ってください。

# Manual

## KASP genotyping manual

| ステップ | 反応            | 温度    | 時間   | ステップごとのサイクル数 |
|------|---------------|-------|------|--------------|
| 1    | 変性            | 94 °C | 20 秒 | × 3 サイクル     |
| 2    | アニーリング/<br>伸長 | 57 °C | 60 秒 |              |

表5 KASPリサイクリング反応条件。リサイクリング反応は標準的なKASPアッセイサイクル（表4）で明確にクラスターが分かれなかった場合に行います。リサイクリング反応（それぞれ3サイクル）は最大で4回まで行うことができます（一回ごとに蛍光の測定を行ってください）。これは、KASPアッセイサイクルに12サイクルを追加することに相当します。4回のリサイクリング反応を行ってもクラスターが明確に分かれない場合、他のトラブルシューティングが必要になります。

**4.2.10** KASPアッセイサイクルが終了したプレートは解析するまで冷暗所（4℃以下で最長1週間）で保存できます。したがって、必要であれば追加の蛍光測定やリサイクリング反応を行い、得られる最良のデータを得ることができます。

**4.2.11** クラスタープロットによりデータを解析し、DNAサンプルのジェノタイピングを行います。

## 5. トラブルシューティング

全てのKASPアッセイで同じ、あるいは同様な結果不良となった場合、ラボでのワークフローが要因である可能性が考えられます。テクニカルサポートにコンタクトする前に、表6a～dを参照し、ラボでのセットアップが正しいか確認してください。

### 試薬

KASP-TFマスターミックスとKASPアッセイは正しく保存されていたか？

#### 共通の原因：

|                               |                                                                                                                                    |
|-------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| KASP試薬の保存が適切でなかった             | KASP試薬は凍結融解の繰り返しによるダメージを防ぐために、使用量に応じて分注して保存してください。KASP-TFマスターミックスは遮光チューブで保存してください。KASP-TFマスターミックスは4℃では1週間、-20℃あるいは-80℃では1年間保存できます。 |
| 試薬が完全に融解していなかった               | すべての試薬は使用前に完全に融解してください。試薬の各成分によって融解温度が異なるため、KASPジェノタイピングミックスの調製を行う前に、チューブ内の試薬を完全に融解する必要があります。                                      |
| 試薬を十分混合していなかった                | 試薬を完全に融解した後、すべての試薬を使用前に完全に混合してください。十分に混合しなかった場合、すべてのプライマーが反応に組み込まれないなどの問題が起こることがあります。                                              |
| KASP-TFマスターミックスのバージョンが適切でなかった | qPCR機種によってROX(パッシブリファレンスダイ)の至適濃度が異なります。ご使用機器に適したバージョンのKASP-TFマスターミックスをご使用ください。（詳しくはウェブサイトをご覧ください）                                  |

表6a

# Manual

## KASP genotyping manual

### DNA

テンプレートDNAは品質・量ともに十分でしたか？

共通の原因：

|                    |                                                                                                                                          |
|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 反応に用いるDNA量が適切でなかった | DNAテンプレート量が適切か確認してください。適切な量はターゲット種のゲノムサイズによって異なり、ヒトかそれ以下のゲノムサイズの種では1サンプル当たり5～50 ngのDNAを用いてください。ヒトよりゲノムサイズが大きい種ではゲノムサイズに応じてDNA量を増やしてください。 |
| DNA品質が低かった         | PCR阻害物質が含まれていたり、DNAが分解していたりしてDNA品質が低いと、KASP反応効率に影響を及ぼすことがあります。DNAが標準的なPCRでワークしていればKASPジェノタイピングアッセイでもワークするはずです。                           |

表6b

### 実験のセットアップ

全ての実験手順は正確でしたか？

共通の原因：

|                                        |                                                                                            |
|----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| 反応組成が間違っていた                            | KASPジェノタイピングミックスに必要なすべての試薬を正しい量で加えたことを確認してください。反応に必要な試薬量は表3を参照してください。                      |
| 反応液量がプレートタイプに適していなかった                  | お使いのPCRプレートタイプに適した液量で反応を行ってください。96ウェルプレートでは10 µL、384ウェルプレートでは5 µLの液量で反応を行ってください。           |
| 反応液をプレートに分注する際のピペッティング操作が正確でないか一定でなかった | ピペッティング操作が安定していないと、ジェノタイピングに失敗する可能性があります。反応プレートの各ウェルのROXレベルを確認し、ピペッティング操作が正確だったかを確認してください。 |
| KASPのPCRサイクルが正確でなかった                   | PCR装置のプログラムが正確だったか確認してください。                                                                |

表6c

# Manual

## KASP genotyping manual

### プレートの測定

プレートの測定は適切でしたか？

共通の原因：

|                                           |                                                                                                    |
|-------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| プレートシールが適切でなかった                           | 蛍光シグナルを正確に測定するために、PCR用の光学的に透明なシールを使用してください。蒸発を防ぐためにしっかりとシールします。蒸発は反応効率と生成される発光シグナルに影響を及ぼす可能性があります。 |
| プレートリーダーあるいはqPCR装置が正しく蛍光シグナルを測定できない構成であった | 使用するプレートリーダーあるいはqPCR装置に正確な蛍光と励起波長を設定してください。無料のKASPトライアルキットをご用意していますので、ご使用の機器で使用してみてください。           |
| PCR後、40℃以上で蛍光測定を行った                       | KASPは40℃以上では蛍光を測定できないので、蛍光の測定は40℃以下で行ってください。                                                       |
| リアルタイムで読まれたデータやCt値でデータ解析を行った              | KASPはエンドポイントでのジェノタイピングアッセイです。リアルタイムのデータやCt値は意味のあるデータにはなりません。KASPの蛍光データはPCRプログラムの最後に測定します。          |

表6d

表6a-d. KASPジェノタイピングにおける結果不良の共通の原因

特定のアッセイのみ結果不良となった場合で、かつ同一のDNAサンプルを他のアッセイで用いて良好な結果が得られた場合は、アッセイ特有のトラブルシューティングが必要になります。KASPトラブルシューティングガイドで原因と解決法について提案しています。結果不良となった場合、まず同一のDNAサンプルと同一のKASPアッセイミックスでもう一度実験を行い、実験ミスの可能性をチェックしてください。

## 6. 自動化プロトコル

KASPアッセイのハイスループット化には、完全にあるいは部分的なエンドポイントジェノタイピングの自動化を行うSNpline™ PCRジェノタイピングシステムをご検討ください。RepliKator™はDNAプレートのレプリケートの作成や、96ウェルから384ウェルや1536ウェルへのリフォーマットに使用します。Kube™プレートヒートシーラーを含むシーリングの自動化機器のオプションもございます。Hydrocycler2™はウォーターバス式のサーマルサイクリングシステムで、すべてのプレートタイプで利用可能であり、さらにサイクル時間が早いのでハイスループット化を加速させることができます。

## 7. サポート

[ウェブサイト](#)にKASPアッセイの設計、配列提出方法、別の温度サイクルプロトコルやqPCR装置に応じたガイドなど、広範囲にわたるサポート資料が掲載されています。

さらにサポートが必要な場合、[reagents@primetech.co.jp](mailto:reagents@primetech.co.jp)までご連絡ください。





本製品は研究用です。診断用には使用しないでください。

## Integrated tools. Accelerated science.

   @LGCBiosearch | [biosearchtech.com](https://biosearchtech.com)

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, 2021. All rights reserved. GEN/0253/MW/0921



お問い合わせ：  
**プライムテック株式会社**  
[www.primetech.co.jp](https://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](mailto:reagents@primetech.co.jp)

---

**BIOSEARCH™**  
**TECHNOLOGIES**  
GENOMIC ANALYSIS BY LGC