

KASPジェノタイピングガイド

– リサイクリング反応 –

このガイドはリサイクリング反応のプロセスを解説し、ジェノタイピング結果の改善を図るためのものです。

イントロダクション

KASPジェノタイピングアッセイの効率はサンプルDNAの濃度、ターゲットSNP周辺のDNA配列構成などの数多くの要因によって影響されます。DNA配列の構成はプライマーの結合効率、つまりPCR反応効率に影響します。したがって、異なるKASPアッセイは異なる速度で反応終了に達するため、明確なジェノタイピングクラスターを得るには追加のPCRサイクルが必要な場合があります。ここではデータポイントが明確なクラスターを形成するのに十分な増幅量に達することを反応終了、としています。エンドポイントでの蛍光強度は増幅量に依存するので、十分な増幅量が必要となります。

KASPの標準的なPCRサイクル（10サイクルのタッチダウンPCRの後に26サイクルの標準的なPCR）を行っても、データポイントが明確なクラスターを形成しない場合があります。これはKASPジェノタイピングアッセイが機能しなかったのではなく、PCRが反応終了となるサイクル数に達していなかった可能性があります。このような場合に追加でPCRサイクルを行う「リサイクリング反応」をご紹介します。

リサイクリング反応の効果

リサイクリング反応を行うことで、データポイントを反応終了させることができ、明確なクラスターを形成させることで、正確なジェノタイピングを行うことにつながります。図1はリサイクリング反応の効果をクラスタープロットで表した図です。最初に行ったKASPの標準的なPCRサイクル後のデータポイントは3つのクラスターを形成し始めていますが、クラスター内のデータポイントは広がっています（図1A）。これは、同一ジェノタイプのサンプル間で蛍光強度がかなり異なることを示しています。さらに、全体的に蛍光シグナル強度が低すぎるために、テンプレートなしコントロール（NTC）が増幅しているように見えてしまいます。

このプレートでリサイクリング反応（3サイクル）を行い、蛍光を再度測定した結果が図1Bです。この段階で、多くのシグナルが検出され、クラスターもまとまってきました。さらに、NTCは増幅なしのクラスターを形成しました。さらにこのプレートでリサイクリング反応（3サイクル）を行い、蛍光を再度測定した結果が図1Cです。この段階で明確なジェノタイプごとのクラスターが形成され、反応が終了しました。

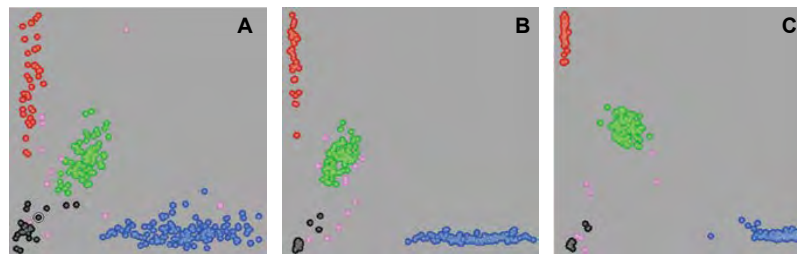


図1. リサイクリング反応ごとにジェノタイプクラスターが改善しました。(A)はクラスターが広がっており、リサイクリング反応後ではクラスターが改善し(B)、二度目のリサイクリング反応後に反応が終了し、明確でスコアリングしやすいクラスターが形成されました(C)。

KASPリサイクリング反応プログラム

KASPの標準のPCRサイクル終了後に明確なジェノタイプピングクラスターが形成されなかった場合、さらにPCRサイクルを追加します。

KASPリサイクリング反応は表1の条件でPCRを3サイクル追加します。

標準KASPジェノタイプピングアッセイと同様に蛍光の測定を行います（KASPジェノタイプピングマニュアル4.2.7, 4.2.8参照）。

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/ 伸長	57 °C	60 秒	
3 *	蛍光の測定	30 °C	60 秒	×1 サイクル

表1. KASPリサイクリング反応条件 *ステップ3はqPCR装置で測定を行う場合のみ必要です。

リサイクリング反応のヒントとコツ

- 反応が終了するサイクルはKASPアッセイごとに異なります。
- リサイクリング反応を複数回行う際は、複数回分をまとめて最後に蛍光を計測するのでなく、一回のリサイクリング反応ごとに計測し、アッセイを最適化することを推奨します。
- アッセイの最適化を行ったら、KASPの標準的なPCRサイクルに、反応終了に必要なサイクル数を加えることができます。それにより、次からはリサイクリング反応なしにアッセイを行うことができます。例えば、SNPアッセイ1が明確なクラスター形成に2回のリサイクリング反応（+6PCRサイクル）が必要だった場合、PCR反応を10サイクルのタッチダウンPCRに続いて32サイクル（26+6）PCRを行います。
- 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。これは、KASPの標準的なPCRサイクルに12回追加するのと同等です。4回のリサイクリング反応を行っても明確なクラスターが形成されなかった場合、KASPアッセイの再設計やDNA濃度の最適化などの他のトラブルシューティングが必要になります。

サポート

本ガイドについてのご質問はreagents@primetech.co.jpまでお問い合わせください



お問合せ：
プライムテック株式会社
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 小石川大田ビル 2F
Phone : 03-3816-0851 (代表) Fax : 03-3814-5080
E-mail : reagents@primetech.co.jp

Integrated tools. Accelerated science.

[@LGCBiosearch](https://twitter.com/LGCBiosearch) | 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, 2020. All rights reserved. GEN/830/MW/0820

**BIOSEARCH™
TECHNOLOGIES**
GENOMIC ANALYSIS BY LGC