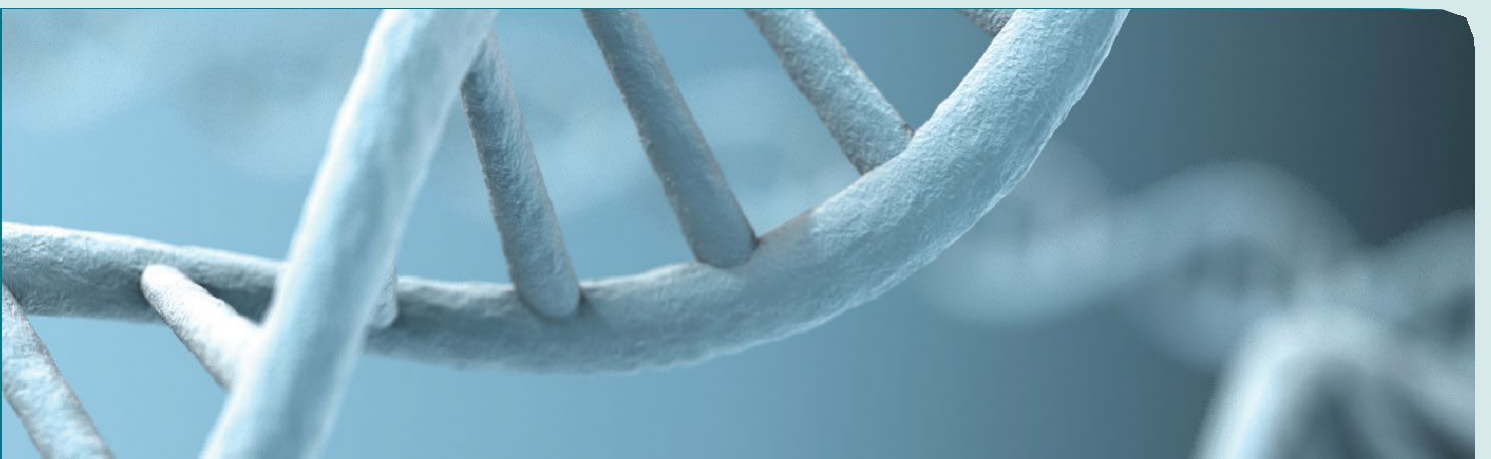


目次

- 1 [イントロダクション](#)
- 2 [共通する原因](#)
- 3 [トラブルシューティングガイド](#)
 - 3.1 [増幅が不十分](#)
 - 3.2 [各クラスターがまとまらず散らばっている](#)
 - 3.3 [ヘテロ接合体と一つのホモ接合体グループが分離しないか、かなり近接している](#)
 - 3.4 [ヘテロ接合体のクラスターが原点に近い](#)
 - 3.5 [3つ以上のクラスターができた](#)
 - 3.6 [予測よりクラスターの数が少ない](#)
 - 3.7 [いくつかのサンプルが増幅しない](#)
 - 3.8 [パターンが全くない](#)
 - 3.9 [ジェノタイピンググループが混ざっている](#)
- 4 [参考資料](#)
 - 4.1 [KASPジェノタイピングに用いるDNA濃度](#)
 - 4.2 [KASPジェノタイピングミックスの調製](#)
 - 4.3 [KASPジェノタイピングアッセイPCRサイクル](#)
 - 4.4 [KASPリサイクリング反応プロトコル](#)
 - 4.5 [励起・蛍光波長](#)
 - 4.6 [MgCl₂濃度の調整](#)
 - 4.7 [DMSOの添加](#)
 - 4.8 [相同性](#)



1. イントロダクション

このガイドはKASP™ジェノタイピングアッセイが結果不良となった場合にトラブルシューティングを行い、結果の改善を図るものです。

セクション2 は個々のアッセイ特有でない、共通の原因について概説しています。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、セクション2の表を参照し、ラボでのセットアップが正しいか確認してください。

セクション3 はアッセイ固有のトラブルシューティングを提供しています。つまり、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ているにもかかわらず、特定のアッセイのみ結果不良となった場合の考えられる原因を概説しています。

セクション4 はトラブルシューティングに関するより詳細なソリューションの詳細です。さらに、KASPジェノタイピングアッセイPCRサイクルや反応のセットアップ情報も含まれています。

2. 共通する原因

下表はKASP反応のトラブルシューティングを考慮すべき一般的な様々な要因を概説しています。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。

結果不良の原因探索に表をチェックリストとして使用してください。チェックした後、該当するものがあれば修正し、同じKASPアッセイを再ランしてください。これらのトラブルシューティングを実行してもまだ結果不良となる際にはサポートチームに連絡してください (reagents@primetech.co.jp)。その際は実験の詳細なすべての条件と、生データのクラスタープロットのスクリーンショットをメールに添付してください。

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、調製しましたか？

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 をご参照ください。

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。詳しくは セクション4.1 をご参照ください。
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。

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追加したことを確認してください。反応に必要な試薬量は セクション4.2 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 μ L、384ウェルプレートでは5 μ L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ティング操作が正確でないか一定でなかった	ピペ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。

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だった	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。

3. トラブルシューティングガイド

このセクションでは、KASPジェノタイピングアッセイのラン後に観察される結果不良の様々なプロットデータに応じた解決方法のガイドを示しています。

このセクションのトラブルシューティングを実行する前に、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（例、二つのKASPアッセイミックスが同じウェルに入ってしまった）。二回目の実験でも同じ結果が得られた場合、このセクションのガイドに従って、考えられる原因の解決を試みます。

3.1 増幅が不十分

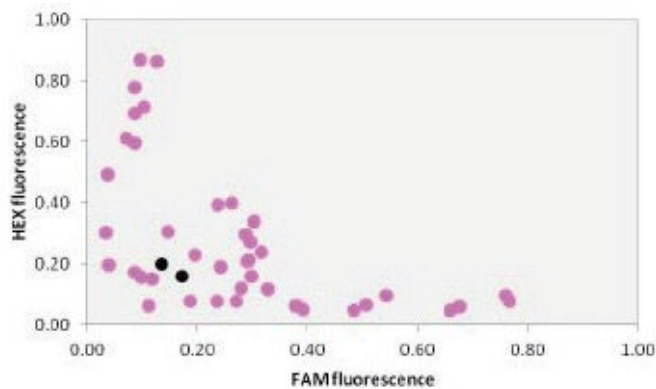


図3.1. データポイントがプロットの原点に近く、ジェノタイピングクラスターに分かれていない。

プロットの特徴: ジェノタイピングクラスターが予測よりも原点に近い。データポイントがクラスターに分かれていない（図3.1）。

原因 1: PCRサイクル数が少なく、反応終了にまで達していない。

解決法: リサイクリング反応を行う（[セクション4.4](#)参照）。

原因 2: プライマーのGC含量が30%より低い、または70%より高い。

解決法: GC含量が低い場合、反応のMgCl₂の濃度をあげる（[セクション4.6](#)参照）。

GC含量が高い場合、反応にDMSOを加える（[セクション4.7](#)参照）。

原因 3: DNA濃度が低すぎる（増幅が遅い）。

解決法: 適切な濃度のDNAで、再度実験する（[セクション4.1](#)参照）。

リサイクリング反応を行う（[セクション4.4](#)参照）。

3.1 増幅が不十分（続き）

原因 4: DNA濃度が高すぎる（PCR阻害物質が高濃度に存在する）。

解決法: 阻害物質を影響がないレベルにするためにDNA templateを希釈し、再実験する。

原因 5: DNA溶液にEDTAが多く含まれている（EDTAが Mg^{2+} イオンをキレートしている）。

解決法: $MgCl_2$ を増やす。例えば、サンプルにEDTAが0.5 mM含まれている場合、 $MgCl_2$ 濃度を0.5 mM上げる。

KASPマスターミックスには最終濃度が2.5mMになるように $MgCl_2$ が含まれています。 $MgCl_2$ の最終濃度は3.0 mMを超えないようにしてください。

3.2 各クラスターがまとまらず散らばっている

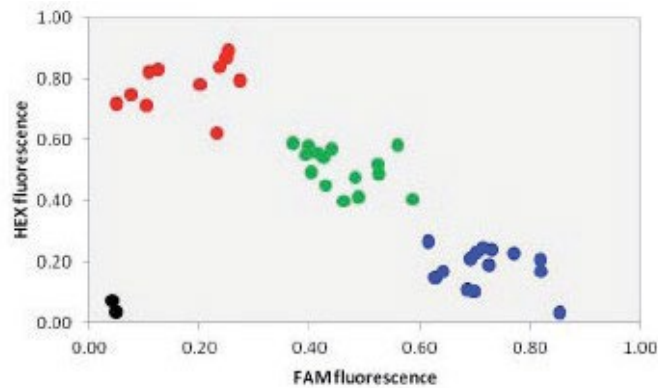


図3.2. クラスターが明確でないあるいはまとまっておらず、データポイントがプロットにわたって散らばっている。

プロットの特徴: クラスターが明確でないあるいはまとまっておらず、データポイントが散らばっている (図3.2)。

原因 1: DNAサンプルのクロスコンタミネーション。

解決法: DNA抽出手順とサンプル保存手順の確認を行い、クロスコンタミネーションの起こりそうな手順を確認する。

原因 2: 同一プレート内のDNAの品質や量が不均一 (異なるソースから抽出したDNAが混在して解析した場合、不均一になりやすい)。

解決法: KASPジェノタイピング反応に使用する前にDNAサンプルを均一化する。

原因 3: PCRサイクル数が少なく、反応終了にまで達していない。

解決法: リサイクリング反応を行う ([セクション4.4参照](#))。

原因 4: プライマーのGC含量に対し、マグネシウム濃度が高すぎる。

解決法: 特定のアッセイのマグネシウム濃度を決定するために、マグネシウム濃度の検討を行う。

原因 5: 最適なPCRサイクルでない。

解決法: GC含量をガイドに、代替のPCRサイクルを試す。アニーリング/伸長の温度を上げると、特異性を改善する可能性がある。代替のサイクルは[セクション4.3](#)を参照してください。

3.3 ヘテロ接合体と一つのホモ接合体グループが分離しないか、かなり近接している

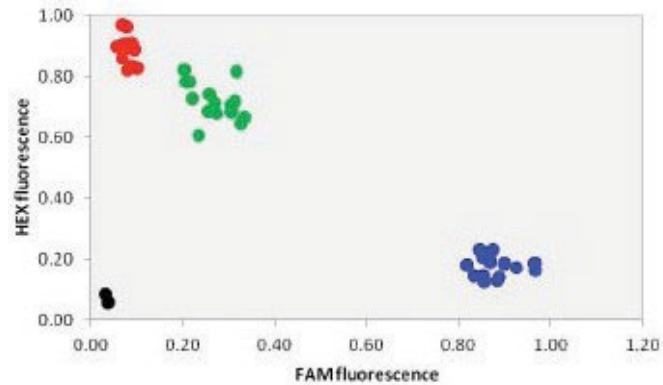


図3.3. 3つのクラスターが形成されているが、ヘテロ接合体のクラスター（緑）がホモ接合体のクラスター（赤）寄りに形成されている

プロットの特徴: ヘテロ接合体クラスターがホモ接合体のクラスターのどちらかに近接していて、ジェノタイプのスコアリングが難しい（図3.3）。

原因 1: どちらかのアレルの増幅効率がもう一方に比べて良い。

解決法: 注文したアッセイタイプによって異なります

- 設計のみ（KBD）の場合 - KODへのアップグレードを検討してください。その際、プロットのスクリーンショットも送ってください。必要に応じてバイアスを排除するための再設計を行います。
- ラボ検証済み（KOD）の場合 - テクニカルサポートに連絡してください。その際、プロットのスクリーンショットも送ってください。
- LGCプレデザインパネルから注文した場合- テクニカルサポートに連絡してください。その際、プロットのスクリーンショットも送ってください。

3.4 ヘテロ接合体のグループが原点に近い

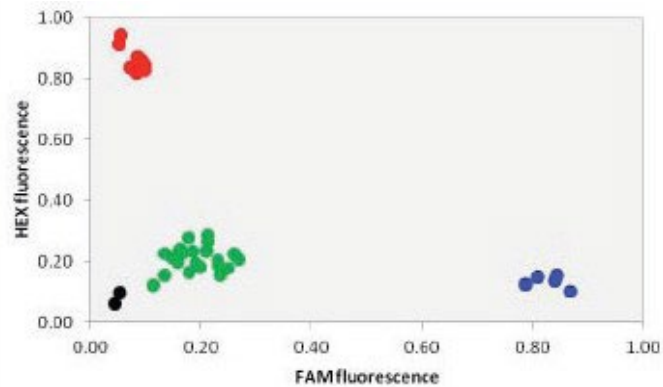


図3.4. 二つのホモ接合体クラスター（赤および青）は正常に増幅しているが、ヘテロ接合体クラスター（緑）はあまり増幅しておらず、原点付近にプロットされている。

プロットの特徴: ホモ接合体クラスターは正常に増幅しているが、ヘテロ接合体クラスターはあまり増幅しておらず、原点付近にプロットされている（図3.4）。

原因 1: KASPアッセイミックスを十分に混合せずに分注したか、解凍後十分に混合しなかった。

解決法: 使用前に完全に融解して混合する。

原因 2: フォワードプライマーが蛍光クエンチングシステムを飽和させている。

解決法: 注文したアッセイタイプによって異なります

- 設計のみ（KBD）の場合 - KODへのアップグレードを検討してください。その際、プロットのスクリーンショットも送ってください。必要に応じてバイアスを排除するための再設計を行います。
- ラボ検証済み（KOD）の場合 - テクニカルサポートに連絡してください。その際、プロットのスクリーンショットも送ってください。
- LGCプレデザインパネルから注文した場合- テクニカルサポートに連絡してください。その際、プロットのスクリーンショットも送ってください。

3.5 3つ以上のクラスターができた

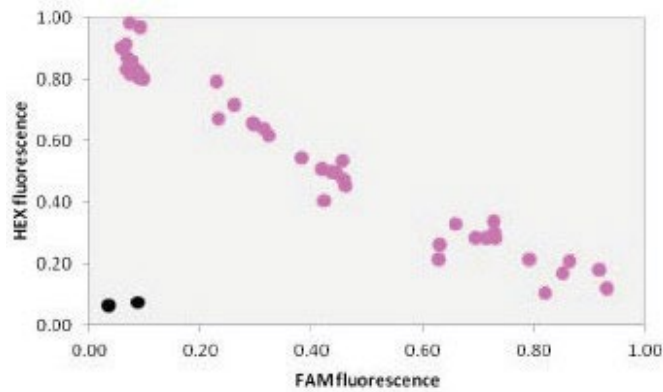


図3.5. 3つ以上のジェノタイピングクラスターが形成されているように見える

プロットの特徴: 3つ以上のジェノタイピングクラスターが形成されている（図3.5）。

原因 1: 反応に1つ、またはそれ以上のコンタミネーションがある。例えば、KASPアッセイミックスに別のアッセイミックスがコンタミネーションしている、DNAサンプルが混ざっている。

解決法: 別のチューブに分注したKASPアッセイミックスやDNAサンプルで再実験を行う。

原因 2: プライマー結合部位に多型が存在する。

解決法: 可能な場合、多型を含まない領域でアッセイを再設計する。またはターゲット外の隣接した多型をプライマー配列に縮重塩基として含むように再設計する。

- 設計のみ（KBD）の場合 - 実験に用いる材料でターゲット周辺の多型を同定し、KODへのアップグレードを検討してください。その際、プロットのスクリーンショットも送ってください。必要に応じてバイアスを排除するための再設計を行います。
- ラボ検証済み（KOD）の場合 - 実験に用いる材料でターゲット周辺の多型を同定し、テクニカルサポートに連絡してください。その際、プロットのスクリーンショットも送ってください。
- LGCプレデザインパネルから注文した場合- テクニカルサポートに連絡してください。その際、プロットのスクリーンショットも送ってください。

3.6 予測よりクラスターの数が少ない

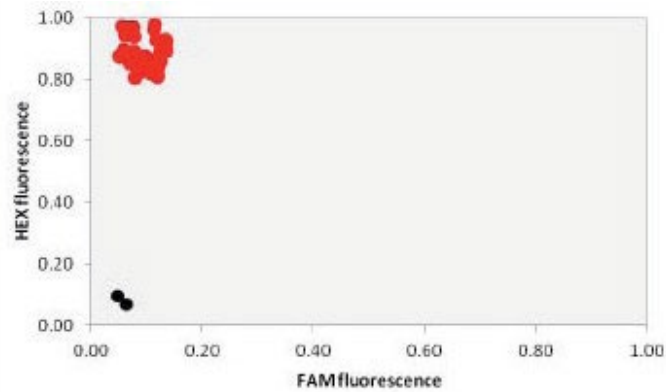


図3.6. すべてのデータポイントはプロット上の1つの位置に集まっている（このケースではHEXアレルのみ検出されている）

プロットの特徴: ジェノタイピングプロットで多型なしの結果となった（図3.6）。

原因 1: 解析した集団に一つの遺伝子型しか存在していない。片方の遺伝子型が予測よりも頻度が低く（マイナーアレル頻度）、解析した集団に存在しなかった。

解決法: 結果は正しく、対応する必要はありません。マイナーアレル頻度が低い場合は、プレートごとにポジティブコントロールを置いてください。ポジティブコントロールには、シーケンス解析で確認したサンプルなど、マイナーアレルが存在することを確認したDNAサンプルを使用してください。KASPアッセイと同時に合成ポジティブコントロールを注文することも可能です。

原因 2: プライマーがゲノムの相同領域にアニーリングしている。

解決法: 可能な場合、ターゲット領域に特異的で、相同領域に結合しない配列でアッセイを再設計する。相同性については[セクション4.8](#)をご参照ください。

- 設計のみ（KBD）の場合 - 実験対象種で利用可能なリソースを使用して相同性を調査してください。ターゲット領域特異的な塩基を同定し、KODへのアップグレードを検討してください。その際、プロットのスクリーンショットも送ってください。必要に応じてバイアスを排除するための再設計を行います。
- ラボ検証済み（KOD）の場合 - 実験対象種で利用可能なリソースを使用して相同性を調査してください。ターゲット領域特異的な塩基を同定し、テクニカルサポートに連絡してください。その際、プロットのスクリーンショットも送ってください。
- LGCプレデザインパネルから注文した場合- 実験対象種で利用可能なリソースを使用して相同性を調査してください。ターゲット領域特異的な塩基を同定し、テクニカルサポートに連絡してください。その際、プロットのスクリーンショットも送ってください。

3.6 予測よりクラスターの数が少ない（続き）

原因 3: SNPが存在していない。

解決法: 解析した集団でSNPが存在していない。他のSNPを選択し、解析に使用してください。

3.7 いくつかのサンプルが増幅しない

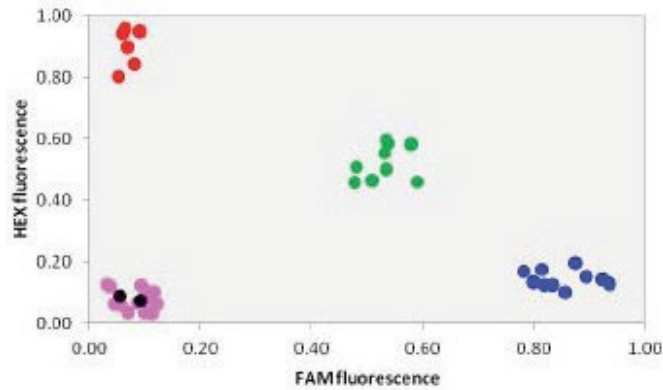


図3.7. 一部のサンプルは増幅し、ジェノタイピングごとのクラスターを予測通りに形成しているサンプルがある（青、緑、赤）一方、他のサンプルは増幅していない（ピンク）

プロットの特徴: いくつかのサンプルは予測通り増幅しているが、他のサンプルは全く増幅せず、原点にプロットされている（図3.7）。

原因 1: DNA量や品質が不均一である（異なるソースから抽出したDNAが混在して解析した場合、不均一になりやすい）。

解決法: KASPジェノタイピング反応に使用する前にDNAサンプルを均一化する。

原因 2: PCRプレートへのDNAのアプライ作業が適切に行われなかった、つまりDNAが少量が入っていないウェルがあり、増幅しなかった。

解決法: DNAアプライ作業をチェックする。

原因 3: ジェノタイピングミックスがウェルに少ししか分注されず、十分に増幅しなかった。

解決法: 反応プレートの各ウェルのROXレベルを確認し、ウェルにジェノタイピングミックスが均一に分注されたかチェックしてください。

原因 4: ターゲットSNPがいくつかのサンプルには存在しないので増幅しなかった。つまり結果は正しい。例えば、ターゲットSNPがY染色体に存在するが、解析した集団にはオスとメスが含まれていた（この場合、ヘテロ接合体は存在しない）。

解決法: 結果は正しく、対応の必要はありません。

3.8 パターンが全くない

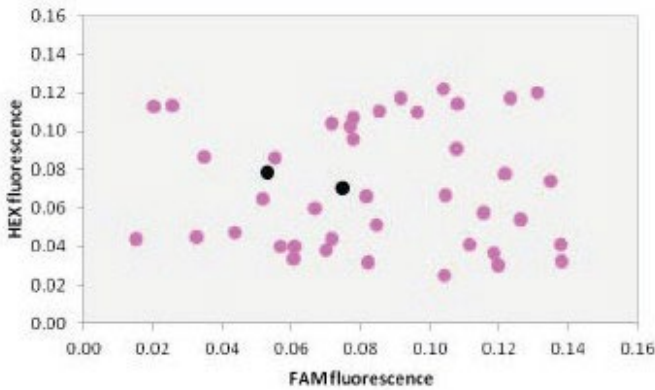


図3.8A. データポイントはプロットに散らばっており、ジェノタイピングの結果にパターンがない

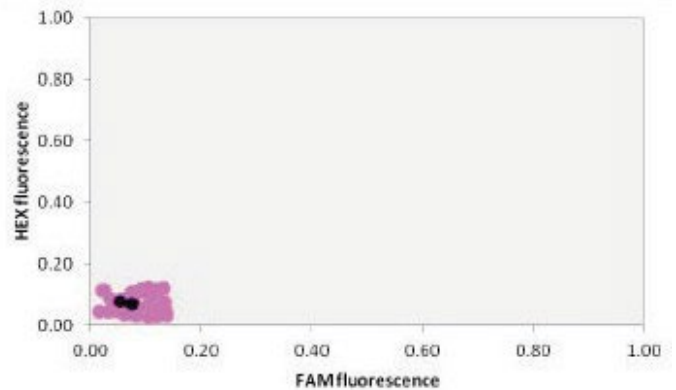


図3.8B. 図3.8AのX軸とY軸のスケールを変更したところ、すべてのデータポイントはNTCsと同一のグループを形成しており、増幅されなかったことを意味している。

プロットの特徴: パターンがなく、データポイントが散らばっている（図3.8A）。X軸とY軸のスケールを変更したところ、増幅がなかったことが分かった（図3.8B）。

原因 1: プレートリーダーの不具合

解決法: プレートリーダーをチェックし、再リードする。

原因 2: PCRプレートへのDNAのアプライ作業が適切に行われなかった、つまりDNAが少量か入っておらず、増幅しなかった。

解決法: DNAアプライ作業をチェックする。

原因 3: ジェノタイピングミックスがウェルに少ししか分注されず、十分に増幅しなかった。

解決法: 反応プレートの各ウェルのROXレベルを確認し、ウェルにジェノタイピングミックスが均一に分注されたかチェックしてください。

原因 4: ターゲットSNPがいくつかのサンプルには存在しないので増幅しなかった。つまり結果は正しい。例えば、ターゲットSNPがY染色体に存在するが、解析した集団にはオスとメスが含まれていた（この場合、ヘテロ接合体は存在しない）。

解決法: 結果は正しく、対応の必要はありません。

原因 5: DNA量が十分ではないか、アッセイ固有の特性で増幅が著しく遅い。

解決法: 適切なDNA量でもう一度ジェノタイピングしてみてください（[セクション4.1](#)参照）。リサイクリング反応を行う（[セクション4.4](#)参照）。

3.9 ジェノタイピンググループが混ざっている

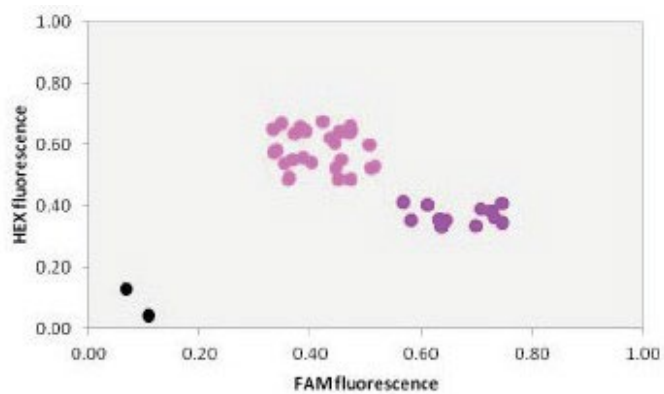


図3.9A. ジェノタイピングクラスターは形成されているが、位置が適切でない。

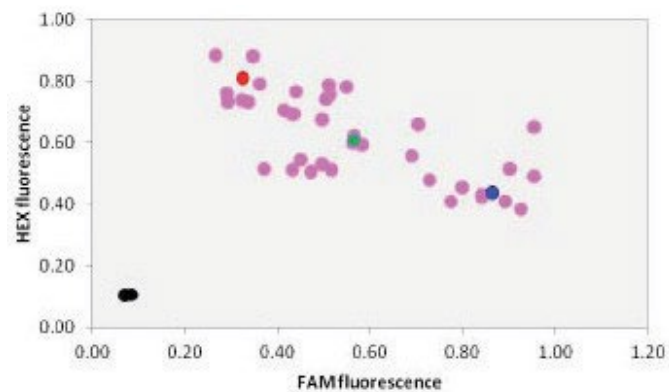


図.3.9B. ポジティブコントロール（青、緑、赤）が含まれていても、ジェノタイピンググループに分けるのが難しい。

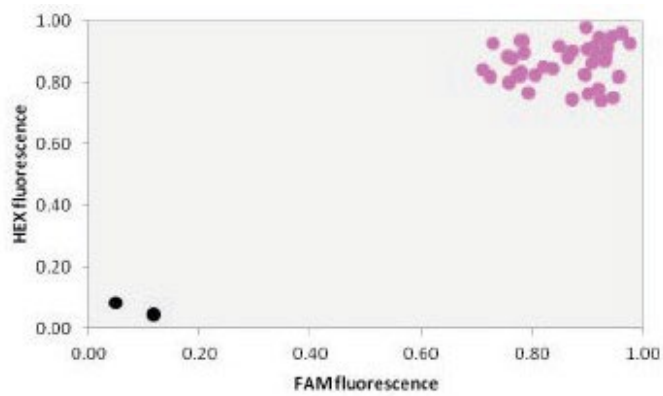


図3.9C. すべてのデータポイントがプロット上の一つの場所にクラスターを形成している。

3.9 ジェノタイピンググループが混ざっている（続き）

プロットの特徴: ジェノタイピンググループが近接しているか混ざっている。ジェノタイピンググループは形成されているが、プロットの位置が適切でない（図3.9A）、ジェノタイピンググループを分けるのが難しい（図3.9B）あるいはすべてのデータポイントが一つの場所にクラスターを形成している（図3.9C）。

原因 1: プライマーがターゲット以外に存在した相同領域にアニーリングし、ターゲット領域特異的に結合できない。

解決法:

1. 試験的にアニーリング温度を上げ、特異性の改善を図る。
 2. 可能な場合、ターゲット領域に特異的で、相同領域に結合しない配列でアッセイを再設計する。相同性については[セクション4.8](#)をご参照ください。
- 設計のみ（KBD）の場合 - 実験対象種で利用可能なリソースを使用して相同性を調査してください。ターゲット領域特異的な塩基を同定し、KODへのアップグレードを検討してください。その際、プロットのスクリーンショットも送ってください。必要に応じてバイアスを排除するための再設計を行います。
 - ラボ検証済み（KOD）の場合 - 実験対象種で利用可能なリソースを使用して相同性を調査してください。ターゲット領域特異的な塩基を同定し、テクニカルサポートに連絡してください。その際、プロットのスクリーンショットも送ってください。
 - LGCプレデザインパネルから注文した場合- 実験対象種で利用可能なリソースを使用して相同性を調査してください。ターゲット領域特異的な塩基を同定し、テクニカルサポートに連絡してください。その際、プロットのスクリーンショットも送ってください。

4. 参考資料

このセクションでは、KASPアッセイのトラブルシューティングに役立つ、様々な情報をご提供します。

4.1 KASPジェノタイピングに用いるDNA濃度

KASPジェノタイピングアッセイに適切なDNAテンプレート量は5~50 ng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10 μLの反応系では25 ng、5 μLの反応系では12.5 ngのDNAを使用します。例えば、10 μLの反応系を5 μLのDNAと5 μLのジェノタイピングミックス（KASPマスターミックス+KASPアッセイミックス、[セクション4.2](#)参照）で行う場合、最終濃度2.5 ng/μLになるように、用いるDNAは5 ng/μLである必要があります。

この値はヒトゲノムサイズ（~3000 Mbp）をもとにしています。対象種のゲノムサイズがヒトより大きい場合はゲノムサイズに応じてDNA濃度を上げる必要があります。ただし、対象種のゲノムサイズがヒトより小さい場合に、DNA濃度を下げる必要はありません。

ヒトよりゲノムサイズが大きい対象種では、DNA濃度を上げてください。対象種のゲノムサイズをヒトゲノムサイズ（3000 Mbp）で割り、その商と最終DNA濃度をかけた値が、対象種の最終DNA濃度となります。

例、Triticum aestivum (コムギ) : 15966 Mbp

$$15966 \text{ Mbp} / 3000 \text{ Mbp} = 5.3$$

$$5.3 \times 2.5 \text{ ng}/\mu\text{L} = 13.25 \text{ ng}/\mu\text{L}$$

したがって、コムギが対象種の場合、最終DNA濃度は13.25 ng/μLとなります。

（10 μLの反応系では132.5 ng、5μLの反応系では66.25 ngのDNAを使用します）

4.2 KASPジェノタイピングミックスの調製

KASPジェノタイピングアッセイは、KASPマスターミックス、ターゲット特異的なKASPアッセイミックス、およびDNAテンプレートの3種類で構成されます。DNAは溶液状（表1）でも乾燥状態（表2）でも使用することができます。

KASPジェノタイピングアッセイの組成 (DNA溶液)		
内容	5 μ L 反応 (384-well plate)	10 μ L 反応 (96-well plate)
DNA*	2.43 μ L*	4.83 μ L*
KASPマスターミックス (2X)	2.5 μ L	5 μ L
KASPアッセイミックス (72X)	0.07 μ L	0.14 μ L
水	n/a	n/a

表1. DNA溶液を使用する場合の5 μ Lおよび10 μ L反応系それぞれのジェノタイピングアッセイミックス組成。

* DNA濃度の詳細については[セクション4.1](#)をご参照ください。

KASPジェノタイピングアッセイの組成(乾燥 DNA)		
内容	5 μ L 反応 (384-well plate)	10 μ L 反応 (96-well plate)
DNA*	n/a*	n/a*
KASPマスターミックス (2X)	2.5 μ L	5 μ L
KASPアッセイミックス (72X)	0.07 μ L	0.14 μ L
水	2.43 μ L	4.86 μ L

表2. 乾燥DNAを使用する場合の5 μ Lおよび10 μ L反応系それぞれのジェノタイピングアッセイミックス組成。

* DNA濃度の詳細については[セクション4.1](#)をご参照ください。最終濃度に十分な量のDNAを乾燥させてください。

表に記載された容量はKASPジェノタイピングミックスの構成の正確な比率を示しています。ジェノタイピングミックスは個々に調製する必要はありません。反応数分にピペットエラーを考慮して10%程度を加えて調製することができます。

必要に応じてDNAあるいは水の量をきりの良い容量で調製することができます（例、5 μ L反応系ではDNAは正確には2.43 μ Lですが、2.5 μ Lで反応を行うことができます）。表3は96ウェルプレートでDNA溶液を使用した場合の、切り上げた容量でジェノタイピングミックスを調製した例です。

適切な濃度のDNA溶液5 μ Lを96ウェルプレートの各ウェルに分注してください。少なくとも2つのウェルはDNAの代わりに水を使用し、テンプレートなしコントロール(NTC)としてください。

KASPマスターミックスとKASPアッセイミックスを混合し、KASPジェノタイピングミックスを調製してください。表3は、96反応にピペッティングエラー分の10%を足してKASPジェノタイピングミックスを調製する場合の容量です。

KASPジェノタイピングミックスの組成			
内容	10 μ L 反応	96 x 10 μ L 反応	96 x 10 μ L 反応 + 10%
KASPマスターミックス (2X)	5 μ L	480 μ L	528 μ L
KASPアッセイミックス (72X)	0.14 μ L	13.44 μ L	14.78 μ L
トータル容量	5.14 μL	493.44 μL	542.78 μL

表3. 96反応分のKASPジェノタイピングミックスに10%のピペッティングエラー分を加えた量

5 μ LのKASPジェノタイピングミックスを反応プレートの各ウェルに分注します。分注済みのDNAと合わせて各ウェルの最終反応容量は10 μ Lになります。

4.3 KASPジェノタイピングアッセイPCRサイクル

標準的なKASPジェノタイピングアッセイPCRサイクルは「61-55℃タッチダウンプロトコル」で、表4.1に温度条件を示しています。KBDでアッセイを注文した場合、まず61-55℃タッチダウンプロトコルでアッセイを行ってください。

ステージ	温度	時間	ステージごとの サイクル数
ステージ1 ホットスタート <i>Taq</i> 活性化	94℃	15 分	x 1 サイクル
ステージ 2 タッチダウン	94℃	20 秒	x 10 サイクル
	61℃ (61℃から1サイクルごとに 最終的なアニーリング/伸長 温度の55℃まで0.6℃ずつ 温度を下げる)	60 秒	
ステージ3 増幅	94℃	20 秒	x 26 サイクル
	55℃	60 秒	
(オプション) ステージ 4 (qPCR装置で蛍光測定を行う場合)	30℃ (40℃以下であれば何℃でも 測定可能)	60 秒	x 1 サイクル

表4.1. 標準的な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℃以下に冷却してください。

KODかLGCプレデザインパネルでアッセイを注文した場合、最適なPCRサイクル情報が提供されます。KBDでアッセイを注文した場合は、LGCではin silicoの検証のみ行っているため、最適なPCRサイクル条件は提供することができません。

オプションとして2つの追加のPCRサイクルプロトコルがあり、最適なものとして推奨されるか（KODアッセイおよびLGCプレデザインパネル場合）、結果不良の場合は試す価値があります（KBDアッセイの場合）。

「68-62℃タッチダウンプロトコル」はGC含量が高い場合に適用されます（表4.2）。

「2ステップ57℃プロトコル」はGC含量が低い場合に適用されます（表4.3）。

ステージ	温度	時間	ステージごとの サイクル数
ステージ 1 ホットスタート <i>Taq</i> 活性化	94℃	15 分	x 1 サイクル
ステージ 2 タッチダウン	94℃	20 秒	x 10 サイクル
	68℃ (68℃から1サイクルごとに 最終的なアニーリング/伸長 温度の62℃まで0.6℃ずつ 温度を下げる)	60 秒	
ステージ 3 増幅	94℃	20 秒	x 26 サイクル
	62℃	60 秒	
(オプション) ステージ 4 (qPCR装置で蛍光測定を行う場合)	30℃ (40℃以下であれば何℃でも 測定可能)	60 秒	x 1 サイクル

表4.2. 68-62℃タッチダウンプロトコル

ステージ	温度	時間	ステージごとの サイクル数
ステージ 1 ホットスタート <i>Taq</i> 活性化	94℃	15 分	x 1 サイクル
ステージ 2 増幅	94℃	20 秒	x 36 サイクル
	57℃	60 秒	
(オプション) ステージ 3 (qPCR装置で蛍光測定を行う場合)	30℃ (40℃以下であれば何℃でも 測定可能)	60 秒	x 1 サイクル

表4.3. 2ステップ57℃プロトコル

4.4 KASPリサイクリング反応プロトコル

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。

標準のKASP PCRサイクル終了後に明確なジェノタイ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5の条件でPCRを3サイクル追加します。

ステージ	温度	時間	ステージごとの サイクル数
ステージ 1 増幅	94℃	20 秒	× 3 サイクル
	57℃	60 秒	
(オプション) ステージ 2 (qPCR装置で蛍光測定を行う場合)	30℃ (40℃以下であれば何℃でも測定可能)	60 秒	× 1 サイクル

表5. KASPリサイクリング反応のPCRサイクル

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回追加することと同等です。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。

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はなく、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（+6 PCR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。

4.5 励起・蛍光波長

KASPでは遺伝子型を区別する蛍光色素としてFAMとHEXを使用しています。パッシブリファレンスダイとしてROXも含まれており、これはウェル間の容量差による蛍光の差を標準化するために用います。これらの蛍光色素の励起および蛍光波長を表6に示します。

蛍光色素	励起波長 (nm)	蛍光波長 (nm)
FAM	485	520
HEX*	535	556
ROX**	575	610

表6. KASPジェノタイプングアッセイに用いる励起・蛍光波長

* VICとHEXの励起・蛍光波長はほぼ同じなので、蛍光色素VIC用にqPCR装置あるいはプレートリーダーが最適化されている場合、設定の変更は不要です。

** KASPアッセイでROXの測定は必須ではありませんが、ROXを測定しない場合、測定結果の標準化はできません。

4.6 MgCl₂濃度の調整

1×濃度でのKASPマスターミックス (v4.0) の最終MgCl₂濃度は2.5 mMです。ほとんどのKASPアッセイはこの濃度が最適です。KODでアッセイを注文し、MgCl₂濃度が指定されている場合を除いて、すべてのアッセイはまず標準的な2.5 mMで行ってください。ターゲットが特にGC含量の低い領域にある場合、MgCl₂濃度を2.8 mMに上げます。

4.7 DMSOの添加

ターゲットが特にGC含量の高い領域にある場合、最終容量に対して5-10%のDMSOを加えると、良好な結果が得られる場合があります。DMSOを加える際に、ジェノタイプングミックスの水の量を減らす必要はありません。また、DMSOを加えた際は、最終MgCl₂濃度は標準の2.5 mMで行ってください。

4.8 相同性

研究対象種でターゲット領域と相同性の高い領域があった場合、プライマーがターゲット領域特異的に設計されない可能性があります。その結果、プライマーはターゲット領域と相同領域に結合し、ジェノタイピングの結果に影響を与えることとなります。

ターゲット領域特異的なSNP(s)がターゲットの50 bp以内にある場合、そのSNP(s)をアッセイの特異性を上げるために使用できる可能性があります。リバースプライマーに領域特異的な塩基を3'末端に使用することで、その塩基（アンカリングポイント）を含む領域だけを優先的に増幅することができます（アンカリングアッセイ）。アンカリングアッセイについての詳細は[ウェブサイト](#)をご参照ください。

結果不良が相同性に起因する可能性が高い場合、ターゲット領域に特異的な塩基を特定し、KODにアップグレードするか（KBDで注文した場合）、テクニカルサポートにご相談ください（KODあるいはLGCプレデザインパネルで注文した場合）。

- **アンカリングアッセイについて**

KASPジェノタイピングアッセイには、非常に類似した2つ以上の配列を識別可能なAnchoring Assay法があります。

相同性の高い配列の1つにアッセイをデザインする場合や（図4.1）、高次倍数体ゲノムの単一の標的に特異的にアッセイをデザインする場合（図4.2）に有効です。



図4.1 相同性の高い配列におけるアッセイデザイン。赤字： 標的SNP, 橙字： 標的配列と一致しない塩基。
青字： Anchorに利用した塩基。



図4.2 コムギゲノムにおけるアッセイの設計。赤字： 標的SNP。青字： 標的近傍のSNP。
近傍のSNPをAnchoringに利用。

本ガイドへのご質問、テクニカルサポートはreagents@primetech.co.jpまでご連絡ください。



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 小石川大国ビル 2F

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

E-mail : reagents@primetech.co.jp

www.lgcgroup.com/genomics • genomics@lgcgroup.com

Science for a safer world

**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. 4357/CF/0515