

KASPトラブルシューティングガイド（簡易版）

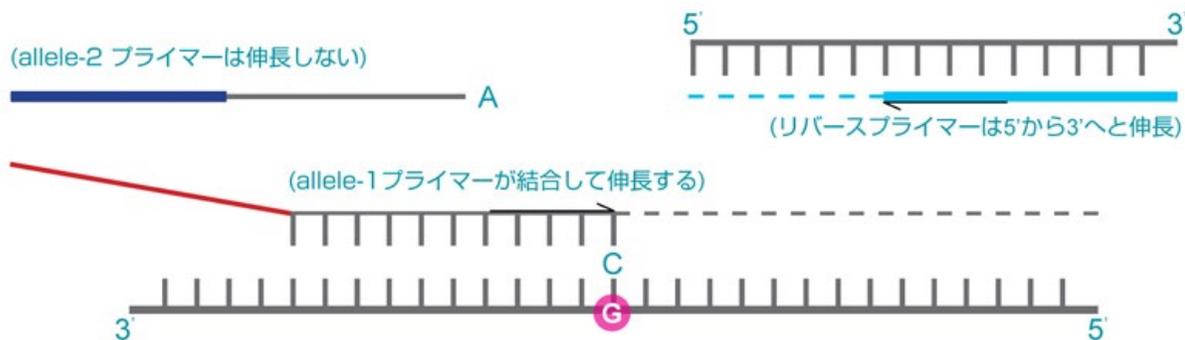
本ガイドは、KASPジェノタイピングアッセイが期待通りの結果が得られなかった場合に、よくある原因と解決法を原因別に、またプロット例で簡易的に示したものです。詳細は「KASPトラブルシューティングガイド」をご覧ください。

目次

1. KASPの原理
2. 期待されるプロット図
3. トラブルシューティングの手順
4. 結果不良の原因 - 共通の原因 -
5. 結果不良の原因 - アッセイ特有の原因 -
6. テクニカルサポート

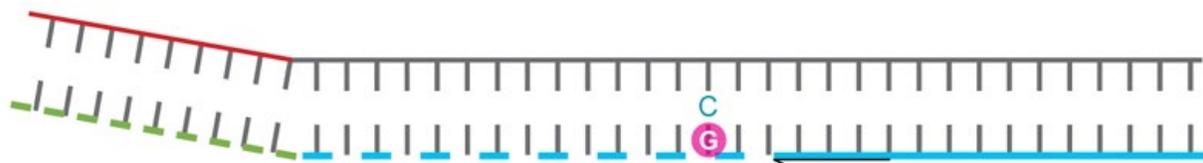
1. KASPの原理

1



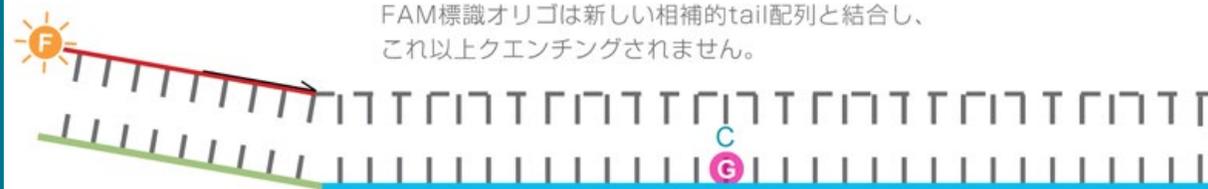
初回のPCRでは、対立遺伝子特異的なプライマーのうちの一方がターゲットSNPと一致し、共通のリバース・プライマーとともに、ターゲット領域を増幅します。

2



リバースプライマーが結合し、伸長して allele-1 tailの相補的コピーを生成します。

3

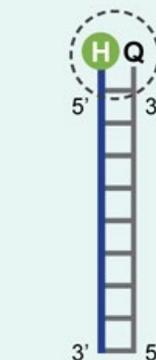


FAM標識オリゴは新しい相補的tail配列と結合し、これ以上クエンチングされません。

PCRの更なる回では、対立遺伝子特異的なtail濃度が増加します。FRETカセットの蛍光標識部分は新しいtail配列に相補的であるため結合し、蛍光シグナルを生成します。

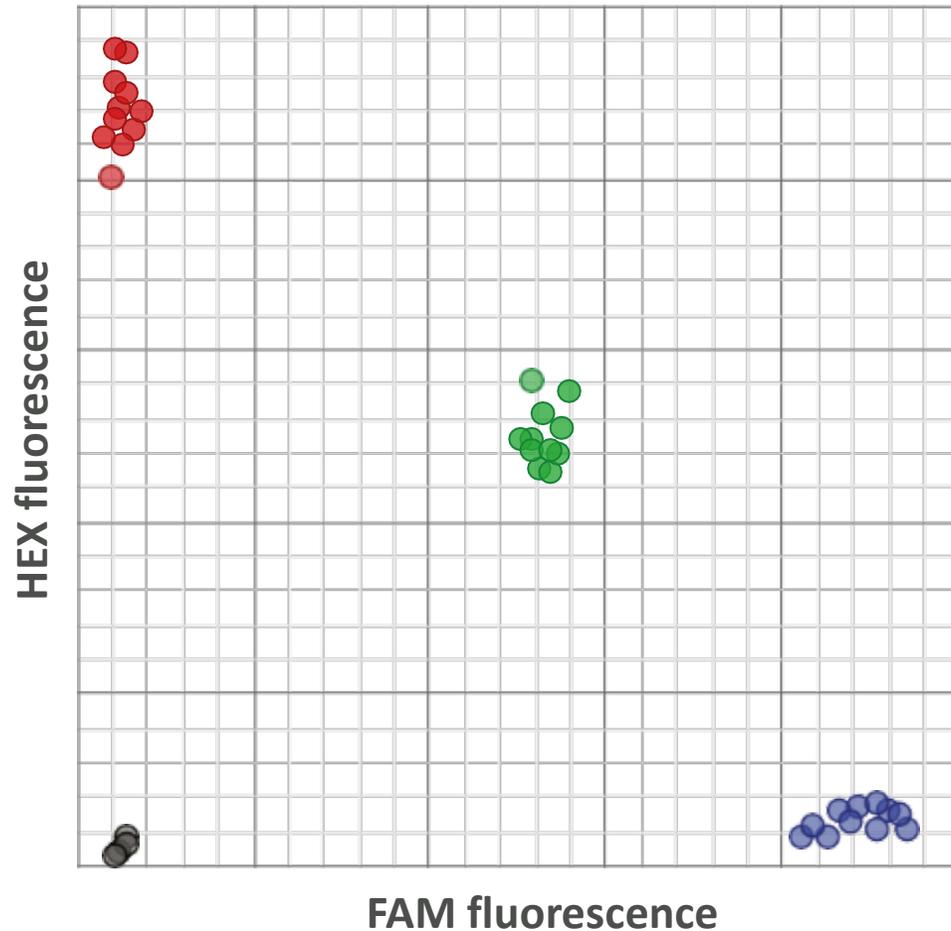


取り込まれたG対立遺伝子の蛍光は、これ以上クエンチングされない。



取り込まれなかったT対立遺伝子の蛍光は、クエンチングされたまま。

2. 期待されるプロット図



期待されるプロット図の条件：

- ▶ 各クラスターがまとまっている
- ▶ 各クラスターが均等に配置されている

- アレル-1 ホモ接合体
- ヘテロ接合体
- アレル-2 ホモ接合体
- テンプレートなしコントロール

3. トラブルシューティングの手順

結果不良の原因は、【共通の原因】と【アッセイ特有の原因】に分けられます



まず、【共通の原因】を検証し、結果が改善しない場合【アッセイ特有の原因】を検証してください

4. 結果不良の原因 – 共通の原因 –

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、調整しましたか？

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°Cでは1週間、-20°Cあるいは-80°C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。

4. 結果不良の原因 – 共通の原因 –

DNA : テンプレートDNAは品質・量ともに十分でしたか？

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量が多すぎるとPCR阻害物質の影響で増幅しづらくなり、DNA量が少なすぎるとPCR終了まで達するのにサイクル数の追加が必要となります。
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の量・品質が均一でなかった	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ので、均一化してください。

黄色背景 : 特によくある原因です。よくご確認ください。

4. 結果不良の原因 – 共通の原因 –

実験のセットアップ：全ての実験手順は正確でしたか？

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。
DNA・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。反応液量に関しては、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。

黄色背景：特によくある原因です。よくご確認ください。

4. 結果不良の原因 – 共通の原因 –

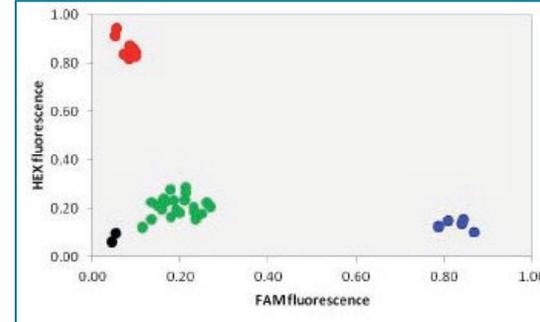
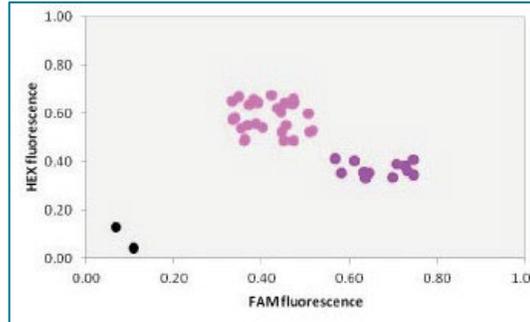
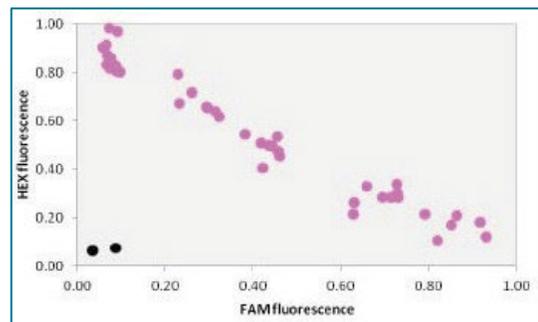
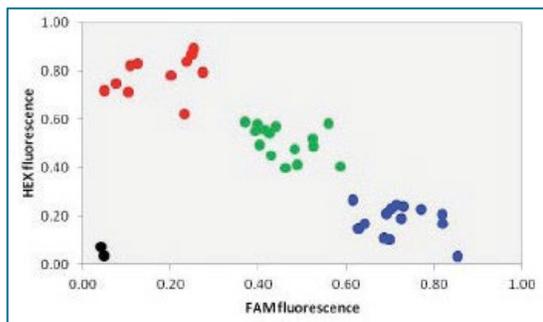
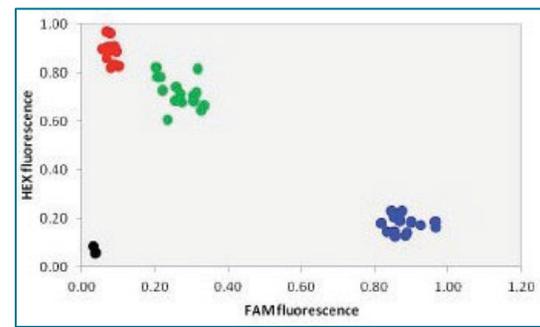
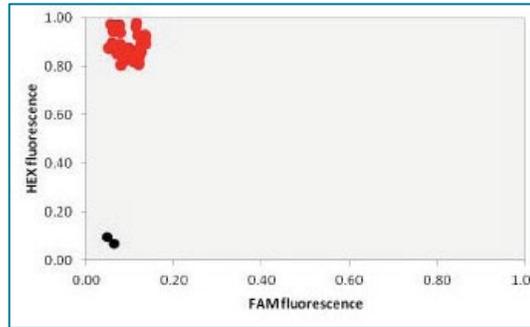
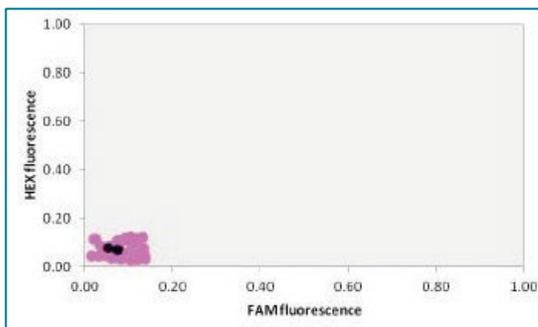
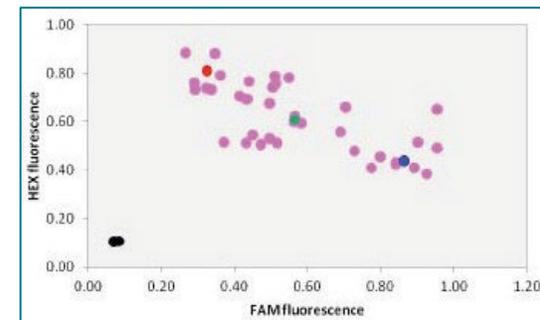
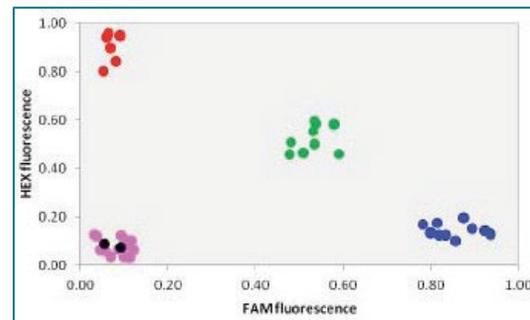
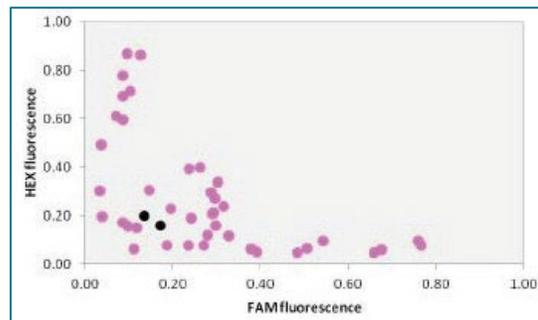
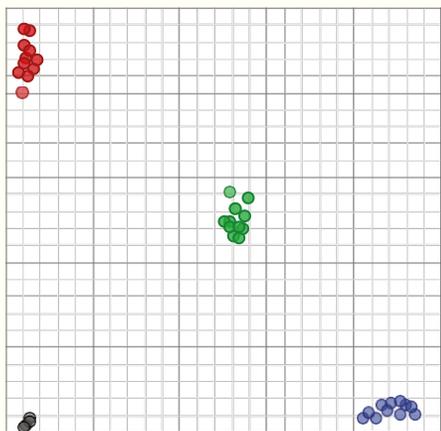
プレートの測定：プレートの測定は適切でしたか？

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。

改善しなかった場合、【アッセイ特有の原因】へ

どのプロット図に近いですか？ (各図から原因にリンクしています)

理想的プロット図



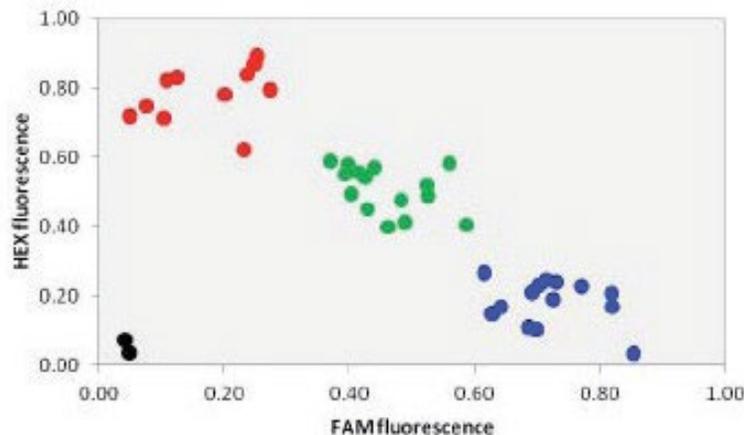
5. 結果不良の原因 – アッセイ特有の原因 –

増幅が不十分

増幅が遅いアッセイである可能性があります。
リサイクリング反応を行ってください。

▶プロット例

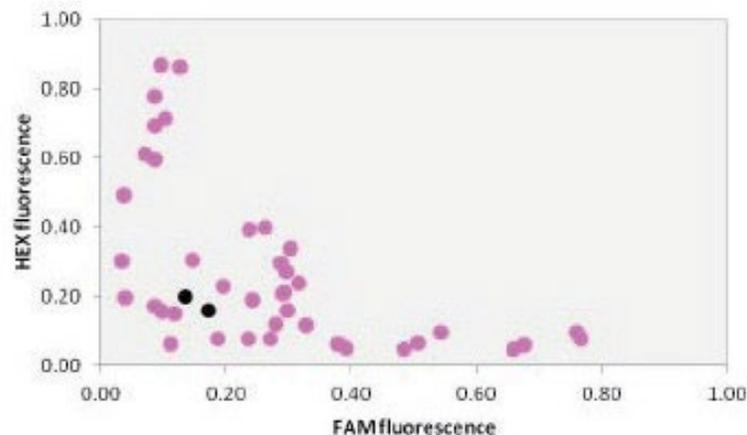
クラスターがまとまっていない



その他の原因

- DNAのコンタミネーション
- プライマーのGC含量*
- PCRサイクルが最適でない

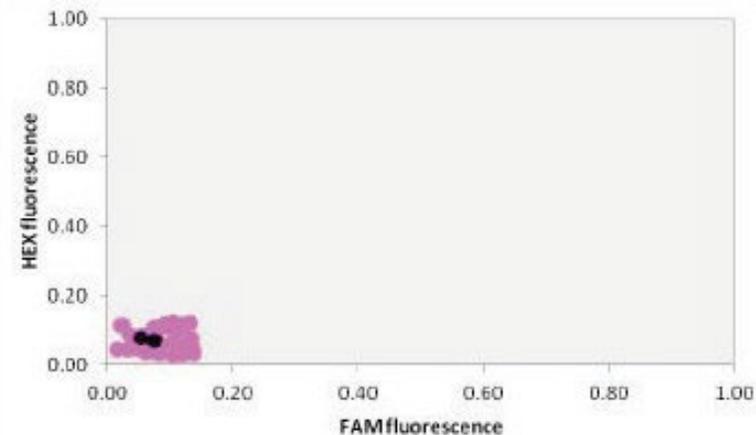
クラスターが形成されていない



その他の原因

- プライマーのGC含量*
- DNA溶液のEDTA含量が多い

増えていない



その他の原因

- ターゲットSNPが存在していない

*プライマーのGC含量: <30%, MgCl₂濃度を上げる / >70%, DMSOを加える

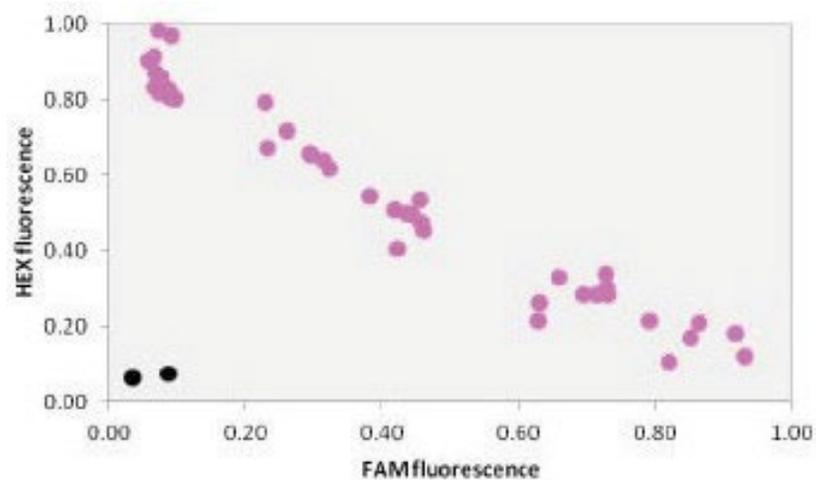
5. 結果不良の原因 – アッセイ特有の原因 –

プライマー結合部位の多型

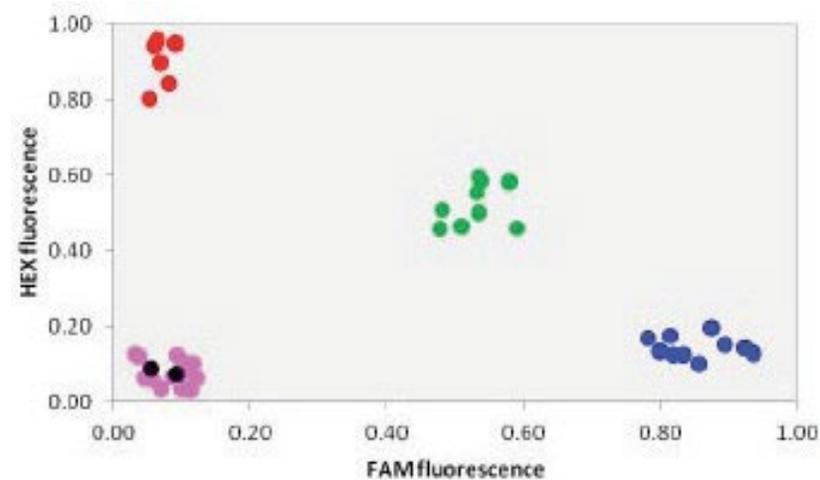
プライマー結合部位に多型が存在し、期待通り増幅できなかった可能性があります。多型を調査し、アッセイを再設計してください。

▶プロット例

クラスターが3つ以上あるように見える



いくつかのサンプルが増幅しない



その他の原因

- ・ターゲットSNPが存在していない

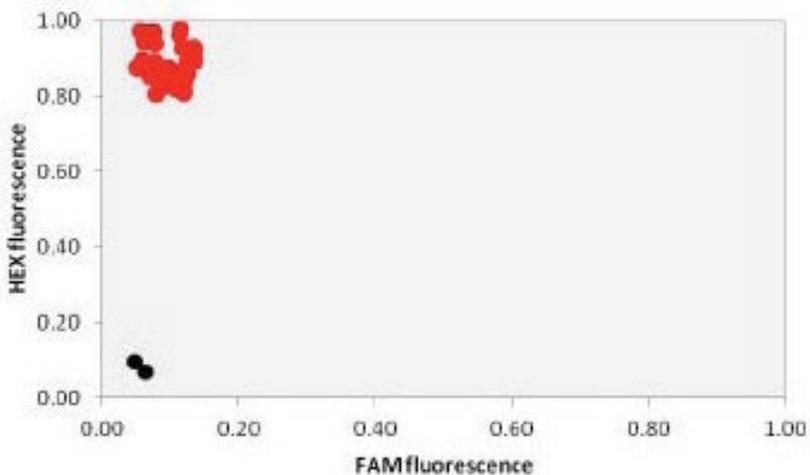
5. 結果不良の原因 – アッセイ特有の原因 –

相同性領域の影響

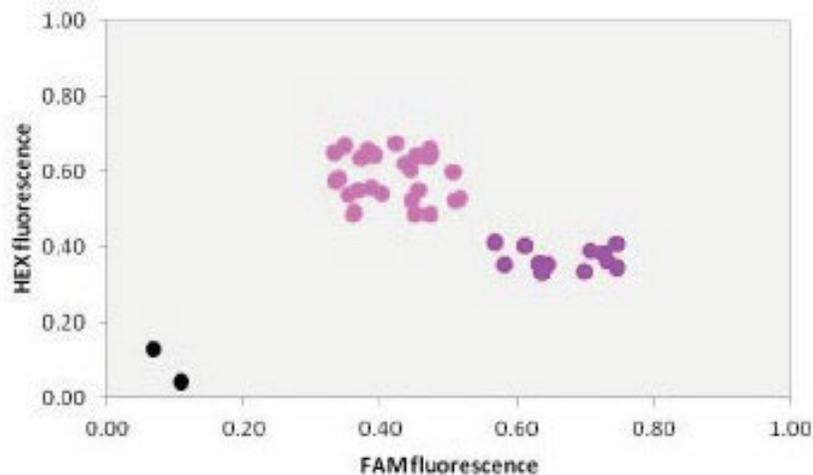
プライマーがターゲット以外に存在した相同領域にアニーリングし、ターゲット領域に特異的に結合できなかった可能性があります。アニーリング温度を上げるか、相同性領域を調査し、アッセイを再設計してください。

▶プロット例

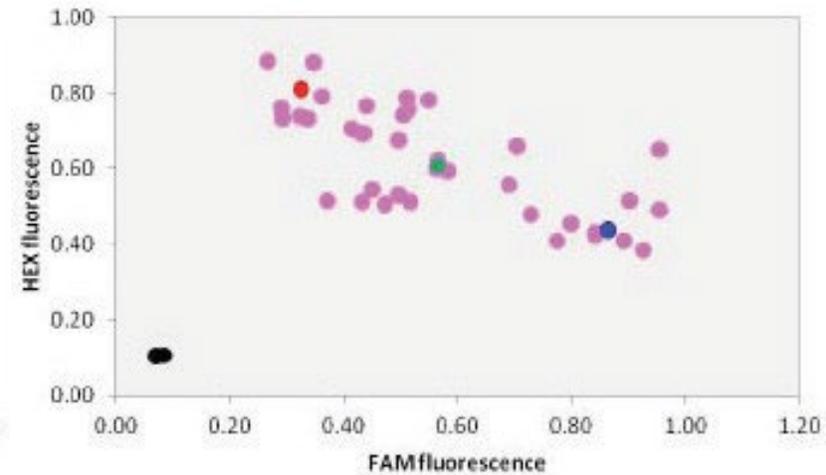
クラスターが予測より少ない



クラスターの位置が不適切



クラスターに分かれない



その他の原因

- ・解析した集団に当該アレルしか存在していなかった

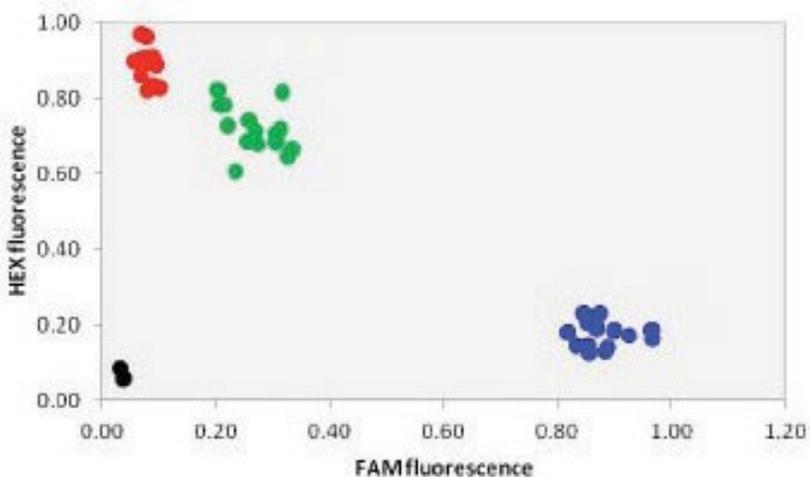
5. 結果不良の原因 – アッセイ特有の原因 –

プライマー設計の問題

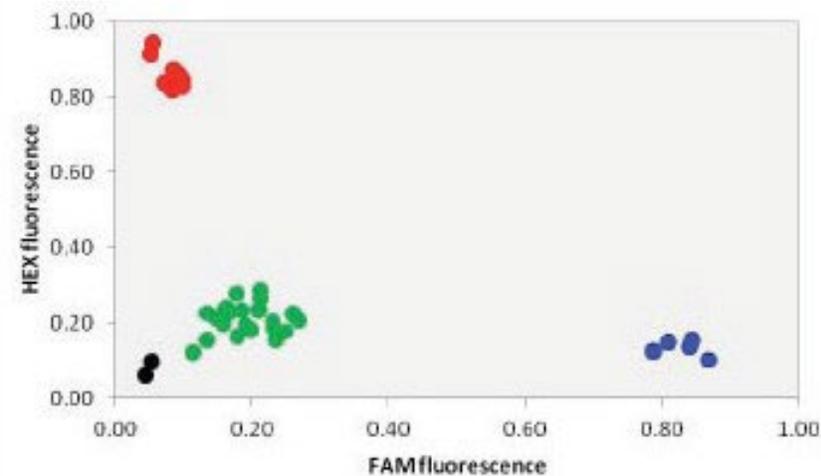
プライマー設計が最適でなかった可能性があります。
テクニカルサポートまでご連絡ください。

▶プロット例

クラスターの位置が均等でない



ヘテロアレルのみ原点近くにプロットされる



6. テクニカルサポート

簡易版ガイドで改善しなかった場合、「KASPトラブルシューティングガイド」をご覧くださいか、テクニカルサポート (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