

# ガイド

## KASPアッセイ設計

---

塩基配列情報提出の手引き

# ガイド

KASPアッセイ設計

## 内容

<a href="#">1. KASP 技術: 検出できる多型の種類</a>	3
<a href="#">2. 塩基配列情報提出のためのフォーマットガイドライン</a>	6
<a href="#">2.1 塩基配列情報</a>	6
<a href="#">3. 相同性配列</a>	8
<a href="#">4. 塩基配列情報の提出</a>	9

# ガイド

## KASPアッセイ設計

このガイドではKASP™アッセイの設計に必要な塩基配列情報の提出方法について説明します。KASPで検出できる様々な多型を塩基配列情報の提出方法（塩基配列提出フォームを使用）を例示しながら概説します。ターゲットである多型を正しく認識できるよう、提出する塩基配列情報はセクション2で説明するとおりフォーマットしてください。

### 1. KASP技術: 検出できる多型の種類

KASPアッセイは、下記の多型の検出に使用することができます。

- 一塩基多型 (Single nucleotide polymorphisms, SNPs)
- 挿入欠失 (Insertions or deletions, indels)
- 複数塩基の変異 (Multi-nucleotide variants, MNVs)
- ハプロタイプ

KASPアッセイの設計には、ターゲット多型の両側に最低50 bpの塩基配列が必要です。

使用していただくフォーマットを多型の種類ごとに以下に示します。

#### a. 一塩基多型 (Single nucleotide polymorphisms, SNPs)

KASPアッセイは、あらゆる生物における2つのアレルの一塩基多型（SNPs）を検出するために設計することができます。ターゲットのSNPは[角括弧]内に記載し、[allele1/allele2]または[IUPACコード]としてフォーマットしてください。

SNP ID例	塩基配列情報
SNP_alleles	GCTCTCTGTGTCTGATCCAAGAGGCGAGGCCAGTTTCATTTGAGCATTA [A/G] TGTC AAGTTCTGCACGCTATCATCATCAGGGGCCGAGGCTTCTCTTTGTT
SNP_IUPAC	GCTCTCTGTGTCTGATCCAAGAGGCGAGGCCAGTTTCATTTGAGCATTA [R] TGTC AAGTTCTGCACGCTATCATCATCAGGGGCCGAGGCTTCTCTTTGTT
rs12913832	GCTCTCTGTGTCTGATCCAAGAGGCGAGGCCAGTTTCATTTGAGCATTA [A/G] TGTC AAGTTCTGCACGCTATCATCATCAGGGGCCGAGGCTTCTCTTTGTT

図1. SNPでのKASPアッセイ設計のための塩基配列フォーマット例。最初の例では、ターゲットアレルは青緑とピンクで示されており、2番目ではオレンジのIUPACコード示されています。

RefSNP（rs）番号で識別されるSNPを提出する場合、塩基配列情報の記入は任意ですが、LGC Biosearch Technologiesでは、正確性を期すためにrs番号の他に塩基配列情報の提出も推奨しています。

# ガイド

## KASPアッセイ設計

### b. 挿入欠失 (indels)

KASPアッセイは、あらゆるサイズの挿入あるいは欠失 (indels) を検出するために設計することができます。1つ目のアレル特異的プライマーは、indel配列を組み込んで設計され、2つ目のアレル特異的プライマーは、indelを除いた同じターゲット配列に設計されます。リバープライマーは、indelのサイズが小さい場合 (26 bp以下) の場合、両アレルに存在する配列に共通のリバープライマーとして設計されます。Indelのサイズが大きい場合 (26 bp以上) は、両アレルに存在する配列に加えてindel配列にリバープライマーが設計されます。ターゲットの挿入配列は[角括弧]内に記載し、欠失はスラッシュ(/)で区切り、無記入あるいはダッシュ(-)でフォーマットしてください。

SNP ID例	塩基配列情報
1bp_indel	ATTGTCAATAATATGTGGAGGTCGTGTTGGTACAACATGATAGCATAAAG [A/] GTGATGATTAGTTTCCGTAATGCGTCCGCTGGGCTGATGGGCCTTCTGGA
1bp_indel_alt	ATTGTCAATAATATGTGGAGGTCGTGTTGGTACAACATGATAGCATAAAG [A/-] GTGA TGATTAGTTTCCGTAATGCGTCCGCTGGGCTGATGGGCCTTCTGGA
15bp_indel	ATTGTCAATAATATGTGGAGGTCGTGTTGGTACAACATGATAGCATAAAG [AGATCCATACATTTA/] GTGATGATTAGTTTCCGTAATGCGTCCGCTGGGCTGATGGGCCTTCTGGA
15bp_indel_alt	ATTGTCAATAATATGTGGAGGTCGTGTTGGTACAACATGATAGCATAAAG [AGATCCATACATTTA/-] GTGATGATTAGTTTCCGTAATGCGTCCGCTGGGCTGATGG GCCTTCTGGA

図2. IndelでのKASPアッセイ設計のための塩基配列フォーマット例。挿入型のアレルは青緑で示されています。ターゲットである挿入配列を[角括弧]内のスラッシュ(/)の前に記載してください。欠失型のアレルは2番目あるいは4番目の例のようにダッシュ(-)で記載することもできます。

KASPアッセイは、大きなindelの検出も可能です。配列がすべて同じDNA鎖上に存在すれば、indelのサイズに上限はありません。100 bpを超えるindelの場合、[角括弧]の中にindelの領域の最初と最後の50 bpの配列を記載し、残りのindelの配列が存在することを表すために中央にNを記載してください。

SNP ID例	塩基配列情報
Large_indel	ATTGTCAATAATATGTGGAGGTCGTGTTGGTACAACATGATAGCATAAAG [AGATCCATACATTTAAGTCGGTCAAATTATGGATCCTTCAAGATCTTAAGNGCCTTAA GGTAACTTGACTTAGTGCATAGGTGGAAGGGTTTATAGTAGCT/] GTGATGATTAGTTT CCGTAATGCGTCCGCTGGGCTGATGGGCCTTCTGGA

図3. 大きなindelでのKASPアッセイ設計のための塩基配列フォーマット例。[角括弧]の中にindelの最初と最後の50 bp (青緑) と、中央に残りの配列が存在することを示すN (紫) が記載されています。この例では欠失は無記入となっています。

# ガイド

## KASPアッセイ設計

### c. 複数塩基の変異 (MNVs)

KASPアッセイは、複数塩基の変異 (MNVs) を検出するために設計することができます。ターゲットのMNVは[角括弧]内に記載し、[allele1/allele2]としてフォーマットしてください。

SNP ID例	塩基配列情報
MNV	TGGGCAGCATTAGTAGAAGAAAGTACAAGACCGTGTGTAGAGGATACTCT [GATATACTTGAG/CAGTCC] AGCAGATAGCGTTGGATAGGCGACAGGATTATTGGAG CGCCGTCGAGAAC

図4. MNVでのKASPアッセイ設計のための塩基配列フォーマット例。ターゲットアレルは青緑とピンクで示されています。

どちらかあるいは両方のMNVアレルが100 bpを超える場合、[角括弧]の中にMNVの最初と最後の50 bpの配列を記載し、残りのMNV配列が存在することを表すために中央にNを記載してください。

SNP ID例	塩基配列情報
Large_MNV	TGGGCAGCATTAGTAGAAGAAAGTACAAGACCGTGTGTAGAGGATACTCT [GATATACTTGAGGTGTCAGTTGATGCTTGATATACTTGACGTTCTCTACANTGTGCGA GCTACGCCGATGGGCGGTCCACACGGAATTCAGAGGTGGGATT /CAGTCCGCAGCTAGGGGGGTGATGGTTCGCAAGAAATATACGGTCTATGNATGTAAC TTTATCATAAAGGTAGACACCAGTTATTGTTTCGGGTCGTAGA] AGCAGATAGCGTTGG ATAGGCGACAGGATTATTGGAGCGCCGTCGAGAAC

図5. 100 bpを超えるMNVでのKASPアッセイ設計のための塩基配列フォーマット例。ターゲットアレルは青緑とピンクで示されています。[角括弧]の中に最初と最後の50 bpと、中央に残りの配列が存在することを示すN(紫)が記載されています。

### d. ハプロタイプ

KASPアッセイは、あらゆるサイズのハプロタイプを検出するために設計することができます。ターゲットハプロタイプの塩基配列情報は、[allele1/allele2]としてフォーマットしてください。ハプロタイプを構成しているすべてのSNPは[角括弧]内に記載してください。ハプロタイプの一部とみなされない近傍のSNPは、角括弧の外側に配置し、適切なIUPACコードで記載してください。

SNP ID例	塩基配列情報
Haplotype	CAAACACCAAAGTGGTGAGTCGTGGTTACAACACGGGAGTTCAAACTG [TATCCGAATGACGAATGTTCAAGTCCTTAAC /CATCCGAATCAGCAATGTTCAAGTCCTTAAG] CATCATGAAATGAGTTTAGTTTGGG TGGCTCGTAAGTAGACATAAGGCAC

図6. ハプロタイプでのKASPアッセイ設計のための塩基配列フォーマット例。ターゲットアレルは青緑とピンクで示されています。

## 2. 塩基配列情報提出のためのフォーマットガイドライン

KASPアッセイ設計のための塩基配列情報は指定するSNP提出テンプレートを使用してください（セクション4参照）。

### SNP ID

アッセイを識別するための文字を記入します（アッセイ名）

- 最大20文字まで記入できます。
- 使用できるのは半角のアルファベット、数字とアンダーバーのみです。例. ABCD1234\_ab
- アッセイ名はハイフン(-)で始まらないようにしてください。

### 2.1 塩基配列情報

#### 塩基配列の方向

塩基配列は5' - 3'の方向で記入してください。

#### 大文字と小文字表記の塩基

塩基配列情報は大文字で記入してください(ATCG)。塩基配列情報が不確かな領域がある場合、小文字で表記して区別してください(atcg)。大文字と小文字は組み合わせることができます。

#### 角括弧を使用してターゲットSNPを指定する

ターゲットSNPサイトは角括弧で囲んで指定します。IUPACコード(例. [R])か、2つのアレルをスラッシュ(/)で区切ります(例. [A/G])。使用できる混合塩基のIUPACコードは下表1のとおりです。

記号	構成塩基
R	A or G
Y	C or T
M	A or C
K	G or T
S	C or G
W	A or T
N	A or C or G or T

表1. 混合塩基を表すIUPACコード

# ガイド

## KASPアッセイ設計

### 角括弧を使用してターゲットindelを指定する

ターゲットindelサイトは角括弧で囲んで指定します。

様々な大きさのindelの配列フォーマットの例として、4ページの図2、図3をご覧ください。

### ターゲット以外の周辺SNPとindel

ターゲット以外に周辺にSNPがある場合、IUPACコードで識別してください。この周辺SNPは角括弧で囲まないでください。また、周辺SNPはNと表記しないでください。

ターゲット以外に周辺にindelがある場合、Nで識別してください。この周辺indelは角括弧で囲まないでください。

### 避ける塩基

KASPアッセイの設計から避けるべき領域がある場合、これらの塩基をNに置き換えてください。

### 使用可能な塩基配列情報提出フォーマット

使用可能な塩基配列 情報提出フォーマット	例
[First allele/second allele]	ATAACTACTTTTAAAGGCACATTATTCAACCTCACTGTGCATTTTCATCCTC [A/T] TGCATA ATGACAGTTATTCTCTCCCAAGTCTCCTTCTGGGACAGTTAAAG
IUPAC code	ATAACTACTTTTAAAGGCACATTATTCAACCTCACTGTGCATTTTCATCCTC [W] TGCATAA TGACAGTTATTCTCTCCCAAGTCTCCTTCTGGGACAGTTAAAG
Rs Number	rs123456* * RefSNP (rs) 番号で識別されるSNPを提出する場合、塩基配列情報の記入は任意ですが、正確性を期すためにrs番号の他に塩基配列情報の提出も推奨しています。
indels	ATAACTACTTTTAAAGGCACATTATTCAACCTCACTGTGCATTTTCATCCTC [/T] TGCATAAT GACAGTTATTCTCTCCCAAGTCTCCTTCTGGGACAGTTAAAG

# ガイド

## KASPアッセイ設計

### 誤った塩基配列情報提出フォーマット

誤った塩基配列情報提出フォーマット	例
ターゲットが角括弧で指定されることなく、いくつかのIUPACコードが記載されている	ATAACTACTTTTAAAGGCACATTATSCAAACCTCAYYTGCATTTCATCCTCWTGCATAAT GACAGTT <sup>R</sup> TTCTCTCCCAAGTCTCC <sup>WW</sup> CTGGCACAGTTAAAG
周辺配列が不足している (ターゲットの両側が50塩基未満)	CACTGTGCATTTCATCCTC [A/T] TGCATAATGACAGTTATTCTCT
ターゲット以外の周辺SNPが 角括弧で囲われている	ATAACTACTTT [T/G] AAAGGCACATTATT [C/G] AACCTCACTGTGCATTTCATCCTC [A/T] TGCATAATGACAGTTATTCTCTCCCA [A/C] GTCTCCTTCTGGGACAGTTAAAG

### 特別な設計要件

特別な設計要件	例	設計
周辺の多型 - 角括弧なしに IUPACコードで識別 されている	ATAACTACTTTT <sup>K</sup> AAAGGCACATTATT <sup>S</sup> AACCTCACTGTGCATTTCATCCTC [A/T] TGCATAATGACAGTTATTCTCTCCCA <sup>M</sup> GTCTCCTTCTGGGACAGTTAAAG	プライマー設計ソフトは、プライマー設計時に周辺のSNPを考慮します。
避ける塩基 - Nで識別されている	ATAACTACTTTTAAAGGCACAMTATTCAACCTCACTGTG CATTTNATCC <sup>NN</sup> [A/T] TGCATAATGACAGTTATTCTCTCCCA AAGTCTCCTTCTGG	プライマー設計ソフトは、Nで指定された塩基を回避して設計します。
不確かな塩基 - 小文字で識別 されている	ATAACTACTTTTAAAGGCACATTATTCAACCTCA <sup>ctgtgcat</sup> <sup>ttcatcct</sup> C [A/T] TGCATAATGACAGTTATTCTCTCCCAAGTCT CCTTCTGG	プライマー設計ソフトは、小文字の塩基を回避して設計する可能性があります。

### 3. 相同性配列

KASPアッセイは、提出された塩基配列情報のみから設計が行われます。BLAST検索などで提出する塩基配列に相同性領域がないか確認してください。ターゲット領域に相同性領域がある場合、その領域でのKASPアッセイの設計は避けたほうが良いですが、避けられない場合、アンカリング法によってターゲットの特異性を高められる可能性があります。アンカリングについては[アンカリングアッセイのガイド](#)をご覧ください。



# ガイド

## KASPアッセイ設計

### 4. 塩基配列情報の提出

KASPアッセイ設計のための塩基配列情報は、指定する塩基配列提出フォーム（エクセルファイル）で提出してください。塩基配列提出フォームは[こちら](#)からダウンロードできます。

#### ジェノタイピングサービスをご利用の場合

塩基配列提出フォームにご記入のうえ、電子メールにて[reagents@primetech.co.jp](mailto:reagents@primetech.co.jp)までご送付ください。

#### ご自身のラボでアッセイを行う場合

塩基配列提出フォームにご記入のうえ、電子メールにて[reagents@primetech.co.jp](mailto:reagents@primetech.co.jp)までご送付ください。

KASPアッセイをご自身のラボで行うには、KASPアッセイミックスとKASPマスターミックスの両方が必要です。KASPマスターミックスにはROX濃度が異なる3種類の製品がございます（Low, Standard, High ROX）。これらの違いはROXの濃度のみで、他のコンポーネントは同一です。ご使用のリアルタイムPCR装置あるいはプレートリーダーに適したKASPマスターミックスの種類は[こちら](#)からご確認いただけます。ご使用の装置がリストにない場合、[reagents@primetech.co.jp](mailto:reagents@primetech.co.jp)までお問い合わせください。

本製品は研究用です。診断用には使用しないでください。




 @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, 2022. All rights reserved. GEN/1041/SW/0622*



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

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