

ガイド

?5 GDアッセイ設計 - アンカリング

塩基配列情報提出の手引き

内容

[%イントロダクション](#). '.....

[&"アンカリングの仕組み](#) '.....

[' "アンカリングアッセイの利点](#) '.....(

[\("アンカリング用塩基配列情報の提出方法](#) '.....(

[\)"例](#) '.....)

[* "リンク](#) '.....!!.....+

ガイド

KASPアッセイ設計 - アンカリング

1. イントロダクション

アンカリングはKASP™アッセイ設計において、相同性の高い配列を区別するための特別なアプローチで、アッセイのためのプライマーを設計する際に、ターゲットの配列にのみ存在し、ゲノム上に存在する相同配列に存在しない塩基を使用するように設計します。このような塩基が同定されれば、アッセイをターゲット領域に固定する「アンカー」として使用することができます。

2. アンカリングの仕組み

標準のKASPアッセイは、2つのアレル特異的フォワードプライマーと共通のリバースプライマー、計3つのプライマーを使用します。2つのアレル特異的フォワードプライマーの違いは3'末端のみで、各プライマーは遺伝子型を決定する異なる対立遺伝子の1つに特異的です。アレル特異的フォワードプライマーは、反応終了後に測定される蛍光シグナルを生み出すために使用されます。

アンカリングを使用しない標準のアッセイでは、リバースプライマーはPCR反応を行うためだけのものですが、アンカリングではリバースプライマーをもう一つの用途で使います。アンカリングはターゲットSNPあるいはindel（ターゲット多型）の周囲に、ターゲット配列に特異的な1以上の塩基が必要です。この特異的な塩基はターゲット多型の70 bp以内に存在しなければなりません。特異的な塩基を「アンカーポイント」として使用することで、ターゲット領域のみに特異的なアッセイを行うことができます。アンカリングでは、リバースプライマーの3'末端がターゲット領域特異的塩基になるようにして設計します（アンカーする）。従って、アンカリングでは、アンカリングポイントを含む領域が優先的に増幅されます。

リバースプライマーによるアンカリングは、アレル特異的フォワードプライマーの機能と同様で、3'末端に正しい相補的塩基を持つプライマーが優先的にアニーリングし、伸長します。Taqポリメラーゼ複合体は、プライマーの3'末端から伸長を開始するので、アレル特異的フォワードプライマーとアンカーされたリバースプライマーの3'末端は、PCR反応の特異性に重要な役割を持ちます。プライマーの3'末端にミスマッチあるいは非相補的配列があるとPCR反応が停滞します。

ガイド

KASPアッセイ設計 - アンカリング

3. アンカリングアッセイの利点

アンカリングによりKASPアッセイは、ターゲット多型周囲の配列と相同性の高い複数のDNA配列を含むことが知られているDNAサンプル中のターゲット多型の遺伝子型を決定することができます。

アンカリングを行わないと、相同性の高い配列は反応の特異性に悪影響を及ぼし、正常にジェノタイピングできなかったり、ジェノタイピングクラスターが分離できない可能性があります。

アンカリングアッセイが最も有効な2つのケース

- 相同性 – KASPアッセイのターゲット配列がゲノム内で単一でなく、ターゲット配列と相同性の高い配列が同じゲノム内に存在する場合、KASPアッセイのアンカリングを推奨します。
- 倍数性ゲノム - 異質倍数体（2種以上の異なる祖先由来のゲノムで構成される倍数体）のジェノタイピングにおいて、KASPアッセイのアンカリングは有効です。オーソログ配列が複数ゲノムに1以上存在し、ターゲット配列が複数ゲノムで単一でない場合、一般的にアンカリングを用いることができます。

4. アンカリング用塩基配列情報の提出方法

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。アンカーポイントとして使用したい塩基は<山括弧>で囲んでください。

SNP ID例	塩基配列情報
Example01	ATAACTACTTTTAAAGGCACATTATTCAACCTCACT<G>TTTCATCCTC [A/T] CATAATGACAGTTATTCTCTCCCAAGTCTCCTTCTGGGACAGTTAAAG

図1. Example of a sequence entered into Biosearch Technologies' SNP submission form. ターゲットSNP (ピンクで表示) は[角括弧]で、アンカーポイント (青緑で表示) は<山括弧>で囲ってください。

塩基配列情報提出のための詳しいフォーマットは、[KASPアッセイ設計ガイド](#)のセクション2をご覧ください。

アンカーポイントは、ターゲット多型にできるだけ近づけると、より効果的です。ターゲット多型から70 bp以上離れたアンカーポイントを持つ配列は提出しないでください。これらの配列は、堅牢なKASPアッセイを設計するには多型から離れすぎているため、KASPアッセイ設計ソフトウェアでは無視されることになります。

ガイド

KASPアッセイ設計 - アンカリング

5. 例

例 1 – 相同性

ターゲット多型周囲の配列と相同性の高い配列が同じゲノム内に存在する場合、アンカリングを用いてターゲット配列に特異的にKASPアッセイを設計することができます。例を以下に示します (図2)。

例	
SNP@Chr6:6638363	AACATGGCGTCCGGGGGTAAGATAAGACC K AACCGTAA G TACCCACTGCAGCCAAGAGTT
Chr3:54828053	TGGCGTCCGGGGGTA T GATAAGACCTAACCGTAA A TACC G ACTGCAGCCAAGAGTT
Chr6:3395586	CATGGCGTCC T GGGGTAAGATAAGACCTAACCGTAA A TACC G ACTGCA
Chr14:14221507	GGTA T GATAAGACCTAACCGTAA A TACCCACTGCAGCC CA AGCAAT
Chr11:2891379	CCGGGGGTA T GATAAGACCTAACCGTAA A TACC G ACTGCA
Chr7: 67545571	GGGGGTAAGATAAG G CCTAACCGTAA A TAC

図2. ターゲットSNPおよびその周辺配列と相同性を示す配列のアライメントの例。ターゲットSNPはピンク、アンカーポイントは青緑、ターゲット配列と一致しない塩基はオレンジで示しています。

上のアラインメント (図2) において、一番上の配列はターゲットSNPとその周辺配列です。下の配列は、ゲノムの他の場所にある相同性配列と、アンカーポイントとして使用できるターゲット配列のユニークな塩基を示しています。

この配列でアンカリングKASPアッセイを設計するには、塩基配列提出フォームに以下のように記載する必要があります (図3)。

SNP ID例	塩基配列情報
Example02	AAACATGGCGTCCGGGGGTAAGATAAGACC [T/G] AACCGTAA<G>TACCCACTGCAGCCAAGAGTT

図3. 図2のターゲットSNP配列は、[ターゲットSNP]と<アンカーポイント>の両方が正しく指定され、塩基配列提出フォームに記載されています。

例 2 – 倍数性ゲノム

多倍体ゲノムを持つ生物のジェノタイピングを行う場合、アンカリングを使用することで特定の単一のターゲットゲノムでKASPアッセイを行うことができます。これを次の例で示します (図4)。

例	
Chr4D	CCGTTAGGGTCGCGTCCT C ACTCAGCGG S GGTCCAAATTGGAGTCGGTTTGATCGCAAGG
Chr4A	CCGTTAGGGTCGCGTCCTAACTCAGCGGGGTCCAAATTGGAGTCGGTTTGATCGCAAGG
Chr4B	CCGTTAGGGTCGCGTCCTAACTCAGCGG S GGT C TAAATTGGAGTCGGTTTGATCGCAAGG

図4. 3つのゲノム (A, B, D) を持つ倍数体生物のアライメント例。一番上と一番下の配列に存在するSNPは、IUPACコード"S"で示されています。

ガイド

KASPアッセイ設計 - アンカリング

この例（図4）では、3つのゲノム（A、B、D）を示しています。DゲノムとBゲノムの両方にSNPが存在します。この例では、アンカリングを使用して、DまたはBゲノムをターゲットとするKASPアッセイを設計することができます。

この配列でアンカリングKASPアッセイを設計するには、塩基配列提出フォームに以下のように記載する必要があります（図5）。各アンカーは単一のゲノムにのみ特異的であるため、ゲノム特異的なアッセイが必要な場合は、下記（図5）に示すように、配列を別々の行で提出する必要があることにご留意ください。

SNP ID例	塩基配列情報
D-genomeSNP	CCGTTAGGGTCGCGTCCT<C>ACTCAGCGG[C/G]GGTCCAAATTGGAGTCGGTT TGATCGCAAGG
B-genomeSNP	CCGTTAGGGTCGCGTCCTAACTCAGCGG[C/G]GGTC<T>AAATTGGAGTCGGTT TGATCGCAAGG

図5. 図4のターゲットSNP配列は、[ターゲットSNP]と<アンカーポイント>の両方が正しく指定され、塩基配列提出フォームに記載されています。

例 3 – 複数のアンカーポイント

ターゲット多型の周辺配列に複数のアンカリング可能な部位がある場合、それらをすべて提出する配列に含めることが可能です。これを次の例で示します（図6）。

例	
	<div>Anchor</div> <div>Anchor</div> <div>Anchor</div>
SNP@Chr9:5358261	AAGCTGCTTAGGTTTGTAGTAGGCGGTAGACGWTGCCAGCAAAGGTAGAGATCGATAGAATT
Chr2:17765942	AAGCTGCTAGATTTTGTAGGCGGTAGACGATGCCAGCAAAGGTGGAGATCCATAGAATT
Chr5:20581366	AAGCTGCTAGATTTGTAGTAGACGGTAGACGATGCCAGCAAAGGTGGAGATCCATACAATT

図6. ターゲットSNPおよびその周辺配列と相同性を示す配列のアライメント例。この例では、複数のアンカーポイントがあります。

複数のアンカーポイントを持つ配列を提出する場合、すべてのアンカーポイントを"<"と">"で囲む必要があります。アンカーポイントが複数の連続した塩基で構成されている場合は、最初の塩基の前に"<"、最後の塩基の後に">"を追加し、アンカーポイント全体が"<"と">"に囲まれるようにします。KASPアッセイ設計ソフトウェアは、提出された配列から特定されるすべてのアンカーから最適なアンカーを使用します。

この配列でアンカリングKASPアッセイを設計するには、塩基配列提出フォームに以下のように記載する必要があります（図6）。

SNP ID例	塩基配列情報
Example03	AAGCTGCT<TAGG>TTTGTAGTAGGCGGTAGACG[A/T]TGCCAGCAAAGGT<A>GAG ATC<G>ATAGAATT

図7. 図6のターゲットSNP配列は、[ターゲットSNP]と複数の<アンカーポイント>の両方が正しく指定され、塩基配列提出フォームに記載されています。

ガイド

KASPアッセイ設計 - アンカリング

6. リンク

[塩基配列提出フォーム](#)

KASPアッセイ設計のための塩基配列情報は、こちらのフォーム（エクセルファイル）にご記入のうえで、電子メールにてreagents@primetech.co.jpまでご送付ください。

[KASPアッセイ設計ガイド](#)

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のガイドです。

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](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, 2022. All rights reserved. GEN/1051/SW/0822



お問い合わせ：
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

BIOSEARCH™
TECHNOLOGIES
 GENOMIC ANALYSIS BY LGC