

KASP技术介绍及应用分析

刘雨佳

LGC技术支持

BIOSEARCH™
TECHNOLOGIES
GENOMIC ANALYSIS BY LGC



全球影响力



业务运营于
18
COUNTRIES

LGC的产品和服务
涵盖
180
COUNTRIES

LGC-临床诊断与基因组学部



产品类别

- DNA 核酸抽提
- 基因分型的试剂
- 高通量自动化仪器
- 核酸抽提和基因分型的服务

分布情况

- 9个生产部门在英国, 德国, 丹麦和美国
- 3个服务实验室在英国, 德国和美国
- 2014年开始LGC中国基因组部的销售

LGC-KASP 技术优势

LGC是KASP技术的开创者。21年来，KASP一直是基于PCR的基因分型的黄金标准。KASP已被用于开发超过280,000个单核苷酸多态性（SNP）基因分型检测方法，涉及75多种生物。

- **高准确性:** 达到99.8% 检测准确率
- **成本低:** a. 不需要昂贵的标记过的特异性引物或探针 b. 与粗提取的DNA方法兼容 c. 低反应体积。
- **引物设计灵活:** 单核苷酸多态性（SNP）、插入/缺失（indel）或大片段插入/缺失（mega indel）三种引物组合都可实现。

— **A** — or — **G** — ?

— **A** — or — - — ?

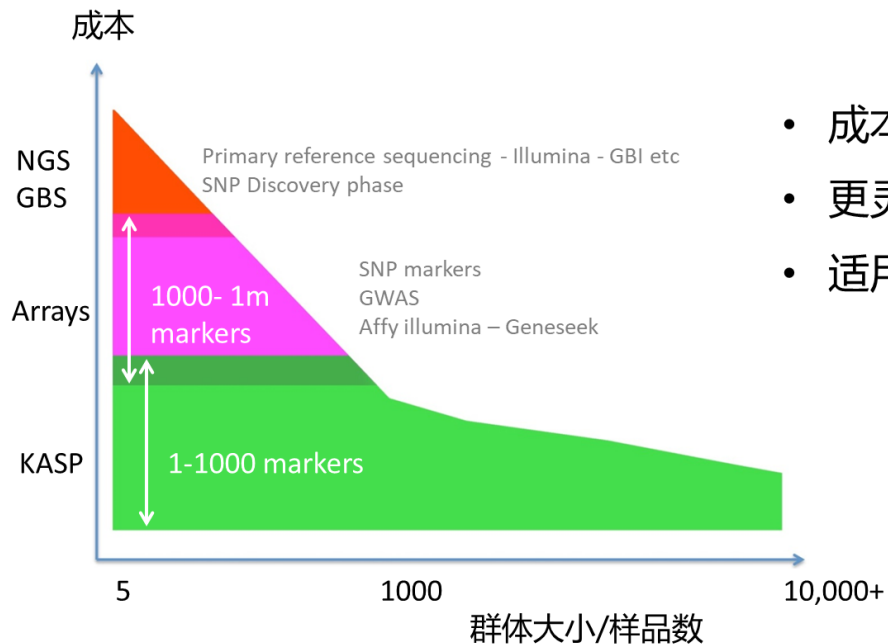
— **AA** — or — **AGCTGGTCA** — ?

— **AA** — to — **A** - - - - - **A** — ?
n = 26 – 200,000 bases

Agenda

- SNP基因分型技术介绍及应用
- 应用方向
- 如何提升SNP基因分型成功率
- 案例分析
- 我们是否可以帮到您？

KASP技术优势



- 成本低
- 更灵活
- 适用于大群体

SNP 研究技术路线

发现SNP

- **测序**：基于NGS技术，对多个样本进行重测序，与参考序列比对发现SNP位点

筛选SNP

- **芯片**：基于芯片技术对少量样本进行全基因组扫描，筛选与特定性状关联的基因

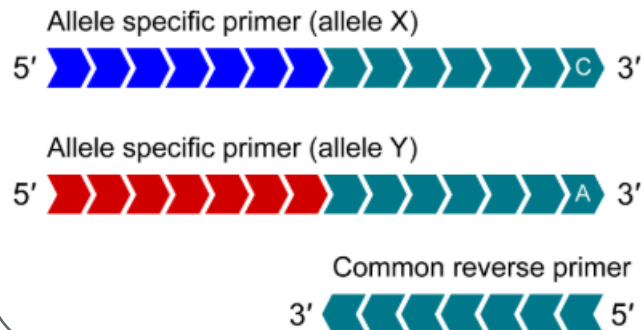
验证SNP

- **验证及检测**：通过KASP单位点，单样本检测技术对筛选出的少量SNP进行大量群体的验证，有效的位点可以用于检测工作

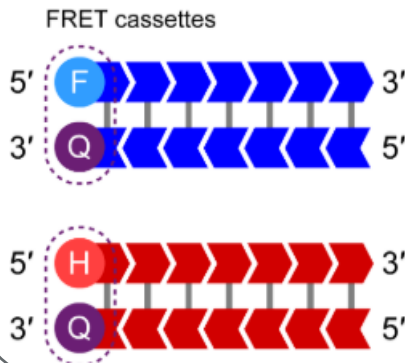
KASP 技术介绍

KASP™，即竞争性等位基因特异性聚合酶链式反应。能够对单核苷酸多态性（SNPs）和插入/缺失（indels）在特定基因座进行高度准确的双等位基因检测。主要组分如下：

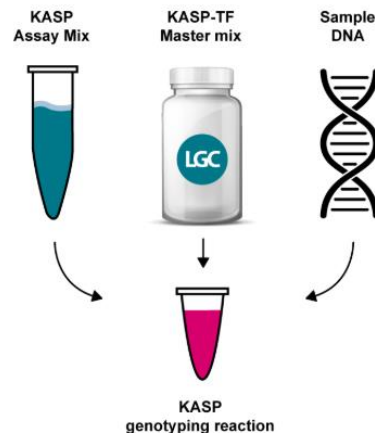
A. Assay Mix 引物



B. Master Mix

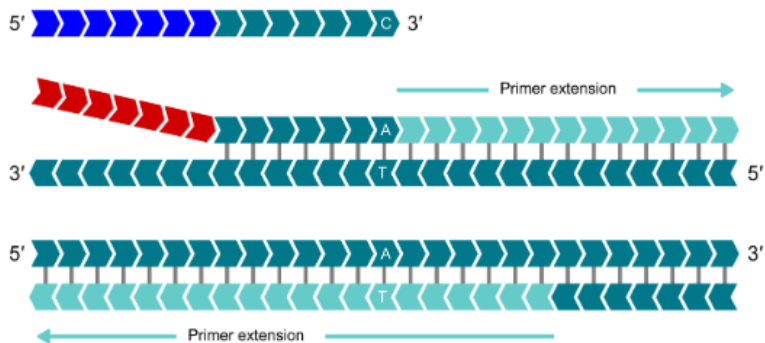


C. DNA模板



KASP 工作原理

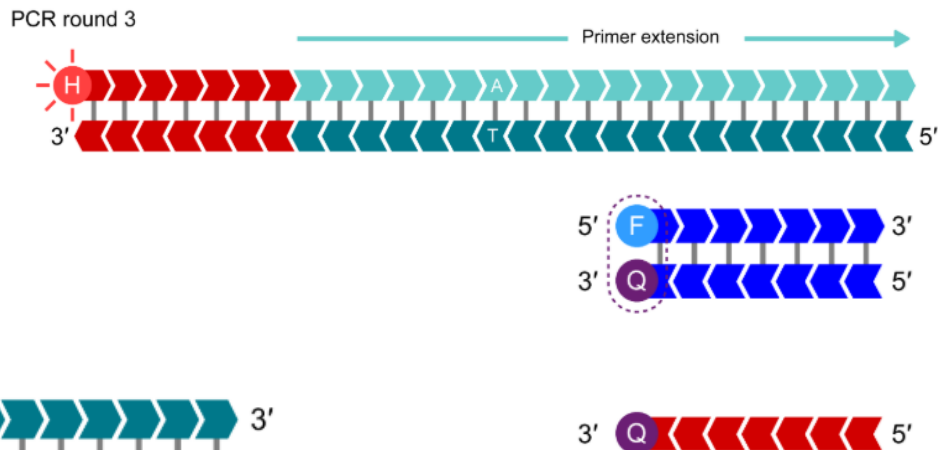
1) 第1轮PCR: 模板变性和竞争性配对



2) 第2轮PCR: 等位基因特异性接头序列补充



3) 第3轮PCR: 荧光信号产生



KASP[™] genotyping assay

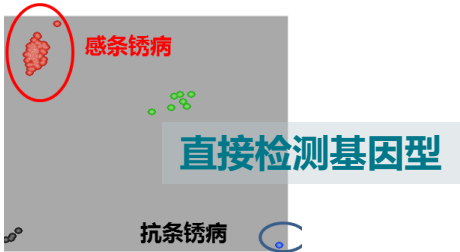
How it works



应用方向

分子标记辅助选择

隆平高科 水稻分子标记开发



基因类别	基因名称
抗稻瘟病	<i>Pigm</i> , <i>Pi2</i> , <i>Pita</i> , <i>Pil</i> , <i>Piz</i> , <i>Pi9</i> , <i>Piz-t</i> , <i>Pi35</i> , <i>Pi36</i> , <i>Pit</i> , <i>Pib</i> , <i>Pi13</i> , <i>Pii</i> , <i>Pi3</i> , <i>Pia</i> , <i>Pi20</i> , <i>Bsr-dl</i>
抗褐飞虱	<i>Bph3</i> , <i>Bph15</i> , <i>Bph6</i> , <i>Bph9</i> , <i>Bph14</i> , <i>Bph30</i>
抗白叶枯病	<i>Xa4</i> , <i>xa5</i> , <i>Xa7</i> , <i>Xa21</i> , <i>Xa23</i>
稻米品质	<i>Wx-a/b</i> , <i>Wx-mq/mp</i> , <i>Wx-mq</i> , <i>Wx-in</i> , <i>Wx-op/hp</i> , <i>Wx-GBSSI</i> , <i>fgr</i> , <i>alk</i>
其他性状	<i>Sub1</i> , <i>Pup1</i> , <i>tms5</i> , <i>pms3</i> , <i>GS3</i> , <i>GW8</i> , <i>OsNR2</i>

分子标记辅助选择

舜丰生物基因编辑大豆

(19) 国家知识产权局



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118374635 A

(43) 申请公布日 2024. 07. 23

(21) 申请号 202410816417.9

(22) 申请日 2024. 06. 24

(66) 本国优先权数据

202311534563.4 2023.11.17 CN

(71) 申请人 舜丰生物科技(海南)有限公司

地址 572025 海南省三亚市崖州区崖州湾

科技城用友产业园1号楼4楼429-3号

申请人 山东舜丰生物科技有限公司

(72) 发明人 李峰 高晓凯 刘帅 苗伟

谢秀菊

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6895 (2018.01)

C12Q 1/6858 (2018.01)

C12N 15/11 (2006.01)

权利要求书1页 说明书9页
序列表(电子公布) 附图43页

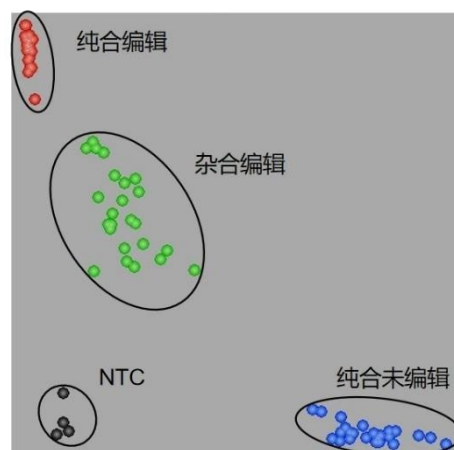
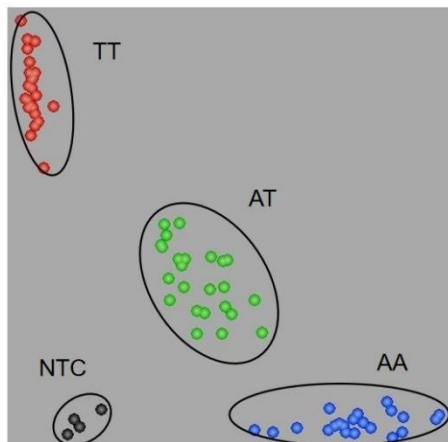
(54) 发明名称

基于KASP技术检测基因编辑大豆的引物和

方法

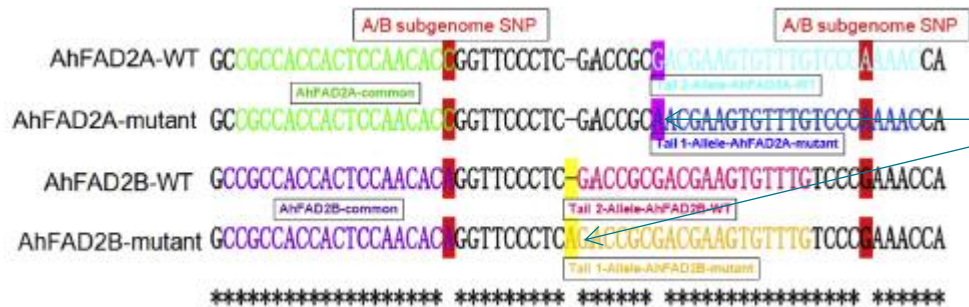
高油酸大豆检测

对基因编辑大豆的GmFAD2-1A和GmFAD2-1B基因特定突变位点, 设计KASP引物在野生型及基因编辑大豆群体中进行验证。

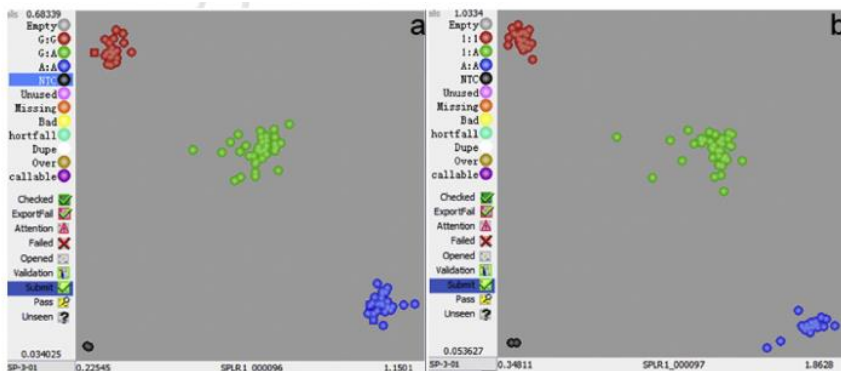


分子标记辅助选择

山东农科院 高油酸花生检测



高油酸花生



来自A、B亚组的两个同源基因AhFAD2A和AhFAD2B编码 $\Delta 12$ 脂肪酸脱氢酶(FDA)，该酶可以将油酸转化为亚油酸。

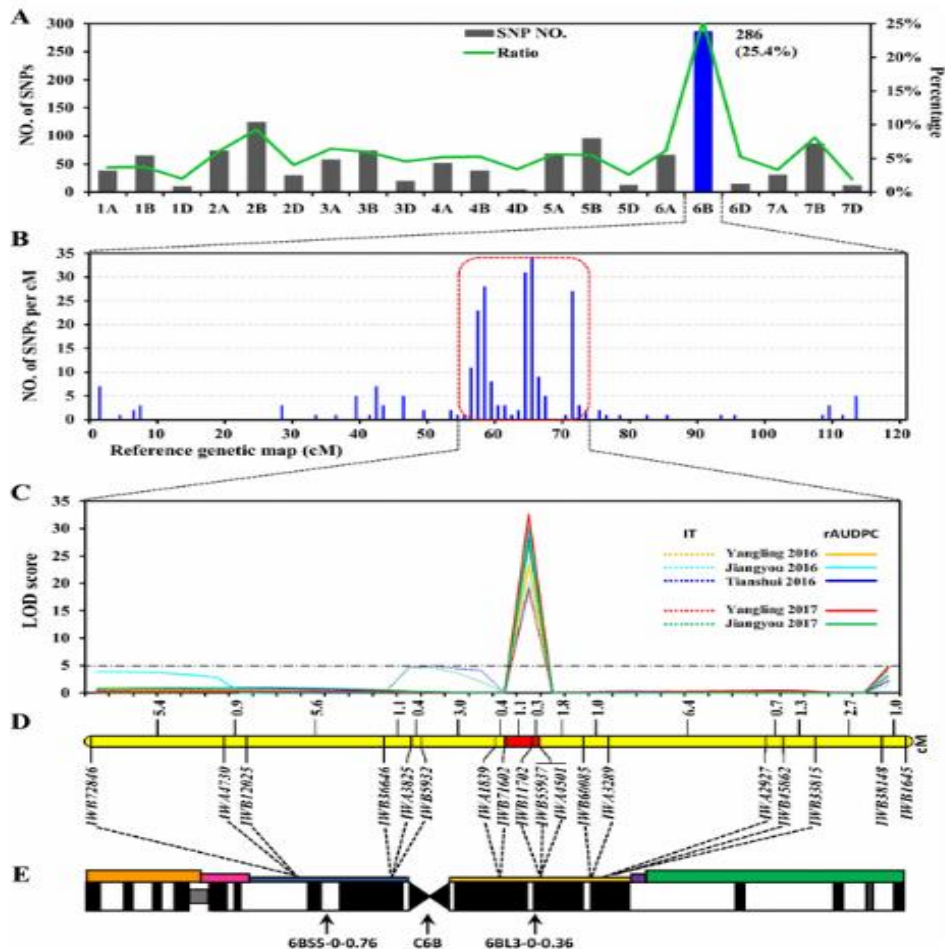
基因定位

西北农林科技大学

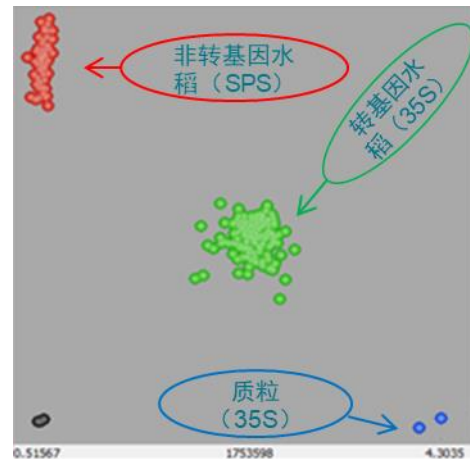
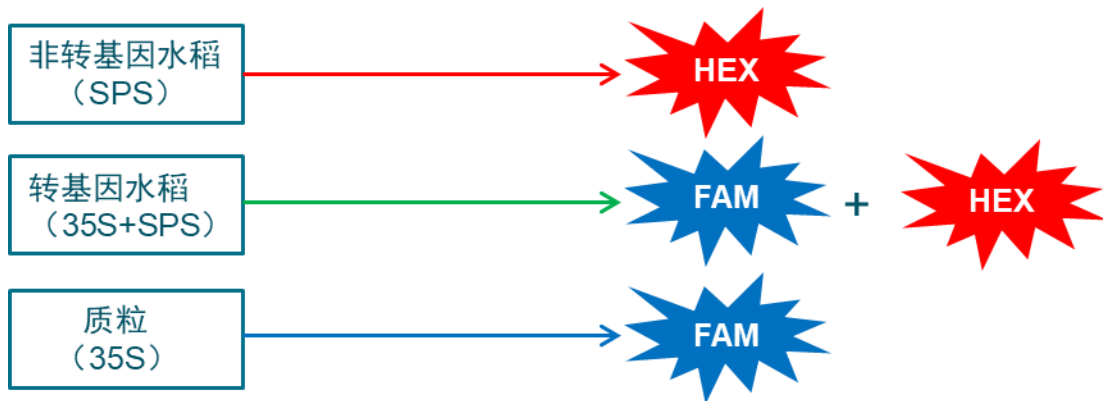
基于BSA→开发SNP标记

快速鉴定小麦抗条锈病基因

康振生教授和韩德俊教授团队



转基因检测



种子真实性鉴定

ICS 65.020.01
CCS B 21

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4021—2021

小麦品种真实性鉴定
SNP标记法

Wheat (*Triticum aestivum* L.) variety genuineness identification—
SNP based method

2021-12-15 发布

2022-06-01 实施



中华人民共和国农业农村部 发布

ICS 65.020.01
CCS B 21

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4022—2021

玉米品种真实性鉴定
SNP 标记法

Maize (*Zea mays* L.) variety genuineness identification—SNP based method

2021-12-15 发布

2022-06-01 实施

中华人民共和国农业农村部

发布

ICS 65.020.01
CCS B 21

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 2745—2021

实施 NY/T 2145—2015

水稻品种真实性鉴定
SNP标记法

Rice (*Oryza sativa* L.) variety genuineness identification—
SNP based method

2021-12-15 发布

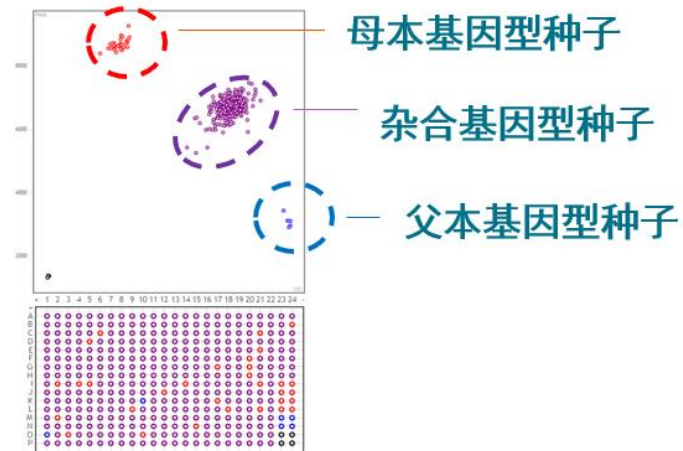
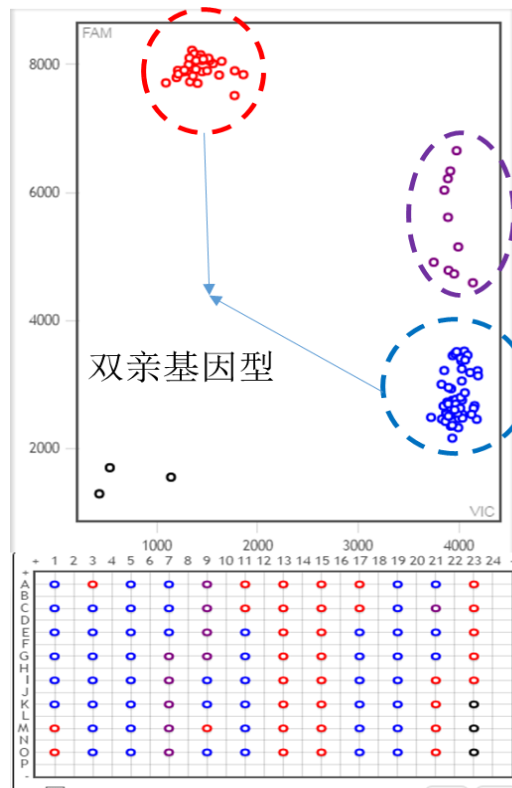
2022-06-01 实施



中华人民共和国农业农村部 发布

北京农林科学院小麦中心、玉米中心、中国水稻研究所起草编写

种子纯度鉴定



亲本差异筛选

F1 种子检测

药物基因组筛查

伦敦卫生和热带医学院

RESEARCH

Open Access



Bead-based assays to simultaneously detect multiple human inherited blood disorders associated with malaria

Lynn Grignard^{1*}, Catherine Mair¹, Jonathan Curry², Laleta Mahey², Guide J. H. Bastiaens³, Alfred B. Tiono⁴, Joseph Okebe⁵, Sam A. Coulibaly⁴, Bronner P. Gonçalves¹, Muna Affara⁵, Alphonse Ouédraogo⁴, Edith C. Bougouma⁴, Guillaume S. Sanou⁴, Issa Nébié⁴, Kjerstin H. W. Lanke³, Sodiomon B. Sirima⁴, Umberto d'Alessandro^{5,6}, Taane G. Clark^{7,8}, Susana Campino⁷, Teun Bousema^{1,3} and Chris Drakeley¹

伯氨喹治疗疟疾药物

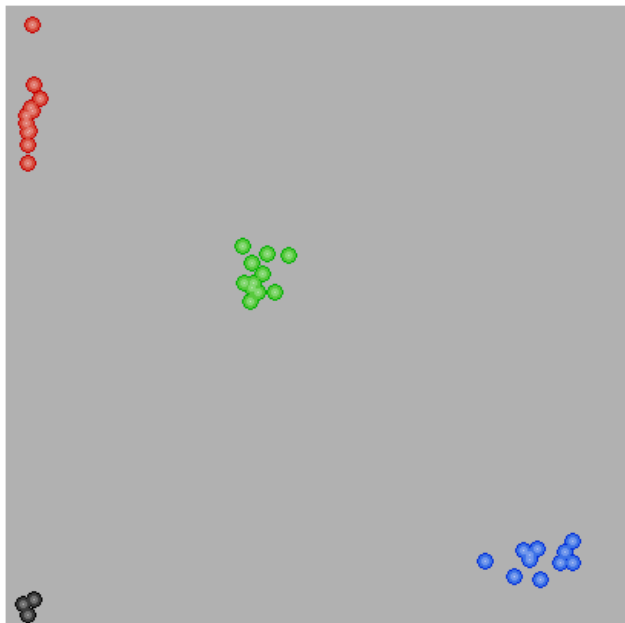
研究用KASP技术开发标记，对缺乏葡萄糖-6-磷酸脱氢酶（G6PD）人群进行筛查

已被应用于临床实践，减少药物引起患者的溶血反应

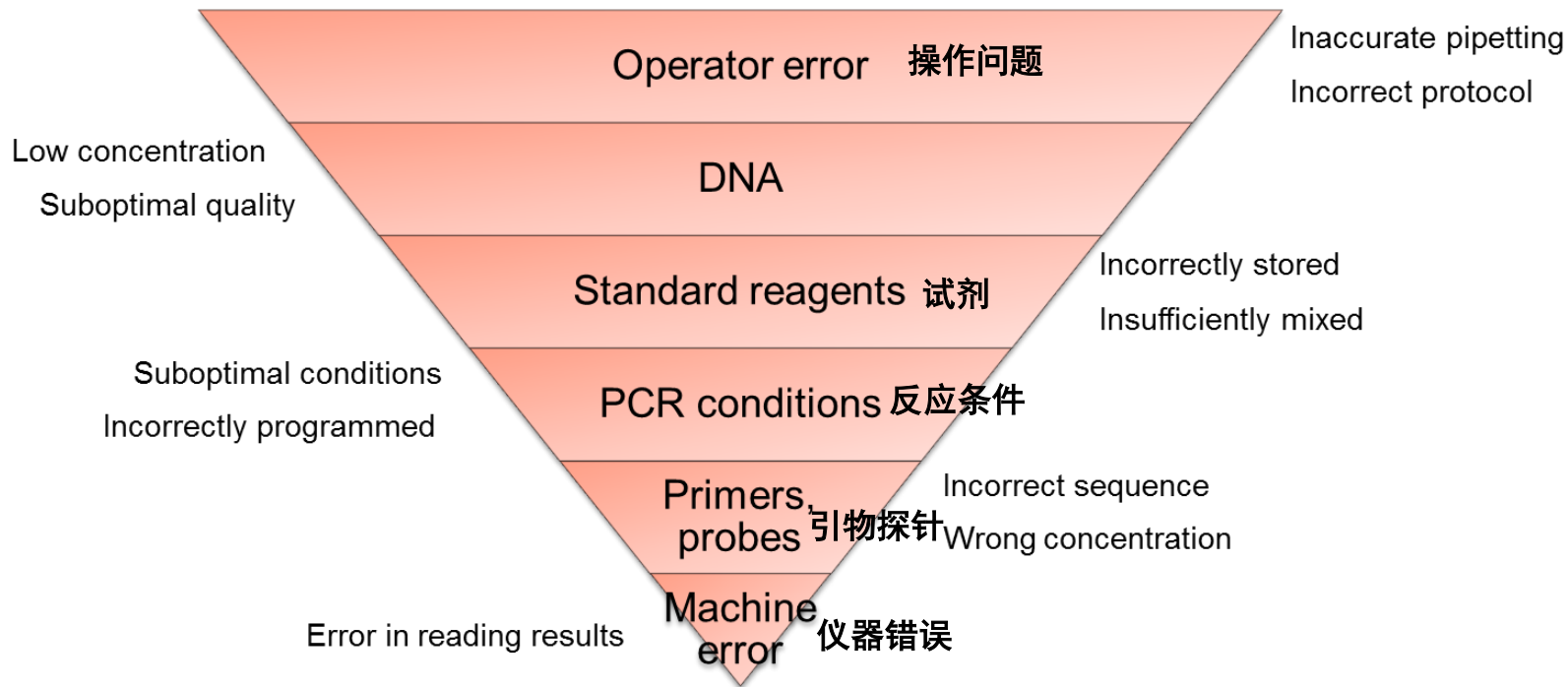
如何提升SNP基因分型成功率

分型及筛选标准

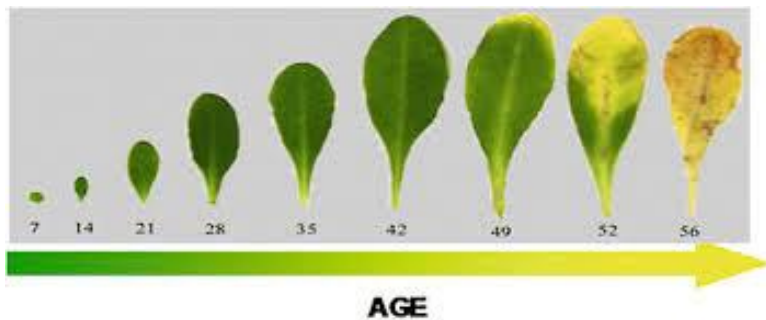
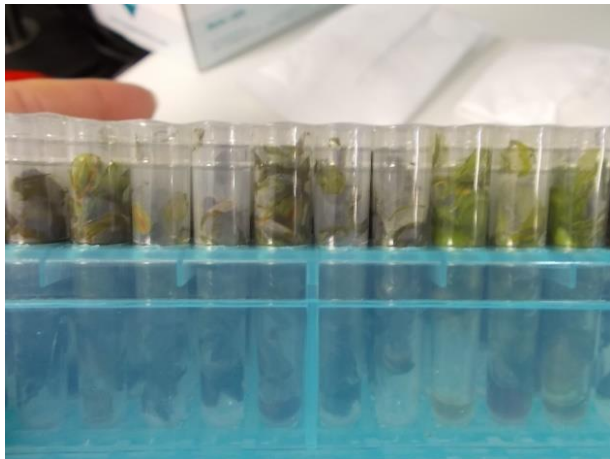
- ✓ 采用专业设计软件提高设计成功率
- ✓ Blast, 确保序列正确性
- ✓ 阳性对照基因型符合预期
- ✓ 三个清晰clusters (Call rate>95%)
- ✓ 最佳扩增循环数时NTC没有扩增
- ✓ 建议最少样品数为22个+2NTC



常见问题归类



DNA样本收集



√ 干燥，冻干

√ 新鲜样品，常温研磨

√ -80/-20℃保存，液氮研磨

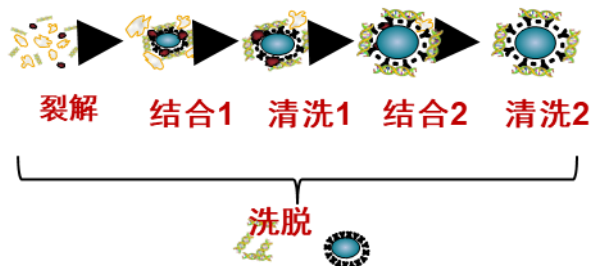
× 叶片过老或降解

× 采样差异过大

× 样本解冻研磨

DNA提取

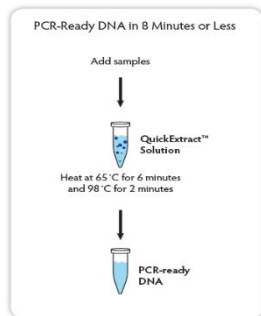
磁珠法



CTAB 法



快提法(碱煮法、TPS)



- EDTA浓度
- DNA工作液浓度 (5- 50ng/ul)
- 浓度梯度测试
- 避免磨样或转移上清过程中的交叉污染

试剂储存

Master Mix

避光， -20℃保存，分装，冻融不要超过3次

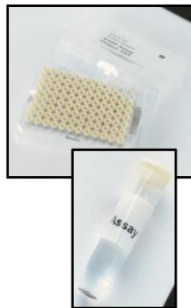
4℃<1周



Assay Mix

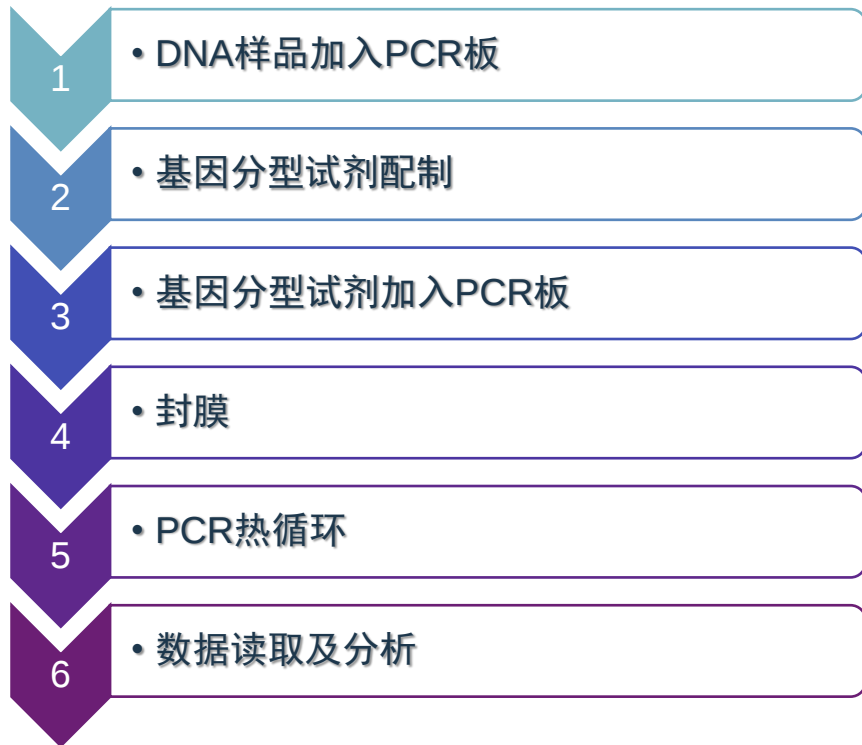
-20℃保存，分装，冻融不要超过3次

4℃<3周



混合液现配现用！

操作步骤



注意事项

加样准确，枪头避免交叉污染

试剂充分解冻，现配现用，充分混匀

分液准确，分液温度

确保密封性完好，避免热循环过程中蒸发或漏液

确保PCR程序正确

具有FAM, HEX/VIC 读取能力,专业基因分型软件

信号读取

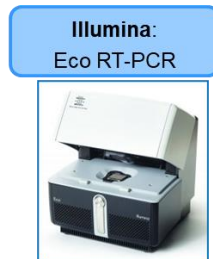
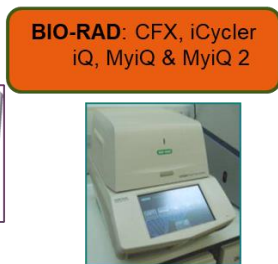
LGC SNPLine——Pherastar / Omega F



高能氙灯+PMT组合，准确度高，灵敏度高

信号读取

qPCR仪上运行KASP基因分型实验



不同仪器平台适配不同ROX Level的
KASP Master Mix

qPCR型号及说明参考网址:

<https://www.biosearchtech.com/support/education/kasp-genotyping-reagents/running-kasp-genotyping-reactions>

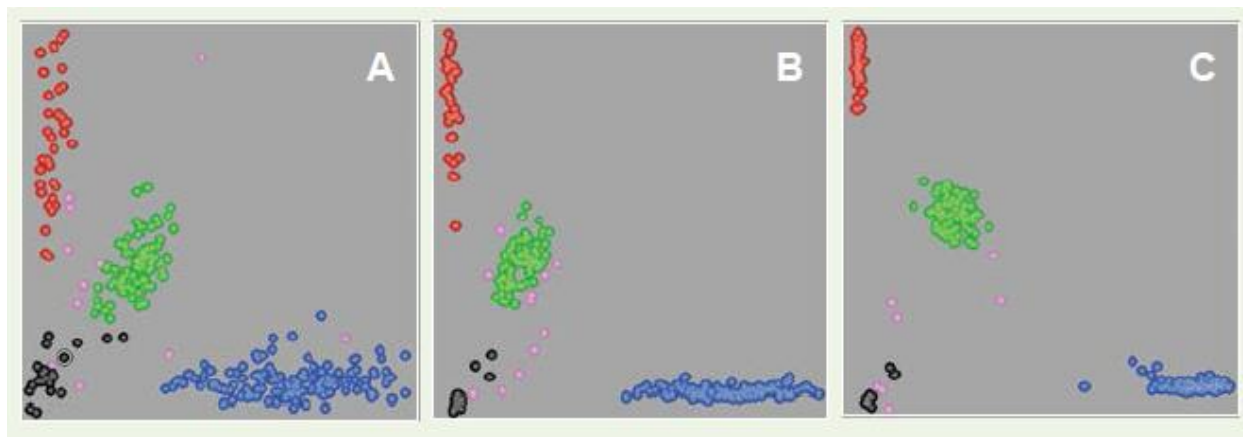
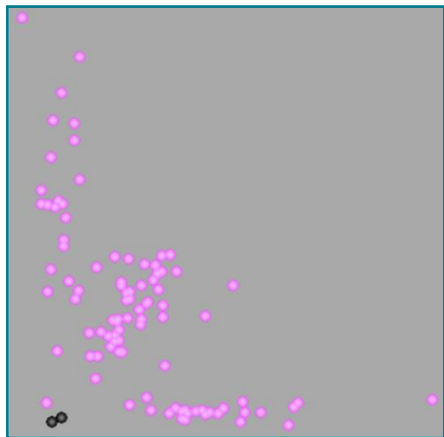
案例分析

Q1: 有些引物分型不清晰, 如何优化?

有分型趋势:

-加循环, 最多加4组

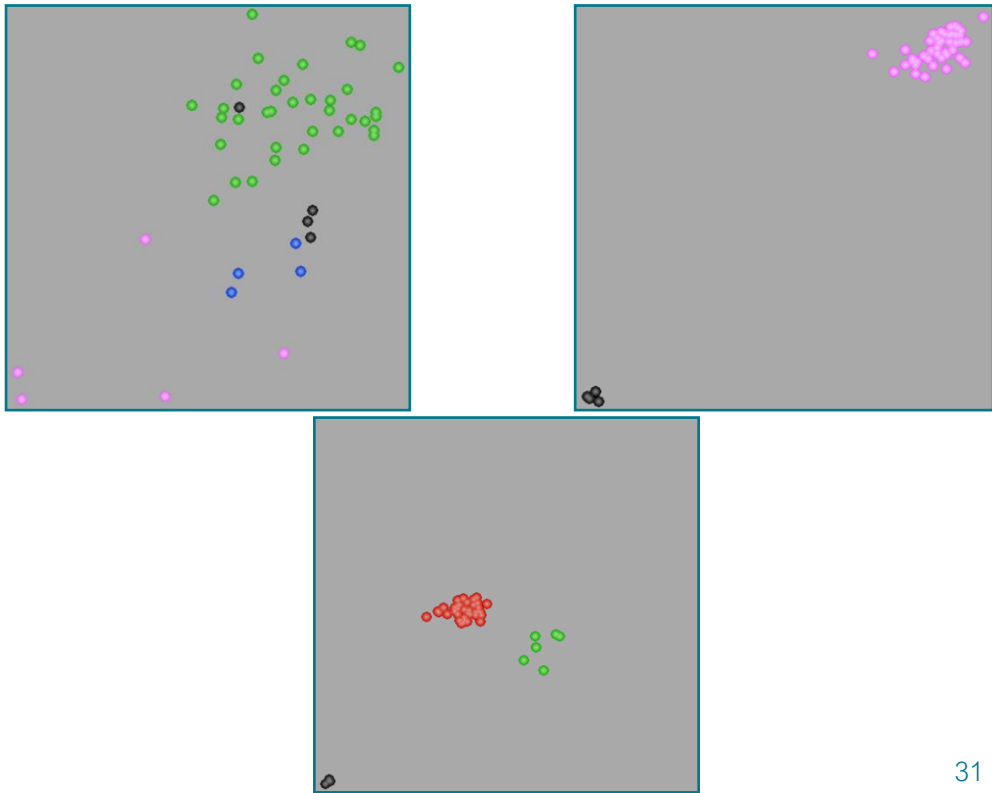
Protocol Stage	Temperature	Duration	Number of cycles for each stage
Stage 1 Amplification	94°C	20 seconds	x 3 cycles
	57°C	60 seconds	
Optional Stage 2 (read stage for qPCR instruments only)	30°C (any temperature below 40°C is suitable for the read stage)	60 seconds	x 1 cycle



Q1：有些引物分型不清晰，如何优化？

无分型趋势

- ✓ 读板机
 - 重新读板
- ✓ DNA样品加样问题
 - 注意加样步骤
- ✓ 目标SNP或序列在检测群体中不存在
 - 检查序列，重新设计引物



Q2: KASP实验条件对结果影响

1. DNA浓度:

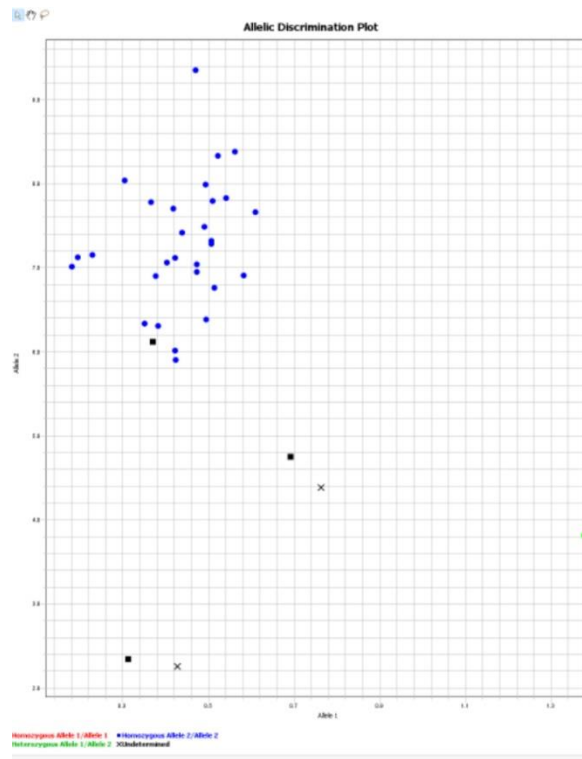
以基因组3000Mbp为计算标准，根据基因组大小调整。

2. 是否避光，是否室温?

Master Mix避光保存，注意存放时间，建议分装，避免反复冻融

(不超过3次)；引物注意存放时间。

PCR产物：短时间可保存4℃避光一周，这段时间内可以加循环或重新读数。



GC含量问题

Protocol Stage	Temperature	Duration	Number of cycles for each stage
Stage 1 Hot-start <i>Taq</i> activation	94°C	15 minutes	x 1 cycle
Stage 2 Touchdown	94°C	20 seconds	x 10 cycles
	68°C (68°C decreasing 0.6°C per cycle to achieve a final annealing / extension temperature of 62°C)	60 seconds	
Stage 3 Amplification	94°C	20 seconds	x 26 cycles
	62°C	60 seconds	
Optional Stage 4 (read stage for qPCR instruments only)	30°C (any temperature below 40°C is suitable for the read stage)	60 seconds	x 1 cycle

高GC%

➤ GC% > 70%

- 运行68-62°C touchdown 程序
- DMSO

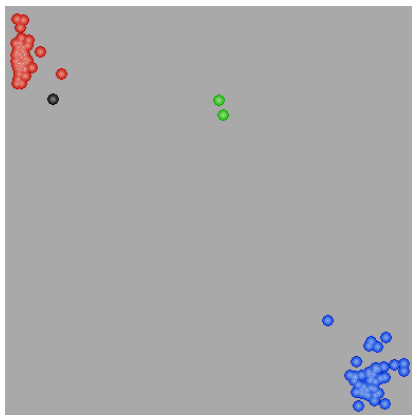
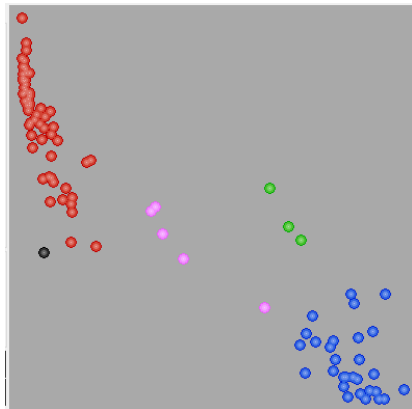
Protocol Stage	Temperature	Duration	Number of cycles for each stage
Stage 1 Hot-start <i>Taq</i> activation	94°C	15 minutes	x 1 cycle
Stage 2 Amplification	94°C	20 seconds	x 36 cycles
	57°C	60 seconds	
Optional Stage 3 (read stage for qPCR instruments only)	30°C (any temperature below 40°C is suitable for the read stage)	60 seconds	x 1 cycle

低GC%

➤ GC% < 30%

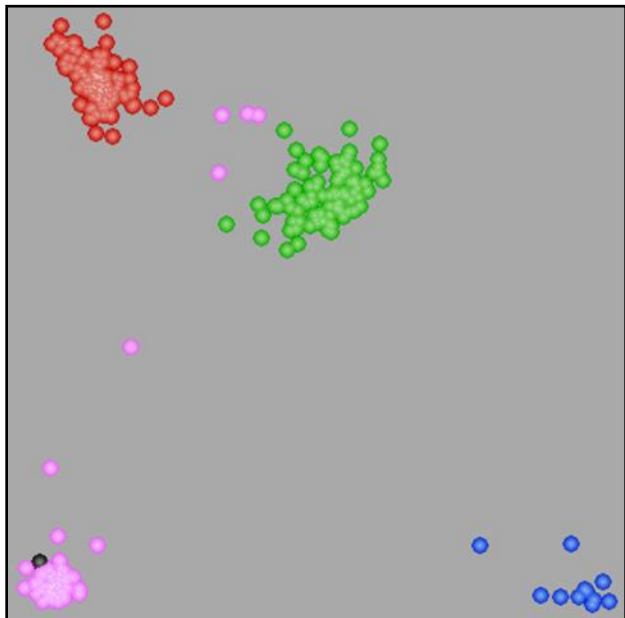
- 运行两步法57°C程序
- MgCl₂

NTC有扩增



- ✓ 检查实验用水或加样枪头是否污染
- ✓ 实验室被PCR产物污染
- ✓ 引物或Mastermix保存不当，反复冻融降解
- ✓ 引物合成纯化问题
- ✓ 引物设计问题，重新设计引物（例如二聚体）

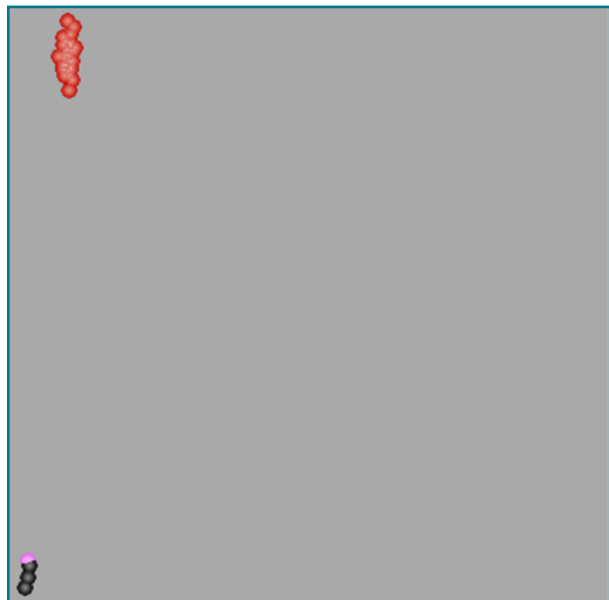
部分位点未分型



- ✓ DNA质量与浓度：用其他引物扩增比较
- ✓ 加样问题（打空或者漏加）
 - 反应混合物漏加
 - DNA漏加

Cluster聚类

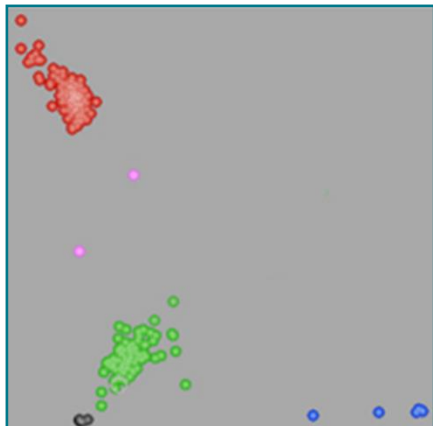
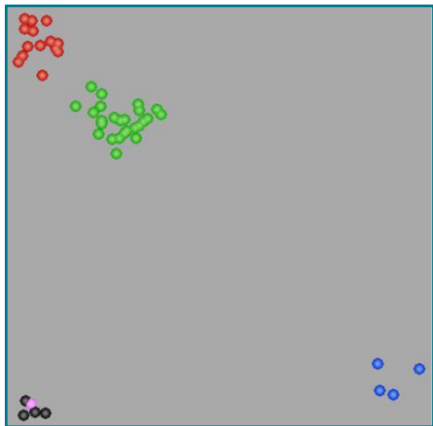
只有一个Cluster



- ✓ 加入阳性对照
- ✓ 所检测的样品都是相同基因型
- ✓ 待检测片段同源性较高
- ✓ 该位点不是真实的差异位点
- ✓ 检查序列，重新设计引物

Cluster聚类

Cluster位置偏离



- ✓ 引物特异性
 - 重新设计引物
- ✓ Mix混合不充分
 - 彻底解冻，充分混匀

我们是否可以帮到你

KBD业务



KASP assay design

Guide to submission of sequence information

This document is intended as a guide to how sequence information should be submitted for KASP™ assay design. The different polymorphisms that can be detected by KASP are outlined, with examples of how the sequence information should be submitted (using the appropriate SNP submission form). Submitted sequences should be formatted as outlined in Section 2, to ensure that your order is processed efficiently.

1. KASP chemistry: product capabilities

KASP assays can be used for the detection of the following polymorphism types:

Single nucleotide polymorphisms

KASP assays can be designed to detect single nucleotide polymorphisms within any organism. The SNP of interest should be submitted within [square brackets] and can either be formatted as [allele1/allele2] or [IUPAC code].

```
CTTAGATCGACAGGTCTAAGAGCTGAAGAGCTAGCTATTAAAGTCGAGC[C/G]  
AGCTGCTAGACGTCGCAGTCGACACAGCTAGCCTAGGACAAAGTCTCGTG  
CTTAGATCGACAGGTCTAAGAGCTGAAGAGCTAGCTGATTAAAGTCGAGC[S]  
AGCTGCTAGACGTCGCAGTCGACACAGCTAGCCTAGGACAAAGTCTCGTG
```

Figure 1. Examples of how to format sequence for KASP assay design for a SNP

Insertions or deletions

KASP assays can be designed for the detection of insertions or deletions (indels) of any size. One allele-specific primer will be designed to incorporate the indel sequence and the second allele-specific primer will be designed to the standard sequence. The common reverse primer will be designed to sequence present



微量分液仪



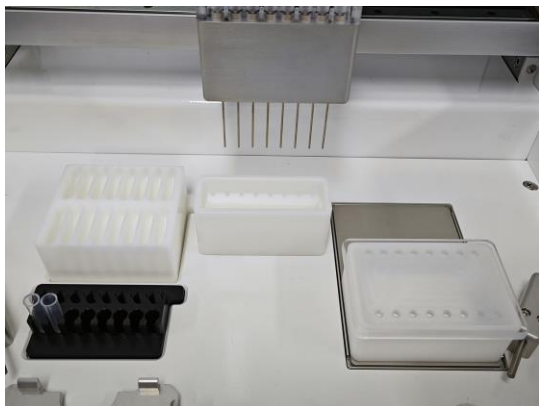
- 8道非接触式独立钢针分液，防止交叉污染
- 双板位，孔板：96/384/1536
- 体积：1-25ul, 1ul时分液体积精确度 $CV \leq 5\%$
- 内置钢针清洗工作站，枪头耗材成本为0.

操作：

最快在3min内完成一块384孔板信息录入、混合液配制、分液、钢针清洗全过程

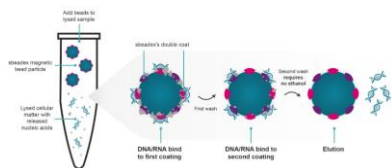
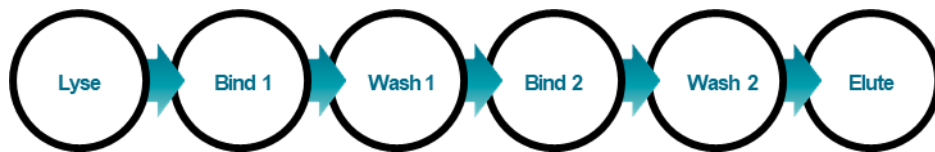
应用：

- 实验体系构建、基因分型、标准PCR等应用



磁珠法核酸提取

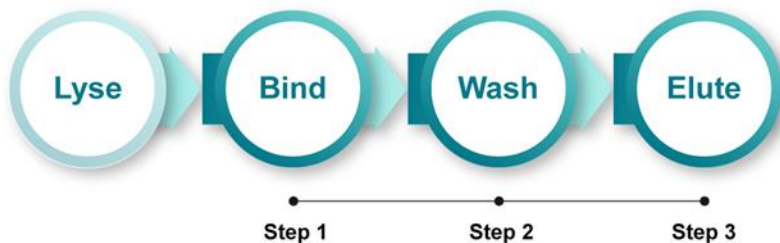
Sbeadex



- 高质量核酸
- 无毒，无酒精洗涤
- 物种：植物、牲畜、鸡血等
- 可用于PCR，RTPCR，测序等多种下游应用
- 提取方式：可手动，可自动化



Sbeadex Lightning



- 高质量核酸
- 纯化过程5min
- 无毒，无酒精洗涤
- 物种：植物、牲畜、鸡血等
- 可用于PCR，RTPCR，测序等多种下游应用
- 提取方式：可手动，可自动化

Thank you

BIOSEARCH™
TECHNOLOGIES
GENOMIC ANALYSIS BY LGC



Tel: 13161181711

邮箱: yedda.liu@lgcgroup.com

