

# KASP技术在人类SNP基因分型方面的应用

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



# Agenda

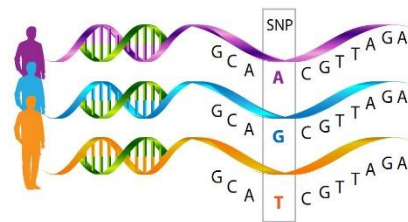
- SNP基因分型基本概念
- 从 GWAS 到 SNP Genotyping
- KASP基因分型技术原理
- 基因分型应用领域
- IntelliQube 平台

# SNP基因分型基本概念

- **单核苷酸多态性(SNP, Single Nucleotide Polymorphism)**这一概念首次出现于1994年发表的人类分子遗传杂志上, 随后于1996年由麻省理工的Lander正式提出并认定其为“第三代分子标记”。
- 主要是指在基因组DNA序列中由于单个核苷酸(A/T/C/G)的替换所引起的多态性, 人群中发生频率大于1%。
- 频率高的基因型为野生型, 频率低的基因型为突变型。
- 每个SNP位点分配一个rs号, 信息存储在NCBI上的dbSNP数据库
- 采用各种技术手段对个体DNA样本进行目标SNP位点的基因型检测, 即成为**SNP基因分型**。

Variation ID	dbSNP	Chromosome	Position	REF Allele	ALT Allele (IUPAC)	Minor Allele	Minor Allele Global Frequency	Contig	Contig Position	Band
chr1:9262273:G/A:1	rs398122816	1	9262273	G	A			GL000006.2	8676285	p36.22
chr1:45015006:G/A:1	rs121918062	1	45015006	G	A			GL000006.2	44429018	p34.1
chr17:46010375:T/C:1	rs63750912	17	46010375	T	C			GL000132.2	19074395	q21.31
chr2:189001450:G/A:1	rs587779461	2	189001450	G	A			GL000029.2	94505435	q32.2
chr1:226982947:C/T:1	rs41303129	1	226982947	C	T	T	0.005591	GL000018.2	3374012	q42.13

Showing 1 to 5 of 5 entries



# 从 GWAS 到 SNP Genotyping

大样本、高密度SNP芯片或全基因组测序，进行GWAS分析

找出与研究性状关联的候选主效基因位点，即目标SNPs

样本群体

对未知基因型样本个体进行目标SNPs检测，即SNP Genotyping

根据分型结果，指导育种、疾病治疗等

检测个体

# 基因分型技术与方法概览



## 基于PCR

- Taqman-MGB探针
- 分子信标
- PCR-RFLP
- HRM
- ARMS-PCR
- KASP

## 芯片法

- 微反应孔
- 探针杂交
- 探针延伸

## 测序法

- minisequencing微测序
- Sanger测序
- 焦磷酸测序
- 二代测序

## 质谱法

- iPLEX单碱基延伸
- 酶切法
- 连接反应

## 毛细管电泳

- 连接酶检测反应 (LDR)
- 多重连接探针扩增技术 (MLPA)
- 酶切法
- 单碱基延伸

不同技术方法相互交叉，如基于PCR技术常与微孔芯片结合；单碱基延伸则与微阵列芯片、质谱法等结合；没有最好的技术，只有最适合您应用领域的技术！

# KASP组分

KASP，即竞争性等位基因特异性PCR，主要组分如下：

## A) KASP 分析混合物

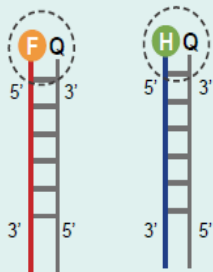
等位基因特异性正向引物：



反向引物：



## B) KASP 主混合物



## C) DNA 模板 (样本)



-  等位基因-1尾部FAM标记的接头序列
-  等位基因-2尾部HEX标记的接头序列
-  共用反向引物
-  FAM染料
-  HEX染料
-  目标SNP
-  淬灭剂

# KASP技术原理

## 1) 模板变性和竞争性配对-第1轮PCR



## 2) 等位基因的特异性街头序列补充复制-第2轮PCR



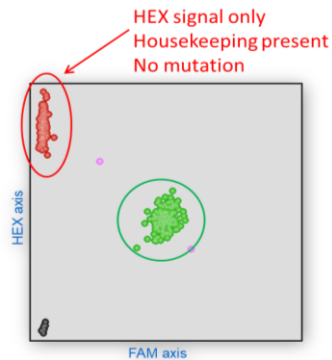
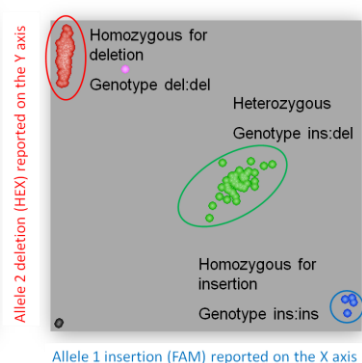
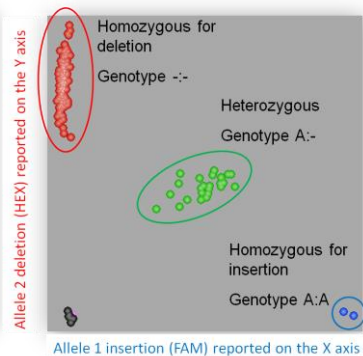
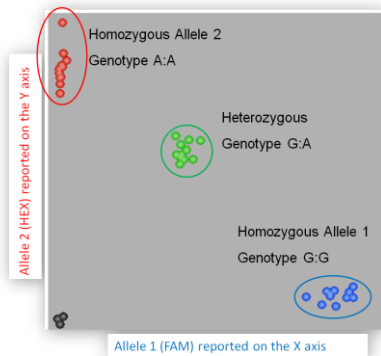
## 3) 信号产生-第3轮PCR



KASP™ genotyping assay  
How it works



# KASP结果分析

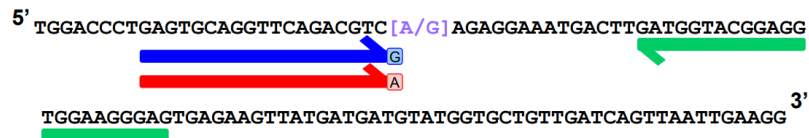


HEX and FAM signal only.  
Housekeeping and mutation  
present

- 适用于SNP, Indel, 小片段及大片段插入缺失及片段有无的分子标记检测, 结果直观易判读。
- 成本低, 灵活性强, 检测周期短, 易于实现自动化高通量!



# KASP引物设计及对DNA的要求



## KEY

- Allele-specific primer 1 (FAM)
- Allele-specific primer 2 (HEX)
- Common reverse primer



## KEY

- Allele-specific primer 1 (FAM)
- Allele-specific primer 2 (HEX)
- Common reverse primer

- LGC提供专业的引物设计与合成服务 (KBD)，引物转化成功率高达90%以上。
- 对DNA的要求：浓度 2.5-50ng/uL，纯度要求不高，可兼容粗提DNA，甚至全血直扩！

# 应用方面



国内发表文章200，全球范围超过3000篇，医学研究包括糖尿病，结直肠癌，冠状动脉狭窄，动脉瘤，胃癌，听力丧失，阿兹海默，系统性红白狼疮，关节炎等。

# 遗传病检测

## 耳聋基因检测

- 遗传性耳聋：是指由于基因或染色体异常导致的耳聋
- 我国三分之一残疾人是听力语言障碍的，60-70%听力障碍者由基因突变导致遗传性耳聋，在正常人群中由5-6%的人至少携带一种耳聋基因
- 婚前、孕前、产前耳聋基因筛查；新生儿耳聋基因筛查。市场容量约30亿/年。
- 《孕期耳聋基因筛查专家共识（2022年）》指出：建议至少筛选孕妇基因组DNA中4个基因（即GJB2，SLC26A4，GJB3及线粒体MT-RNR1/12S rRNA）的20个变异位点。

基因	耳聋表现
GJB2	先天性耳聋
SLC26A4	迟发性耳聋，一巴掌致聋
线粒体MT-RNR1/12S rRNA	迟发性耳聋，药物性耳聋
GJB3	迟发性耳聋

# 博奥耳聋基因检测试剂盒

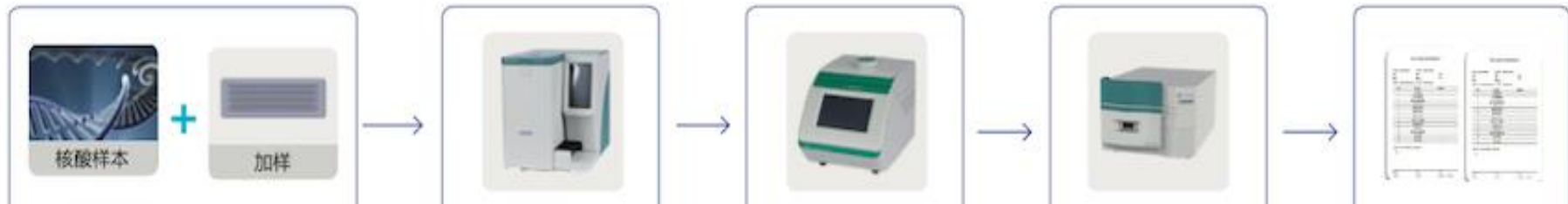
**BIOSEARCH™**  
**TECHNOLOGIES**  
GENOMIC ANALYSIS BY LGC

## 博奥 - 二十三项遗传性耳聋相关基因检测试剂盒 (微流控芯片法)



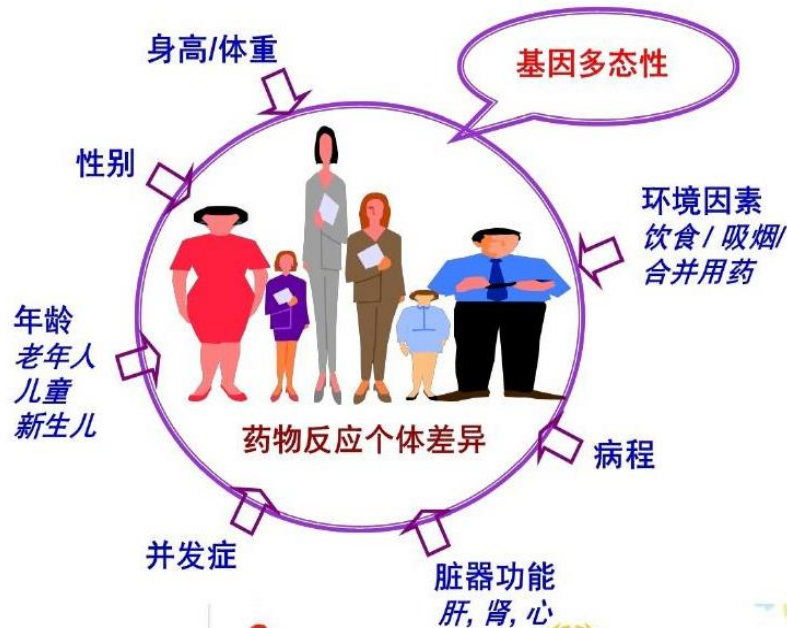
(国械注准: 20213400743)

- 采用微流控芯片技术结合 竞争性等位基因特异性扩增技术(KASP) 对耳聋相关4个基因23种突变形式进行检测。
- 一张芯片片可以跑4个样品， 一台PCR仪可以放4张芯片。可在2小时内完成16个样品的检测及报告生成。



# 药物基因组学

- 自1959年“遗传药理学”的概念被首次提出，药物基因组学 (Pharmacogenomics, PGx) 在此基础上形成并得以快速发展
- **药物基因组学**是指研究**基因变异**所致的不同疾病对**药物的不同反应**，并在此基础上研制出新药或新的用药方法。
- 2015年**美国精准医学计划**，斥资2.5亿美元进行癌症及其他疾病个体化医疗方案研究；**中国精准医疗战略**专家组于2015年成立，并计划在2030年前投入600亿元



## 博奥-华法林和氯吡格雷检测试剂盒

(抗栓治疗用药相关6个基因位点多态性检测试剂盒, 国械注准: 20183400428)

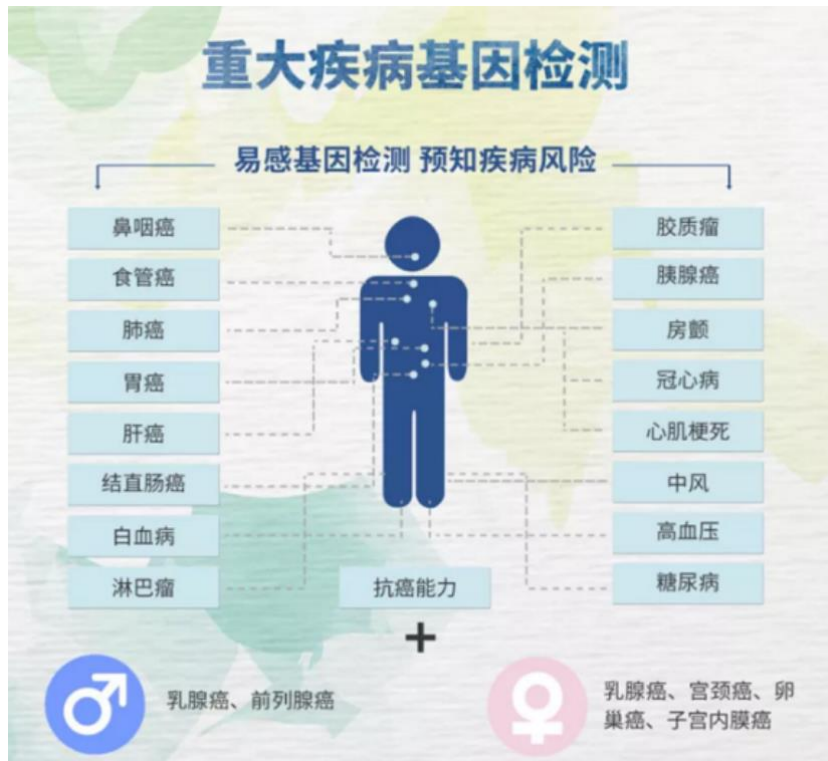
- 我国心血管病患者约2.9亿，每年因心血管病死亡的人数约350万
- 在心血管疾病的治疗中，存在着药效不佳及用药不良反应高发的问题。如过量服用华法林会严重加剧患者的出血风险；另外，4%-30%按常规剂量服用氯吡格雷的患者易产生氯吡格雷抵抗，导致心血管事件的发生。
- 研究表明华法林和氯吡格雷的疗效、剂量和不良反应与**个体基因的多态性**密切相关。

检测基因	检测位点	位点数 (个)
VKORC1	rs9923231*、rs9934438*	2
CYP2C9	rs1057910*	1
CYP4F2	rs2108622	1
GGCX	rs12714145	1
CYP2C19	rs4244285*、rs4986893*、rs12248560*	3
CYP3A4	rs4646437	1
总计	—	9

本试剂盒包装规格为24人份/盒，检出限为50ng/μl，样本类型为全血（EDTA抗凝）。

# 疾病易感性检测

- 从父母遗传的缺陷基因，是产生疾病的内因，这种基因就叫做“疾病易感基因”
- 通过基因检测，可以了解是否有易感风险，如心脑血管疾病、自身免疫性疾病或肿瘤等，可以帮助有疾病易感基因的被检测者避免接触与特定疾病相关的有害物质，并定期进行特定方向的诊断学监测，以便在疾病初期早诊断早治疗，延缓疾病的发生、发展等。



# 疾病易感性检测

## 阿尔茨海默病 (AD) 风险基因检测



- 截至2019年，我国有1000多万AD患者，据全球首位，随着人口老龄化程度加深，预计2050年我国AD患者人数将超过3000万
- AD的风险因素包括年龄、性别、睡眠、情绪、家族史、基因突变等，载脂蛋白E(ApoE)是目前研究最为深入且被广泛认可的易感基因
- 预知风险，早期干预

APOE亚型	基因型	rs429358	rs7412	人群占比	风险提示
E2	$\epsilon 2/\epsilon 2$	TT	TT	5~10%	风险降低
	$\epsilon 2/\epsilon 3$	TT	TC		
E3	$\epsilon 3/\epsilon 3$	TT	CC	70~80%	正常
	$\epsilon 2/\epsilon 4$	TC	TC		
E4	$\epsilon 3/\epsilon 4$	TC	CC	10~15%	风险升高
	$\epsilon 4/\epsilon 4$	CC	CC		

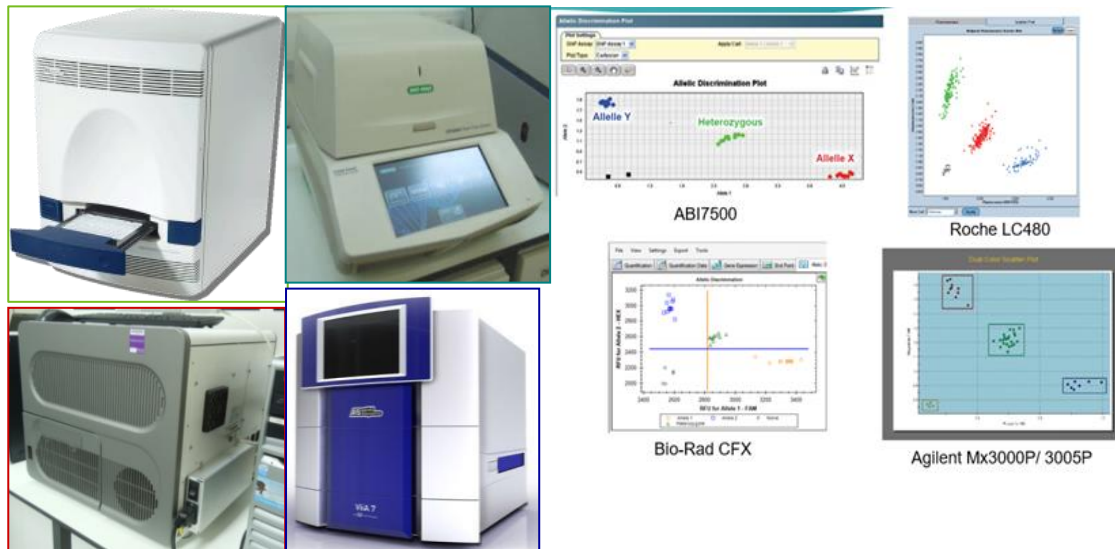
2个SNP rs429358和rs7412，构成6种不同的基因型，携带1个APOE  $\epsilon 4$ 风险增加约3~4倍，携带2个APOE  $\epsilon 4$ 者增加约10~15倍



# LGC验证过的SNP位点

SNP rs #	Gene	等位基因意义
rs1799853	CYP2C9	与华法林代谢不良相关
rs12248560	CYP2C19	超快代谢表型, 药物代谢
rs2108622	CYP4F2	与华法林代谢不良相关
rs9923231	VKORC1	与华法林敏感性相关
rs429358	ApoE	影响阿尔茨海默病的风险
rs7412	ApoE	影响老年痴呆症的风险
rs1801131	MTHFR	与多种类型脑癌的风险增加相关
rs1801133	MTHFR	与多种类型脑癌的风险增加相关
rs4633	COMT	精神分裂症易感性, 疼痛反应/耐受性
rs4680	COMT	精神分裂症易感性, 疼痛反应/耐受性

# 检测平台多样性



- 新冠之后大量的 qPCR 仪器闲置，KASP 技术可以应用于不同 qPCR 仪器。检测可在 2 个小时之内完成，准确率可达 99.8%。无需采购其他昂贵仪器平台。

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