

Applied Biosystems QuantStudio 3 & 5 实时荧光定量PCR仪 KASP 基因分型实验操作指南



目 录

1	指南简介	3
2	实验前注意事项	3
3	KASP反应程序概览	3
4	详细操作步骤	4
4.1	实验属性设置	4
4.2	KASP反应程序设置	5
4.3	反应板设置	8
4.4	运行程序(包括扩增前读板和扩增后读板)	12
4.5	结果分析	12
4.6	(可选)再次扩增反应板	13
4.7	运行KASP试用试剂盒	14

1 指南简介

本指南旨在指导用户如何在 Applied Biosystems QuantStudio 3 & 5 仪器上运行 LGC 的 KASP 基因分型实验。如果您使用其它 KASP 试剂，实验设置等请参考试剂的说明书，本指南可以用来辅助您完成仪器和配套软件上的相应设置。

KASP 技术在 QuantStudio 系列仪器上用于等位基因分型时表现良好，本指南将帮助您顺利设置、运行并读取反应板数据。

2 实验前注意事项

- KASP 的最佳循环条件需要采用降落式 (Touchdown) 两步 PCR 程序。本指南 (第 3 节) 提供的运行条件适用于大多数 KASP 法的 SNP 检测试剂，但请务必核对您的试剂说明书，以确认是否有特定的条件。
- KASP 技术采用终点法检测荧光，需在 PCR 扩增完成后读取一次最终的荧光信号，**读取温度必须低于 40°C**。
- 在 QuantStudio 3 & 5 上设置程序时，应包含扩增前 (Pre-read) 和扩增后 (Post-read) 的读板步骤。
- 不需要在 PCR 循环阶段采集荧光信号 — 因为 KASP 技术在这些温度下无法采集到有用的数据。
- KASP 再扩增 (Recycling)* 程序通常能够提高结果质量，特别是对于聚类较慢的实验。
- KASP 试剂中使用的报告基团为 HEX，如果您的 QuantStudio 3 & 5 仪器没有校准过 HEX，在此可以选择 VIC 代替 HEX。

*: KASP 基因分型实验的效果受多种因素影响，包括样本 DNA 浓度和 SNP 位点周围的 DNA 序列等。DNA 序列组成会影响引物结合的效率，进而影响 PCR 反应的速率。因此，不同的 KASP 分型实验将以不同的速率完成，有些实验可能需要额外的 PCR 循环来产生清晰的基因分型簇。

3 KASP 反应程序概览

3.1 KASP 反应程序**

步骤	温度	时间	循环次数	说明
1	30°C	1 分钟	1	扩增前读板步骤，需采集荧光信号
2	94°C	15 分钟	1	
3	94°C	20 秒	10	Touchdown PCR (每循环降低 0.6°C)
4	61°C → 55°C	1 分钟		
5	94°C	20 秒	26	
6	55°C	1 分钟		
7	30°C	1 分钟	1	扩增后读板步骤，需采集荧光信号

3.2 KASP再次扩增(Recycling)程序**

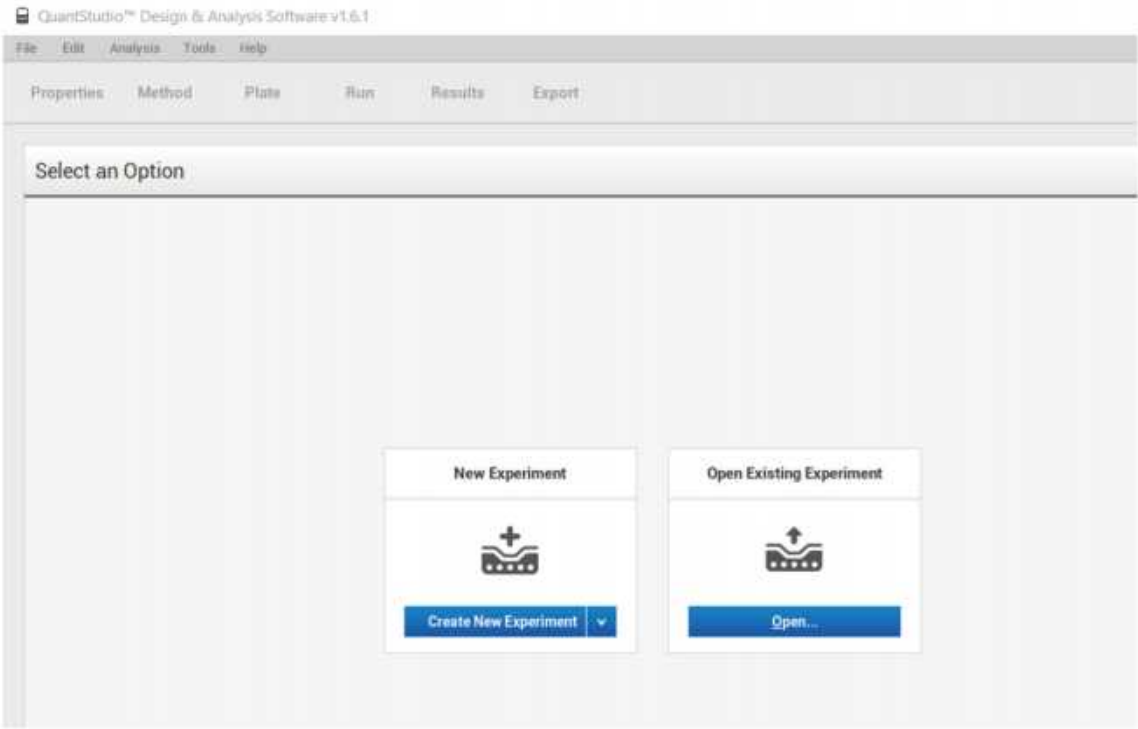
步骤	温度	时间	循环次数	说明
1	94℃	20秒	3	降温至低于40℃，采集荧光信号
2	57℃	1分钟		
3	30℃	1分钟	1	

**：不能在40℃以上读取KASP反应板荧光信号，请关闭PCR循环阶段的荧光信号采集。

4 详细操作步骤

4.1 实验属性设置

打开QuantStudio 3 & 5仪器配套的QuantStudio Design & Analysis Software。



点击主页面上的Create New Experiment新建一个实验。

在Properties界面设置实验属性：

- Ⓐ 输入实验的名称；

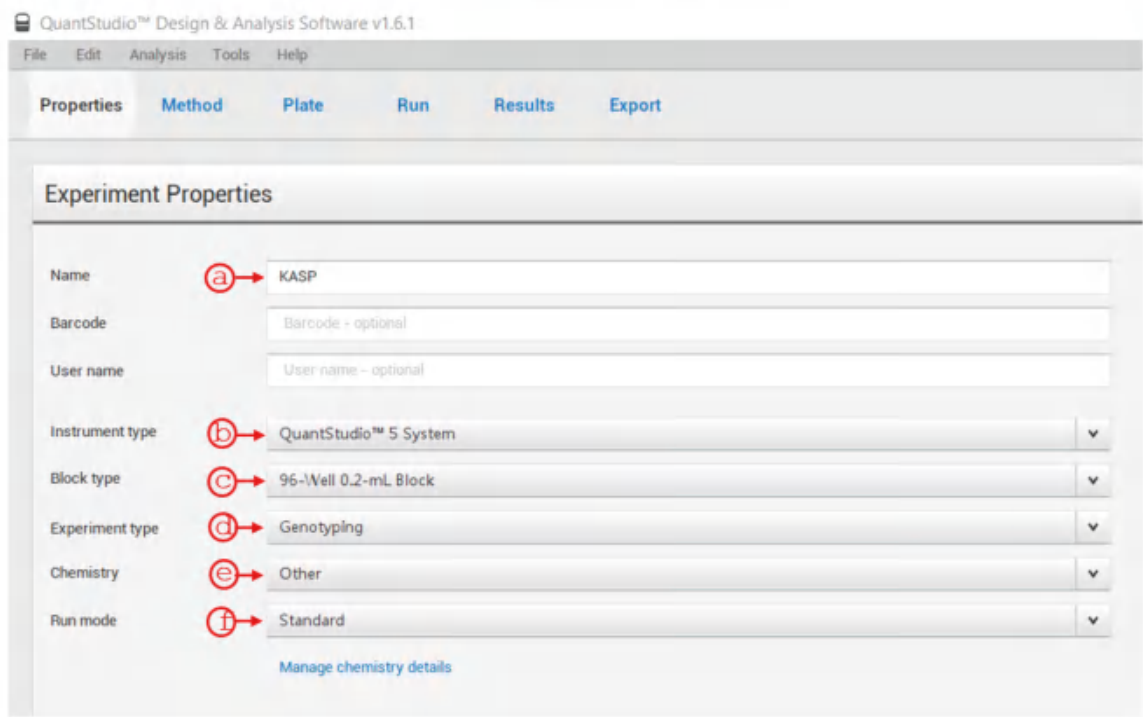
Ⓑ 选择正在使用的仪器型号；

Ⓒ 选择仪器的Block (加热模块)类型；
- Ⓓ 选择实验类型为Genotyping；

Ⓔ 选择实验试剂类型为Other；

Ⓘ 选择运行模式(Run mode)为Standard。

以QuantStudio 5 的 0.2-mL 96 Well模块为例，实验属性页面设置如下图所示：



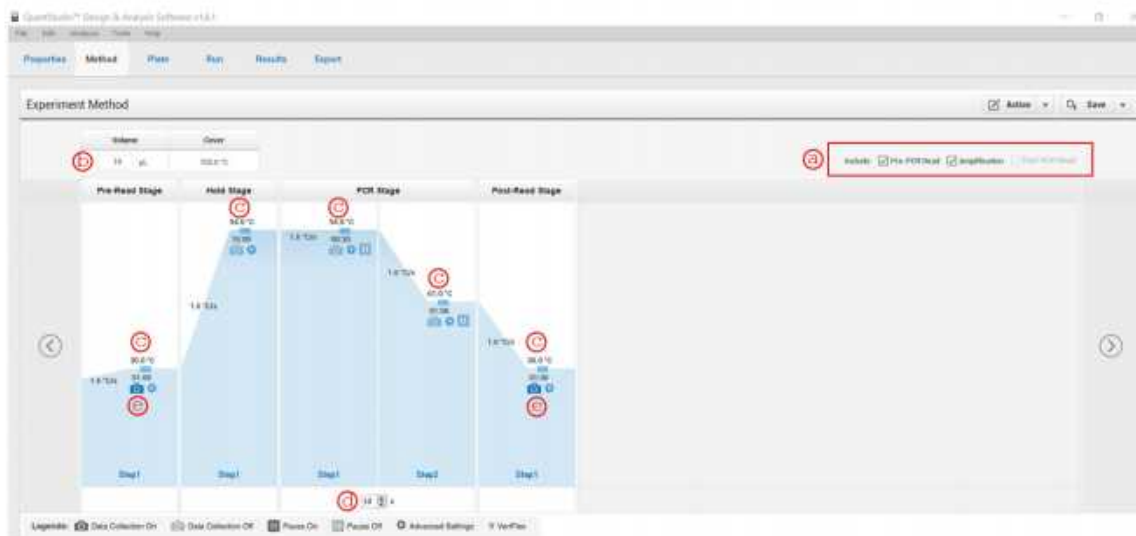
4.2 KASP反应程序设置

根据KASP实验要求设置Genotyping运行程序。程序如下：

步骤	温度	时间	循环次数	说明
1	30°C	1分钟	1	扩增前读板步骤，需采集荧光信号
2	94°C	15分钟	1	
3	94°C	20秒	10	Touchdown PCR (每循环降低0.6°C)
4	61°C → 55°C	1分钟		
5	94°C	20秒	26	
6	55°C	1分钟		
7	30°C	1分钟	1	扩增后读板步骤，需采集荧光信号

步骤1：点击Method界面，设置KASP实验的运行程序。

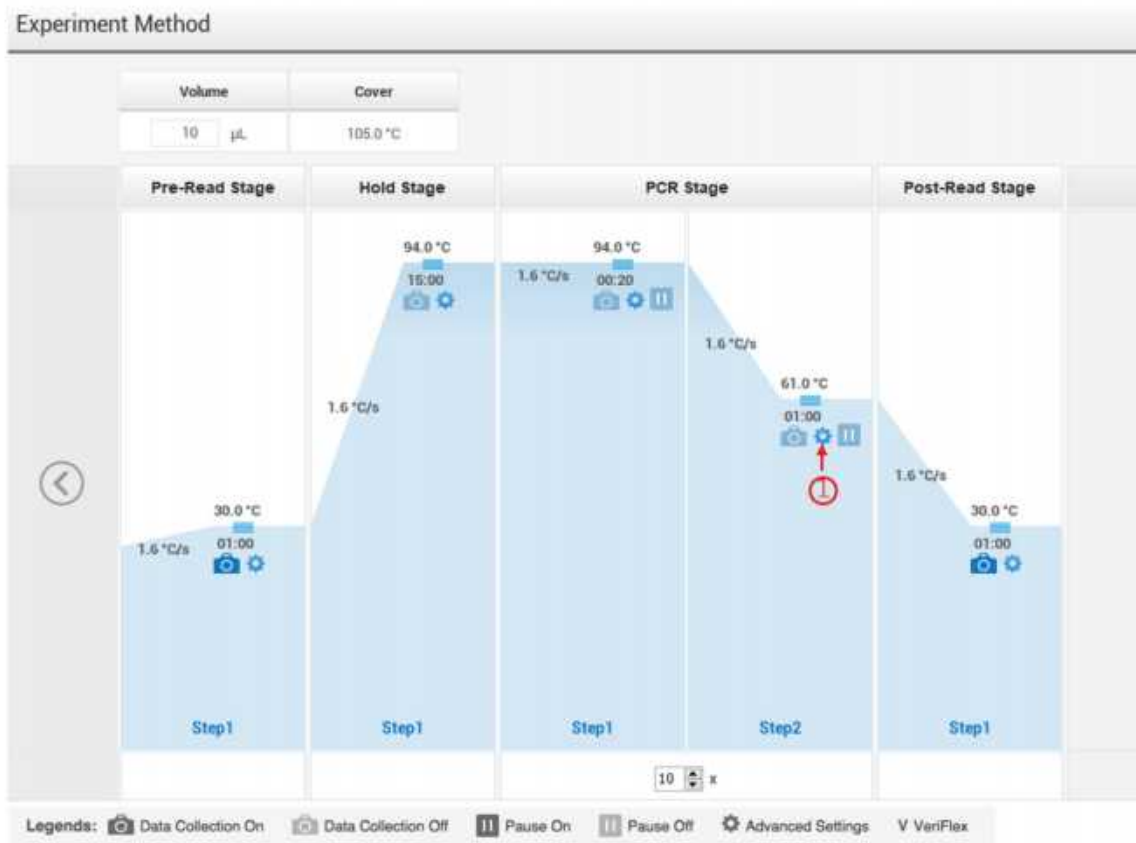
- Ⓐ 勾选Pre-PCR Read和Amplification (程序默认是勾选的，无需改动)；
- Ⓑ 输入实际的PCR反应体积(LGC试剂推荐反应体积为：96孔板10 μL，384孔板5 μL)；
- Ⓒ 单击更改PCR反应的温度和时间；
- Ⓓ 更改反应循环次数；
- Ⓔ 确认相机图标为亮蓝色状态，以保证荧光信号被采集。

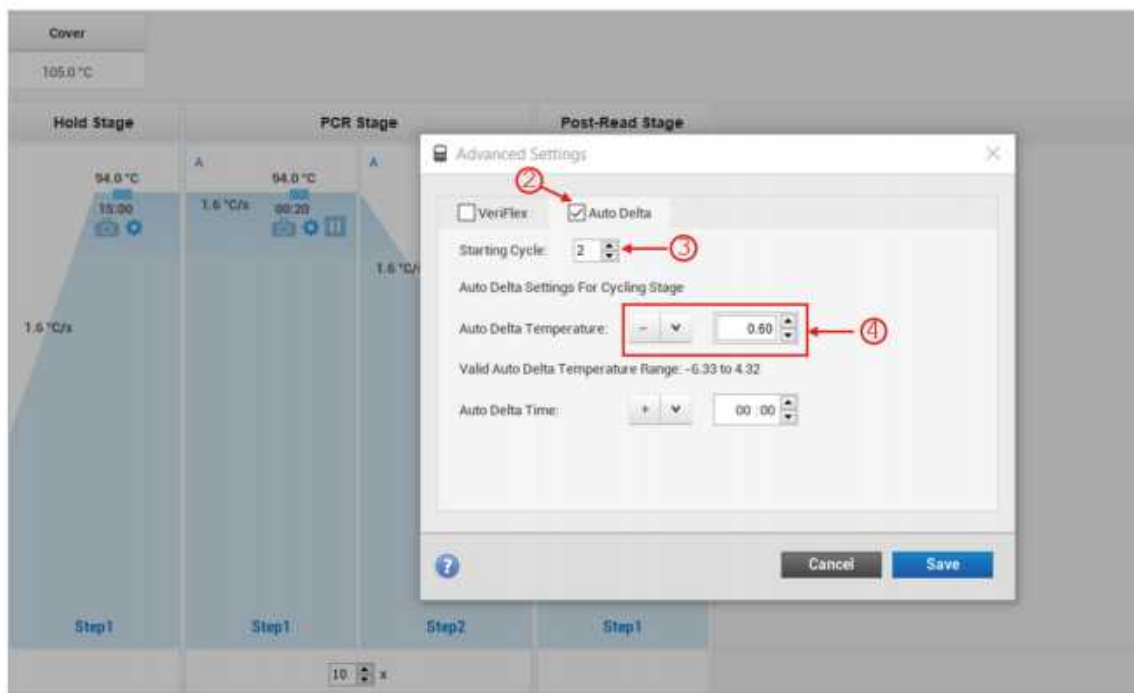


步骤2：如上PCR stage需启用Auto Delta功能，以实现Touchdown PCR。

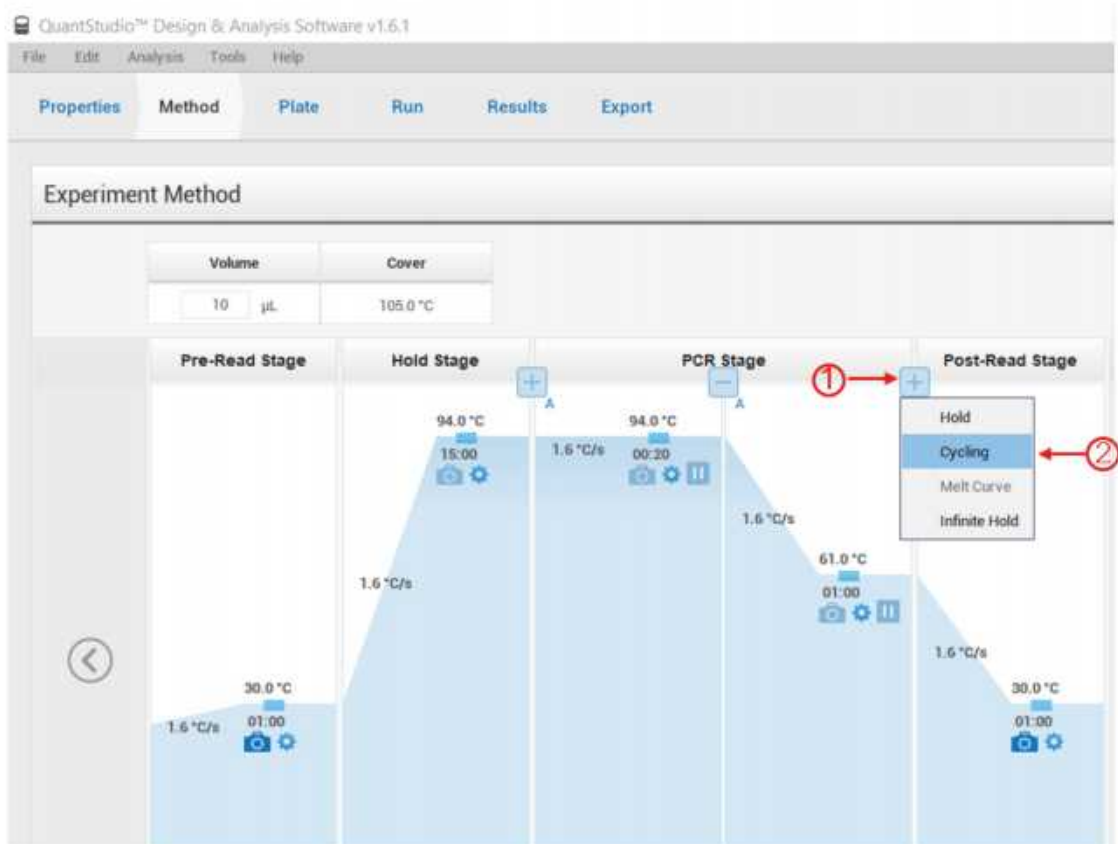
- ① 点击对应步骤温度(61°C)下的齿轮标志(⚙️)打开Advanced Settings窗口；
- ② 勾选Auto Delta；
- ③ 设置起始循环(从第2个循环开始)；
- ④ 设置每个循环降低的温度(每个循环降低0.6°C)。

最后点击Save保存即可完成设置。





步骤3: 选中上述程序的PCR Stage, 点击边框处出现的① $\oplus$, 选择②Cycling, 增加一个PCR Stage。



步骤4：按照程序设置新增加PCR Stage中的反应温度、时间和循环数。

最后的程序设置如下图：



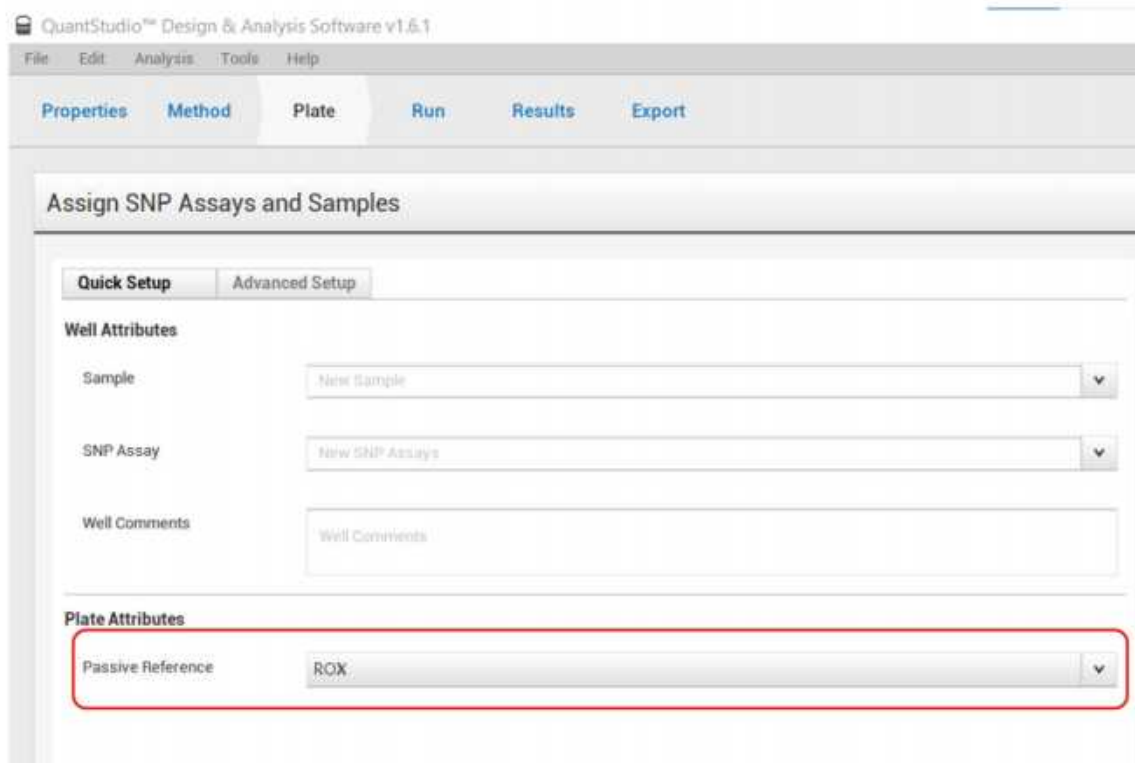
注意：

- ① 确认共有5个Stage，核对每一步温度、时间以及循环数；
- ② 确认Auto Delta功能开启；
- ③ 确认Pre-Read和Post-Read采集信号都处在打开状态；
- ④ PCR过程中无需采集信号。

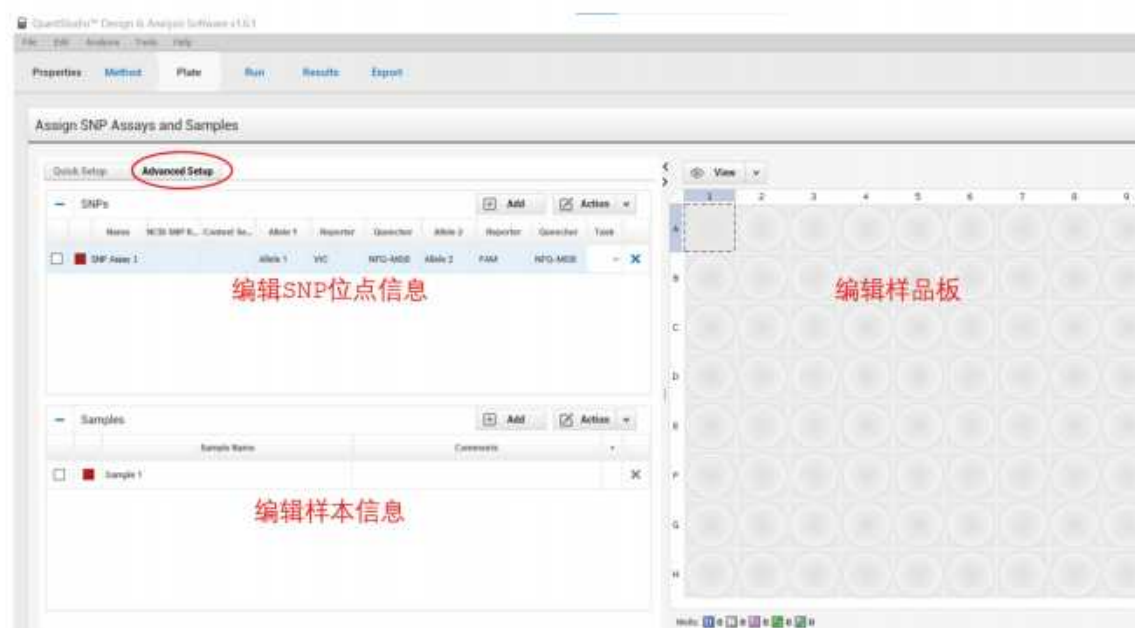
4.3 反应板设置

设置好反应程序后，点击导航栏的Plate，进入反应板设置界面。

步骤1：在Quick Setup界面中，确认Passive Reference选择了ROX (默认是ROX)。

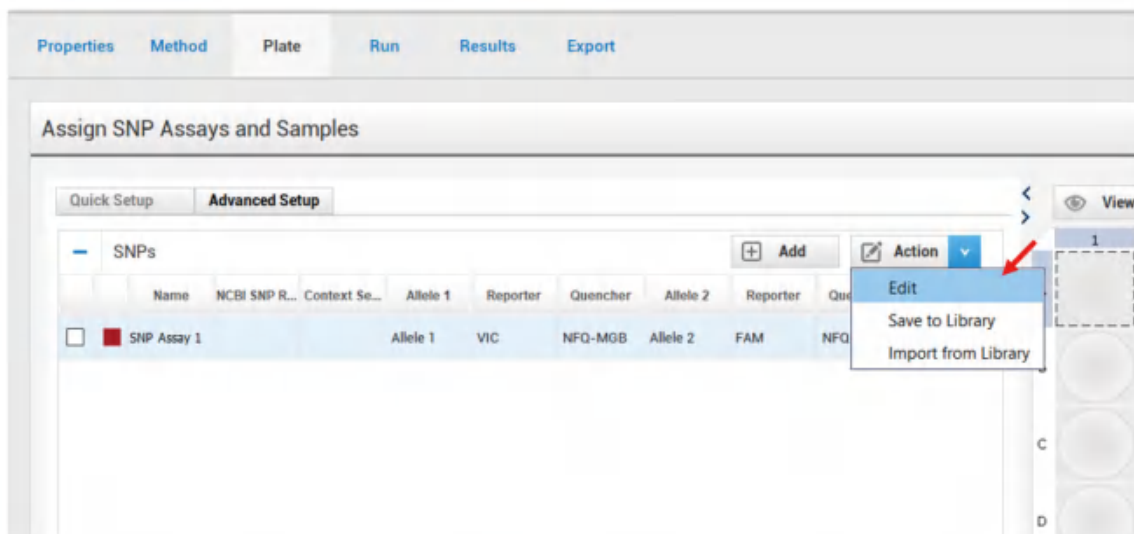


步骤2: 点击Advanced Setup, 编辑SNP信息、样本名称和样品板信息。



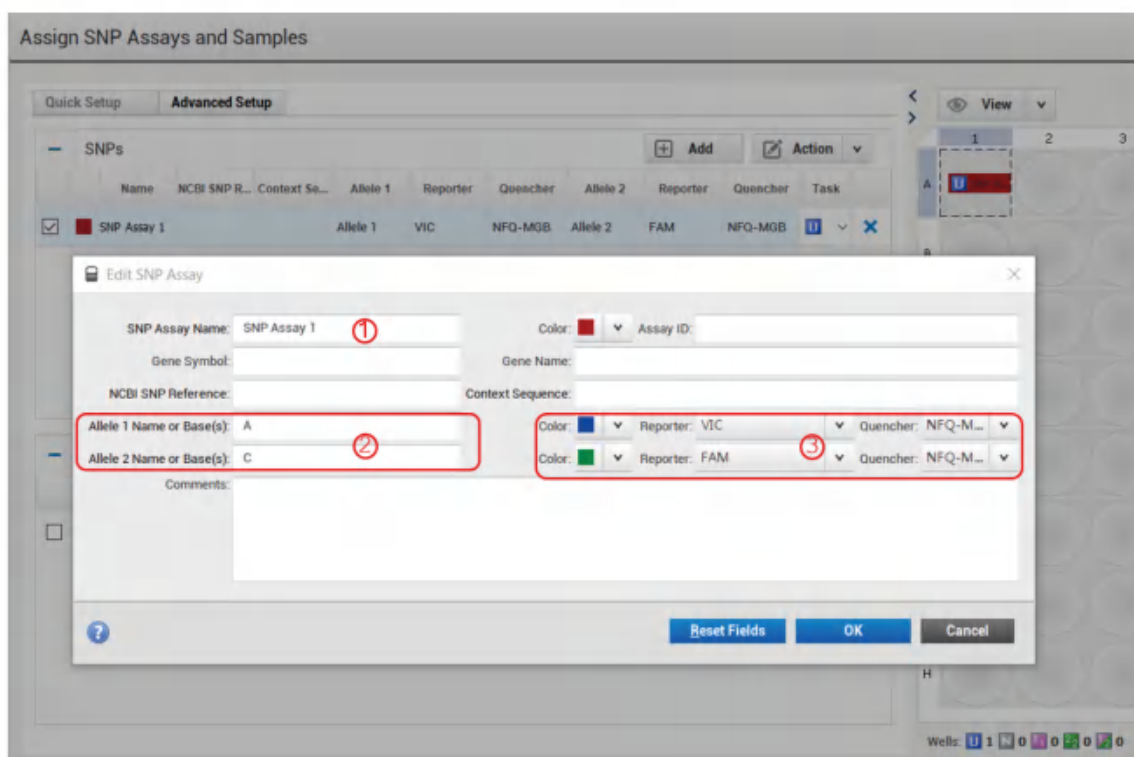
- 编辑SNP位点信息

选中需要编辑的SNP (如默认的SNP Assay1), 在SNPs框内单击右上角的Action, 在下拉菜单中选择Edit进入SNP assay编辑界面。



在①SNP Assay Name中填写待测SNP位点名称；在②Allele 1 / Allele 2 Name中输入待测位点碱基名称；在③两个等位基因的Reporter分别选择VIC和FAM；Quencher选择NFQ-MGB。(KASP实际使用的报告基团分别为FAM和HEX，如果QuantStudio 3 & 5仪器没有校准过HEX，此处可以选VIC来代替HEX)。

设置完成后点击OK。



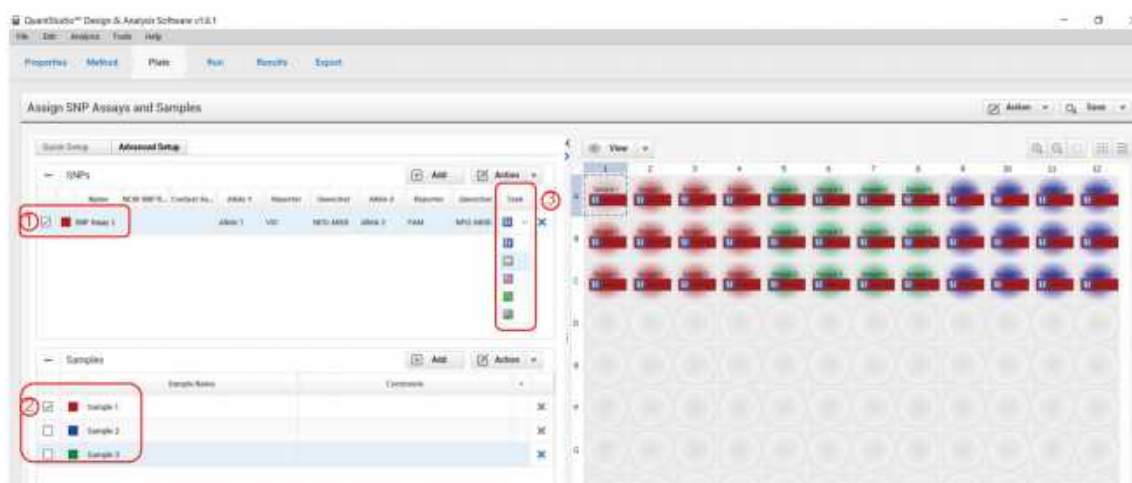
- 编辑样本名称

在Samples框中，单击Sample Name编辑样品名称，点击右上角的Add键添加新的Sample。



步骤3：设置完SNP Assay和Sample后，将其分配至右侧的反应孔中。

利用鼠标单选或拖拽以选择反应孔，然后勾选左侧的对应的① SNPs及② Samples，同时在③ Task选项中设定该反应孔的类型(U代表未知样本，N代表阴性对照，、、 分别代表三种基因型的阳性对照)。

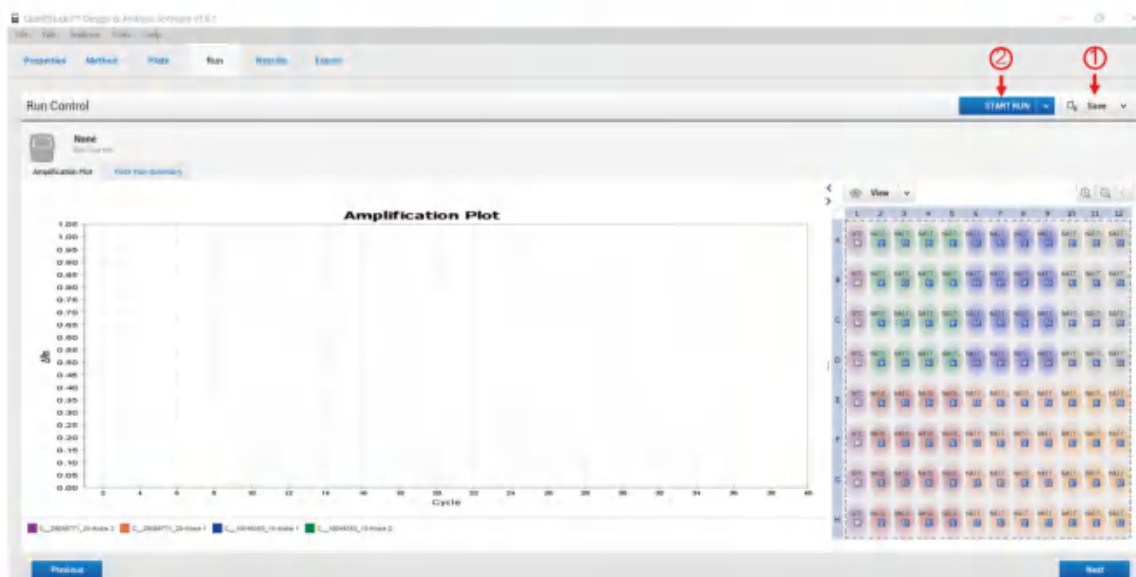


此外，也可以通过点击菜单栏的File，然后选择Import Plate Setup，来导入布板信息。

4.4 运行程序(包括扩增前读板和扩增后读板)

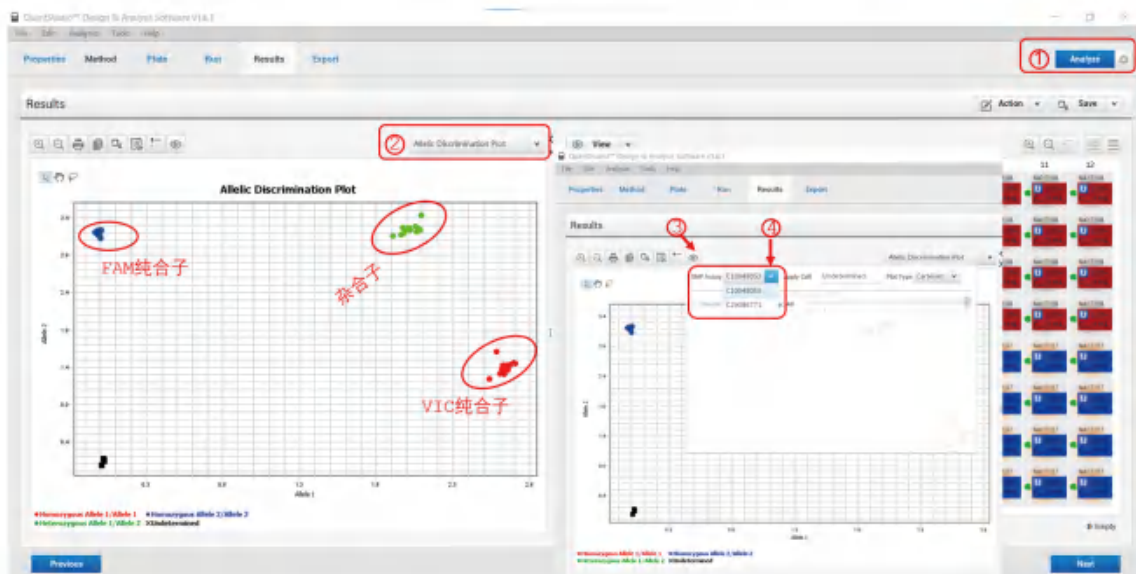
当设置好实验属性、反应板和运行程序，就可以运行实验了。

点击Run进入运行界面，点击①Save保存文件，然后点击②START RUN下的仪器序列号开始运行实验。

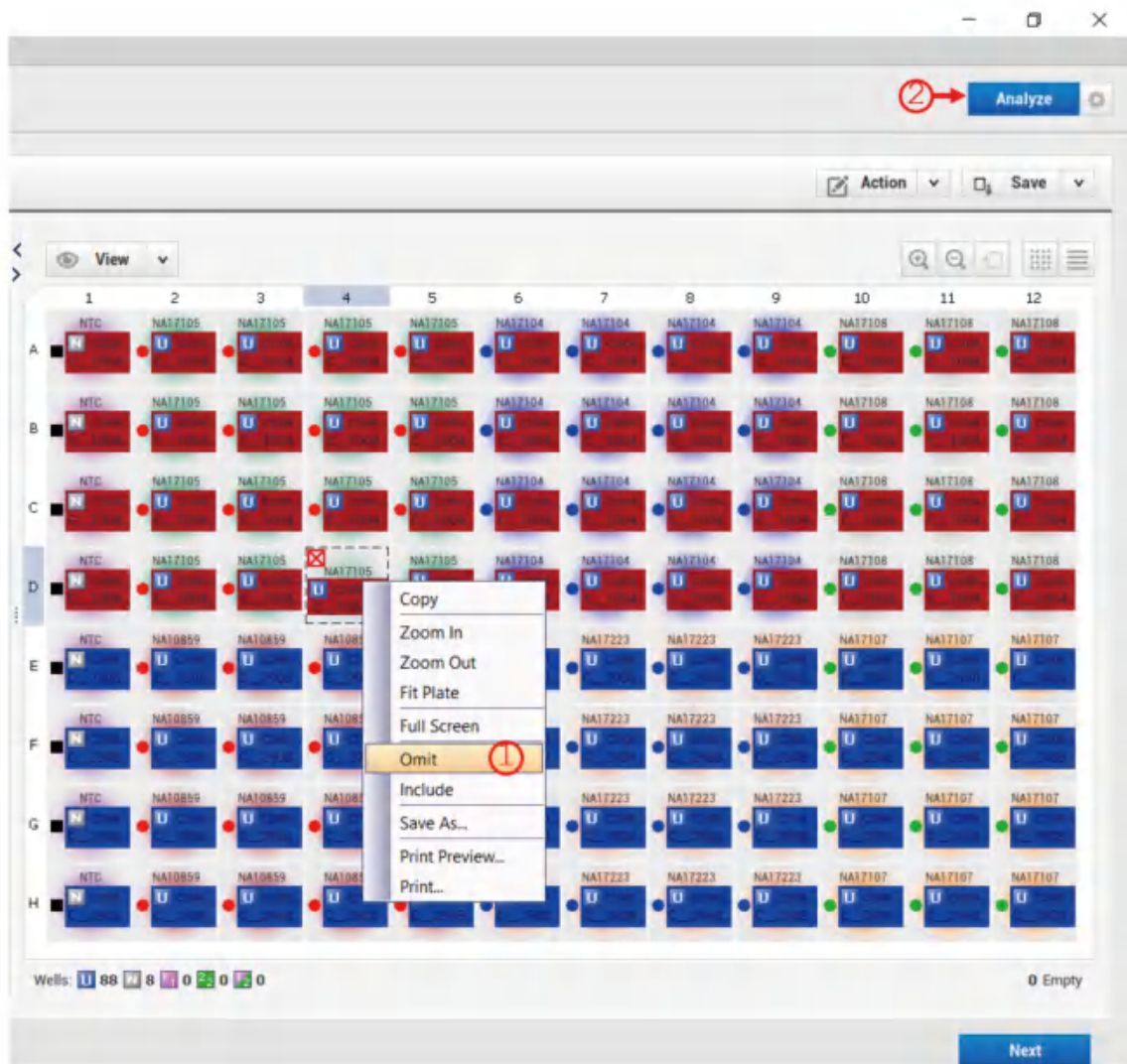


4.5 结果分析

实验运行结束后，进入Results界面，点击右上角的①Analyze键分析数据并查看②Allelic Discrimination Plot。点击③，在④SNP Assay中可查看其他SNP的基因分型图。正常情况下，等位基因分型图应呈现清晰的聚类分布(如下图所示)。



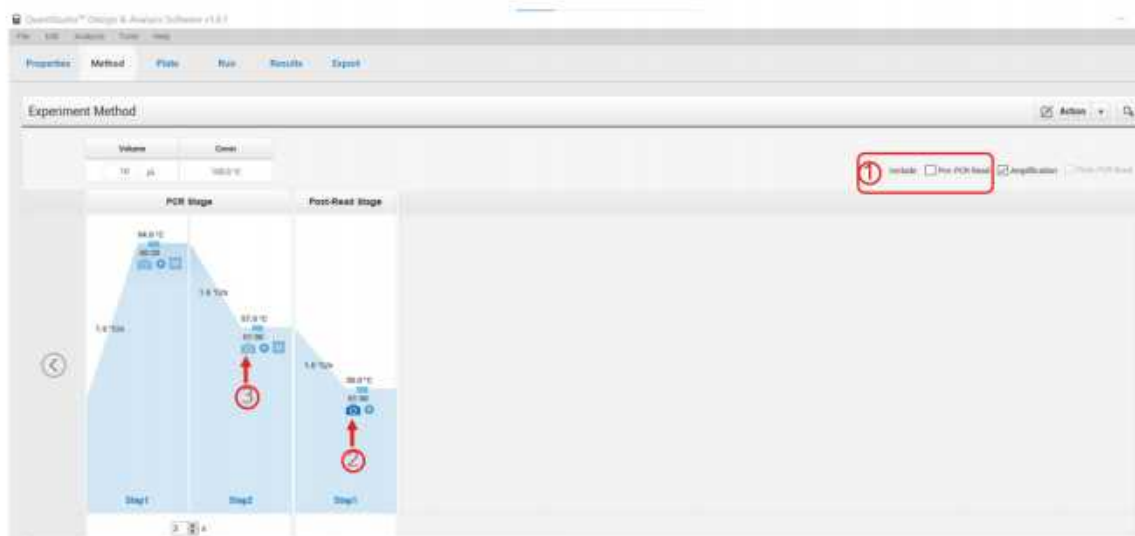
如果观察到异常孔结果(比如因为加样误差导致的离散孔)，可以从分析中排除这些样本。右键单击异常孔，①选择Omit；然后②点击右上角的Analyze键重新分析数据。



4.6 (可选)再次扩增反应板(Recycling)

- 如果经过初始的扩增反应后，聚类效果不理想的话，可以在QuantStudio 3 & 5上再次扩增该反应板，并重新采集扩增后的荧光数据(Post-Read)。
- 需创建一个包含KASP再次扩增反应条件的实验文件。
- KASP Recycling PCR运行程序如下：

步骤	温度	时间	循环次数	说明
1	94°C	20秒	3	降温至低于40°C，采集荧光信号
2	57°C	1分钟		
3	30°C	1分钟	1	



- ① Recycling PCR程序中不需要Pre-PCR Read步骤，因为反应板已经扩增过，并积累了荧光信号；
- ② 确认相机图标为亮蓝色状态，以保证Post-PCR Read步骤采集信号；
- ③ PCR循环步骤相机图标为灰色状态，勿需采集信号。

再次扩增反应板的结果可以在QuantStudio Design & Analysis Software软件的Results菜单下点击Allelic Discrimination Plot查看(具体参考4.5)。

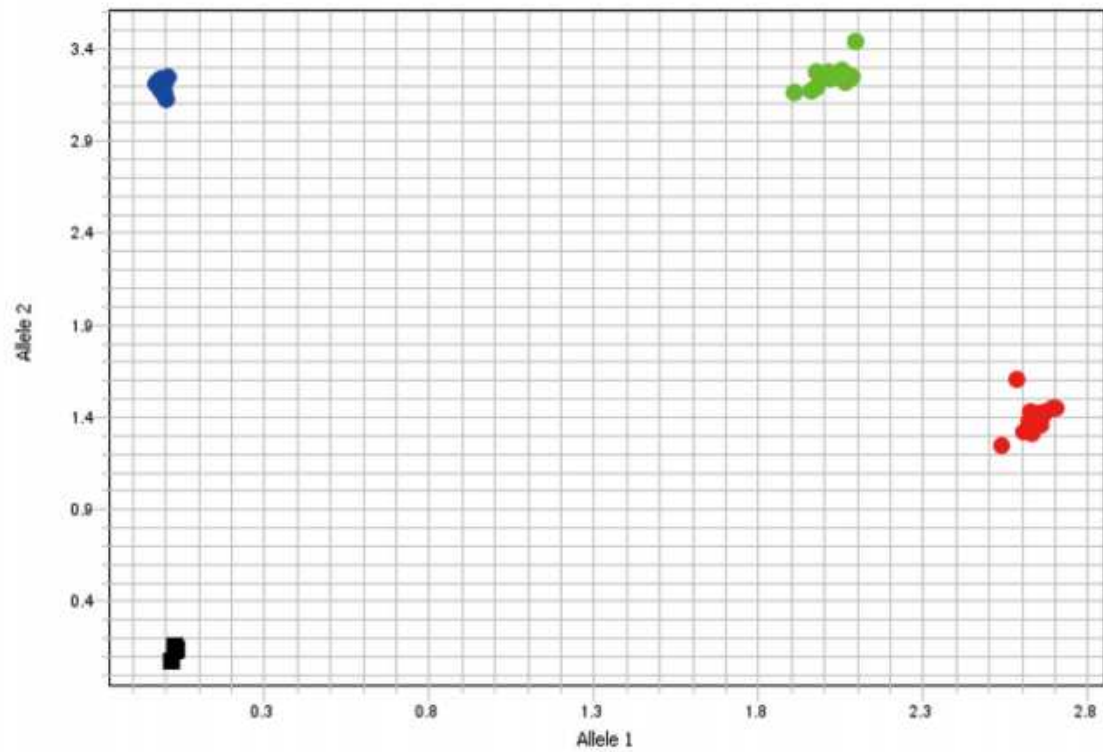
4.7 运行KASP试用试剂盒

如果您要在QuantStudio 3 & 5仪器上运行KASP试用试剂盒，实验设置等请参考试剂盒内说明书，本指南可以用来辅助您完成仪器和配套软件上的相应设置。

运行结束后，KASP试用试剂盒的结果如下图所示：



Allelic Discrimination Plot



● Homozygous Allele 1/Allele 1 ● Homozygous Allele 2/Allele 2
● Heterozygous Allele 1/Allele 2 X Undetermined

赛默飞世尔科技

上 海

上海市浦东新区新金桥路27号3,6,7号楼
邮编 201206
电话 021-68654588

成 都

成都市临江西路1号川投大厦1406室
邮编 610041
电话 028-65545388*5300

南 京

南京市中央路201号金茂广场南楼1103室
邮编 210000
电话 021-68654588*2901

北 京

北京市东城区北三环东路36号环球贸易
中心C座7层/8层
邮编 100013
电话 010-87946888

沈 阳

沈阳市沈河区惠工街10号卓越大厦3109室
邮编 110013
电话 024-31096388*3901

西 安

西安市高新区科技路38号林凯国际大厦
1006-08单元
邮编 710075
电话 029-84500588*3801

广 州

广州国际生物岛寰宇三路36、38号合景
星辉广场北塔204-206单元
邮编 510000
电话 020-82401600

武 汉

武汉市高新四路22号58众创光谷产业园A座1楼2-5楼
邮编 430075
电话 027-59744988*5401

欲了解更多信息，请扫描二维码关注我们的微信公众平台与官方网站。

赛默飞世尔科技在全国共有14个商业办公室。本资料中的信息，说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。



赛默飞
官方微信



赛默飞
基因科学中国
官方微信

免费 800 820 8982
服务电话 400 820 8982
www.thermofisher.cn

ThermoFisher
SCIENTIFIC