

Applied Biosystems QuantStudio 6 & 7 Flex 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	反应板设置	7
4.3	KASP反应程序设置	10
4.4	运行程序(包括扩增前读板和扩增后读板)	14
4.5	结果分析	14
4.6	(可选)再次扩增反应板	15
4.7	运行KASP试用试剂盒	17

1 指南简介

本指南旨在指导用户如何在Applied Biosystems QuantStudio 6 & 7 Flex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 6 & 7 Flex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 6 & 7 Flex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**

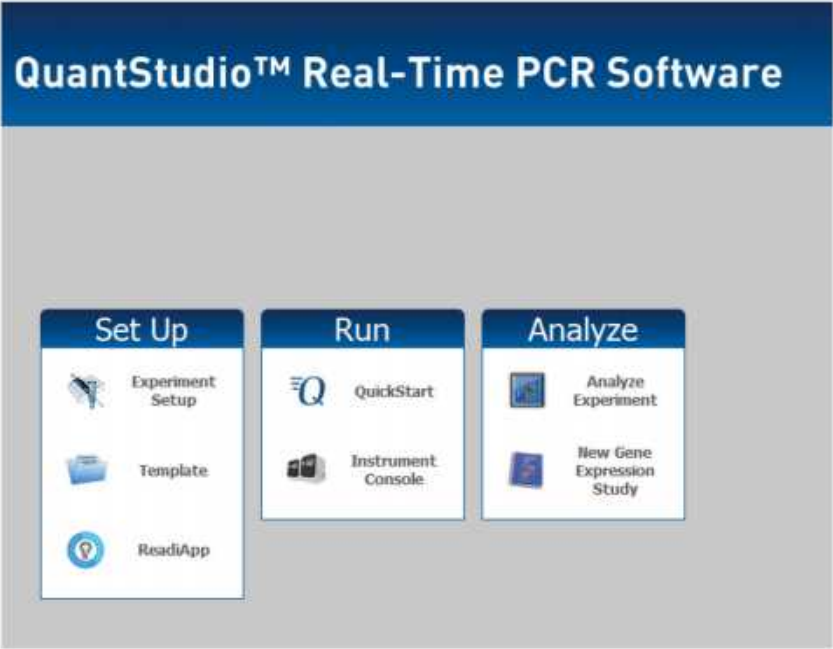
步骤	温度	时间	循环次数	说明
1	94℃	20秒	3	降温至低于40℃，采集荧光信号
2	57℃	1分钟		
3	30℃	1分钟	1	

**：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。

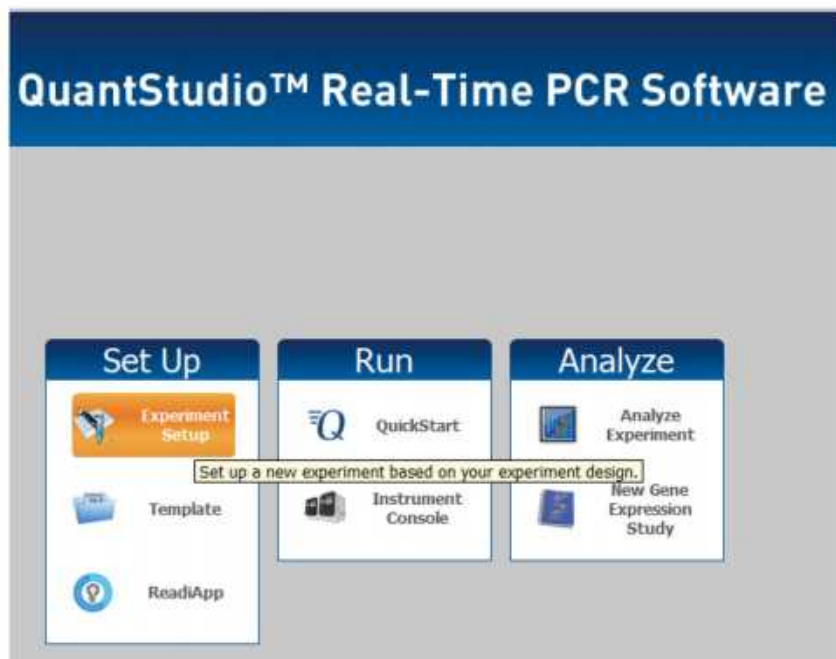
4 详细操作步骤

4.1 实验属性设置

打开QuantStudio 6 & 7 Flex仪器配套的QuantStudio Real-Time PCR Software。



在Set Up框中，单击Experiment Setup新建一个实验。



在Setup菜单中，第一项是设置Experiment Properties。



步骤1：输入实验名称(Experiment Name)。

(可选)填写反应板条码信息(Barcode)、用户名(User Name)以及与实验相关的备注(Comments)。

步骤2：根据使用的仪器型号，选择对应机型，如QuantStudio 7 Flex。



步骤3：选择与仪器一致的加热模块类型，如96-Well 0.2-mL。



步骤4：选择实验类型 —— 对于KASP实验，选择Genotyping。

What type of experiment do you want to set up?			
Standard Curve	Relative Standard Curve	Comparative Ct ($\Delta\Delta C_t$)	Melt Curve
☒ Genotyping	Presence/Absence		

步骤5：选择试剂类型 —— Other。

Which reagents do you want to use to detect the target sequence?	
TaqMan® Reagents	☒ Other

步骤6：选择升温速率 —— Standard。

What properties do you want for the instrument run?	
☒ Standard	☐ Fast
Include: ☒ Pre-PCR Read ☒ Amplification ☒ Post-PCR Read	

步骤7：勾选Pre-PCR Read和Amplification两项。

注意：基因分型实验会默认勾选Post-PCR Read。

步骤8：实验属性设置完成的界面如下图所示，以使用96孔(0.2 mL)模块的QuantStudio 7 Flex为例。

Experiment: KASP trial kit		Type: Genotyping	Reagents: Other
How do you want to identify this experiment?			
Experiment Name: KASP trial kit		Comments:	
Barcode:			
User Name:			
Which instrument type are you using to run the experiment?			
QuantStudio™ 6 Flex System	☒ QuantStudio™ 7 Flex System	VIA™ 7 System	
Which block are you using to run the experiment?			
384 Well	Array Card	☒ 96 Well (0.2mL)	Fast 96 Well (0.1mL)
What type of experiment do you want to set up?			
Standard Curve	Relative Standard Curve	Comparative Ct ($\Delta\Delta C_t$)	Melt Curve
☒ Genotyping	Presence/Absence		
Which reagents do you want to use to detect the target sequence?			
TaqMan® Reagents	☒ Other		
What properties do you want for the instrument run?			
☒ Standard	☐ Fast		
Include: ☒ Pre-PCR Read ☒ Amplification ☒ Post-PCR Read			

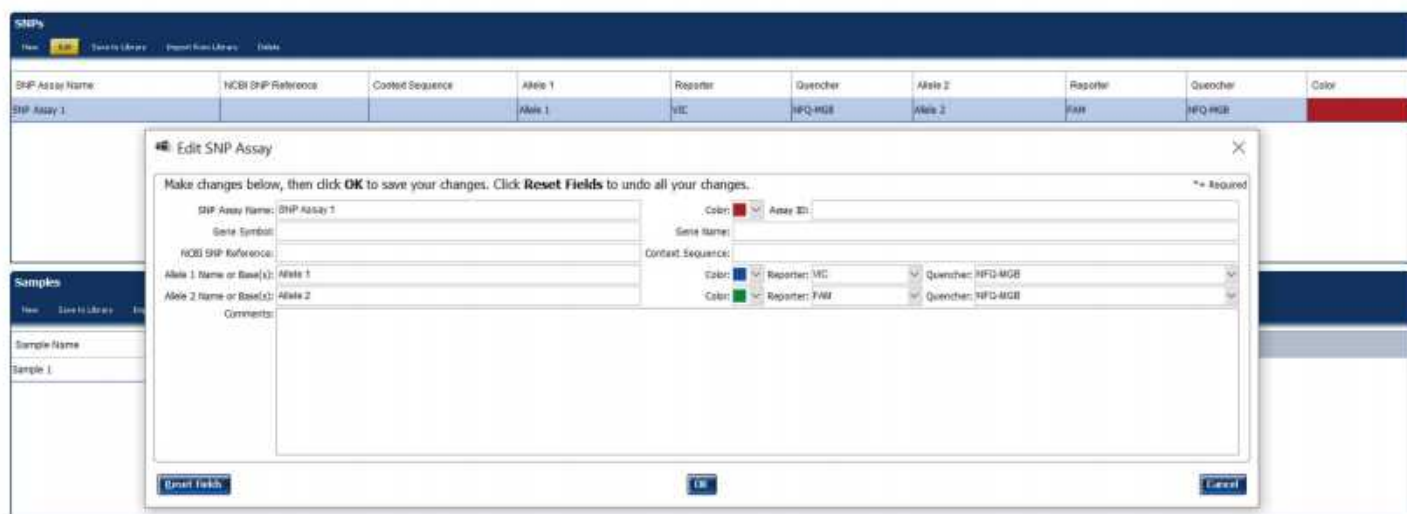
4.2 反应板设置

步骤1：点击Setup菜单中的Define项设置靶标和样本。



- SNPs框可用于定义即将运行的SNP Assay。

选择默认的SNP Assay 1，点击Edit并填写Edit SNP Assay窗口中的内容。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 6 & 7 Flex仪器没有校准过HEX，此处可以选VIC来代替HEX)。



- Samples框可用于定义实验中的DNA样本。

点击New添加新样本，在Sample Name中编辑样品名称，编辑好的样本会显示在列表里。

Samples		
New	Save to Library	Import from Library
Delete	Import from File	
Sample Name	Color	
Sample 1		▼
Sample 2		▼
Sample 3		▼
Sample 4		▼
Sample 5		▼
Sample 6		▼
Sample 7		▼

步骤2：确认选择了ROX作为参比荧光。



步骤3：设置完SNP Assay和Sample后，点击Setup菜单中的Assign项。



步骤4：将定义好的SNP Assay分配到反应板的对应孔中。

选中界面右侧的反应孔，然后在左侧的SNPs列表中勾选相应的SNP Assay。

SNPs		
	Name	Task
✓	SNP Assay 1	U

Plate Layout		Well Table											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B													
C													
D													
E													
F													
G													
H													

Wells: 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 96 Empty

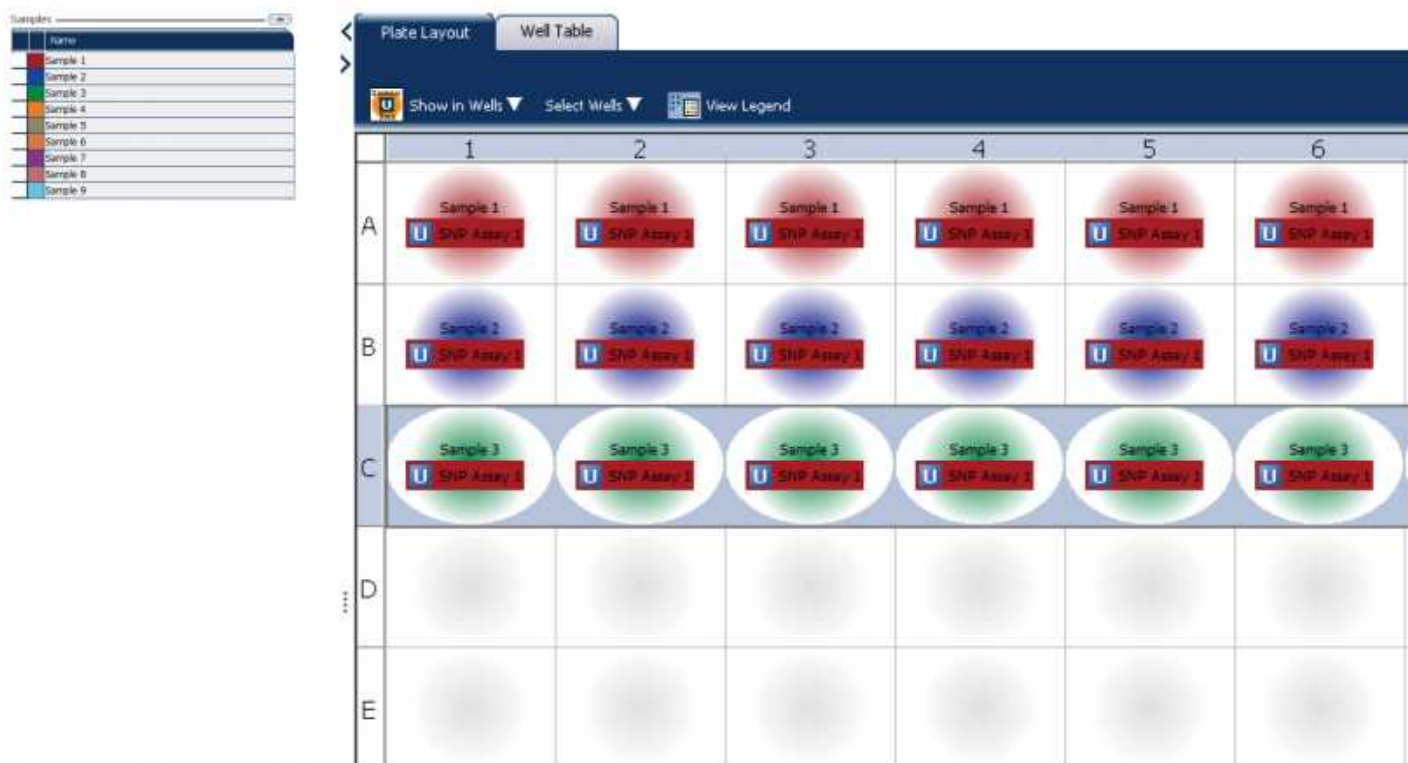
步骤5：为每个孔选择正确的Task。选中对应孔，并在SNPs-Task框的下拉菜单中选择对应的选项(U代表未知样本，N代表阴性对照，1/1、2/2、1/2分别代表三种基因型的阳性对照)。

SNPs		
	Name	Task
✓	SNP Assay 1	U

Plate Layout		Well Table											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
B		U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
C		U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
D													
E													
F													
G													
H													

Wells: 1 36 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 60 Empty

步骤6：将Samples分配到反应板的对应孔中。在界面右侧选中反应孔，并在左侧Samples列表中勾选相应的样本。孔的颜色将与分配的Sample一致。



此外，也可以通过点击Import快捷键，然后选择Import Plate Setup，来导入布板信息。

4.3 KASP反应程序设置

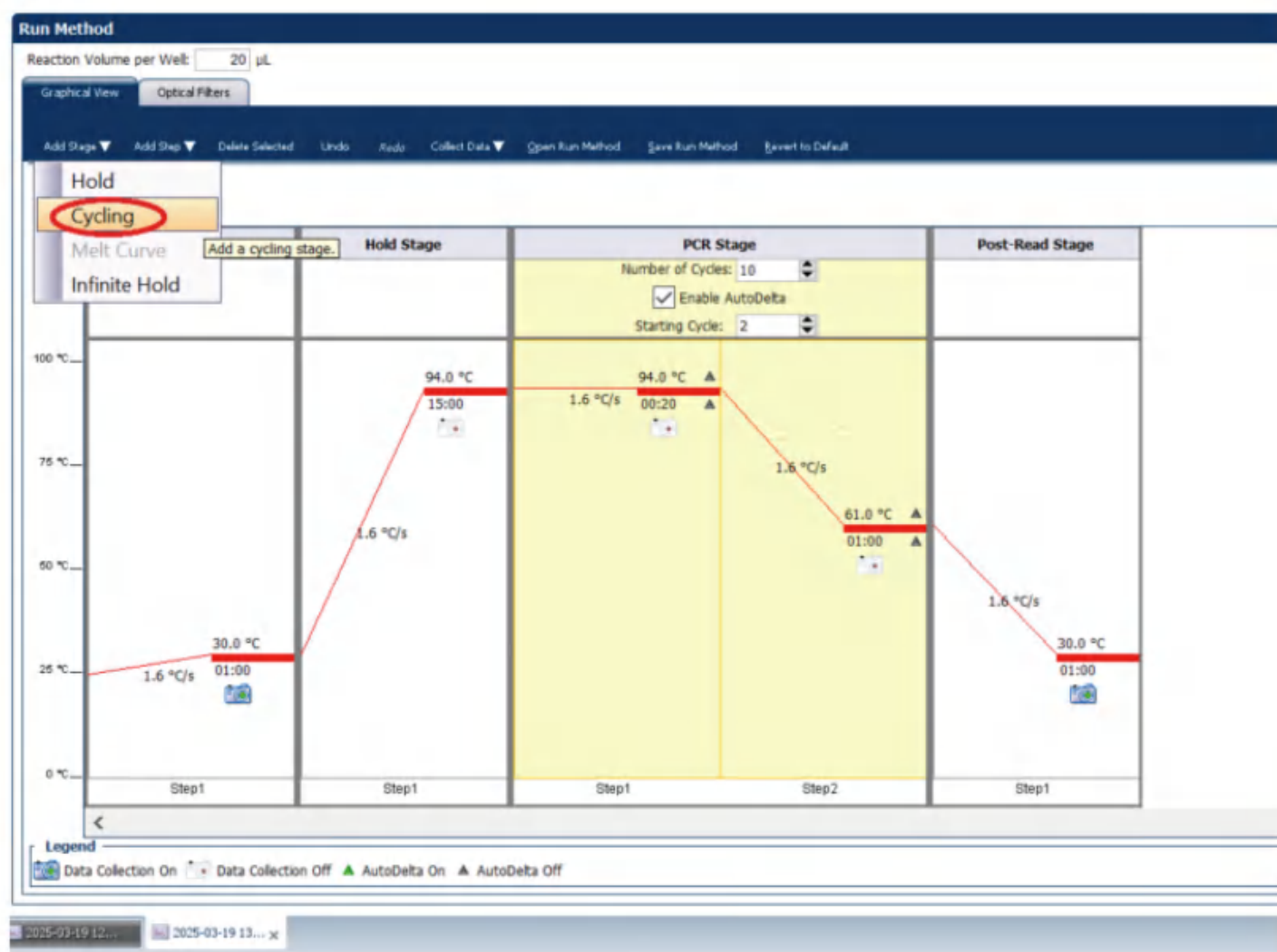
步骤1：设置好反应板后，点击Setup菜单中的Run Method，您可以在该界面编辑反应程序。



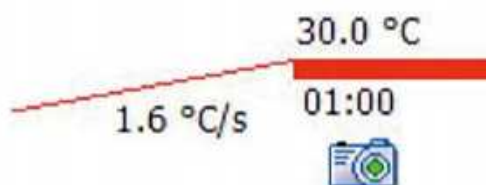
KASP实验要求的Genotyping运行程序如下：

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

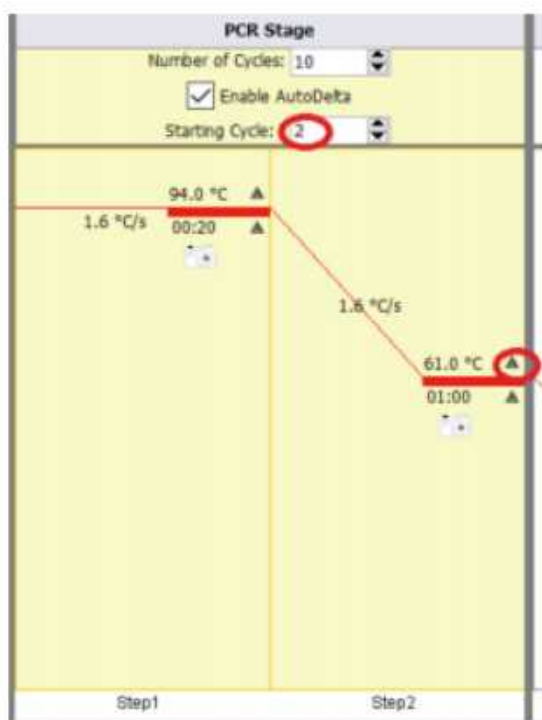
- 软件默认的Genotyping程序包括四个阶段：扩增前读板(Pre-Read)、保温阶段(Hold Stage)、PCR循环阶段(PCR Stage)和扩增后读板(Post-Read)。KASP实验需要在此基础上再添加一个PCR Stage。可以通过选中原有的PCR阶段，点击Add Stage菜单并选择Cycling (下图红圈处)进行添加。



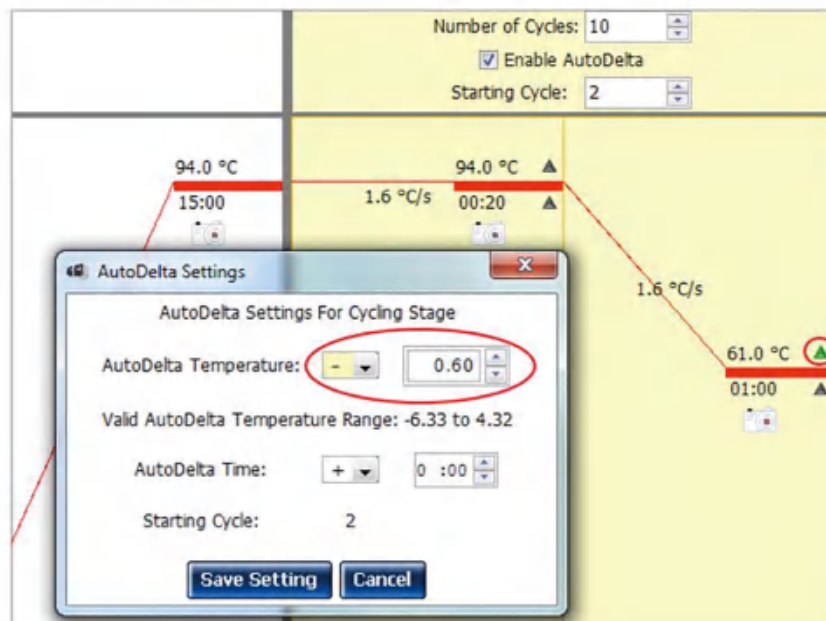
- 第一个PCR Stage是共10个循环的降落式PCR阶段，第二个PCR Stage是剩余26个循环的PCR扩增阶段。
- 按照KASP实验的反应程序对软件的Run Method页面进行设置。
- 软件默认的升降温速率为1.6°C/s，KASP实验不需要修改该参数。



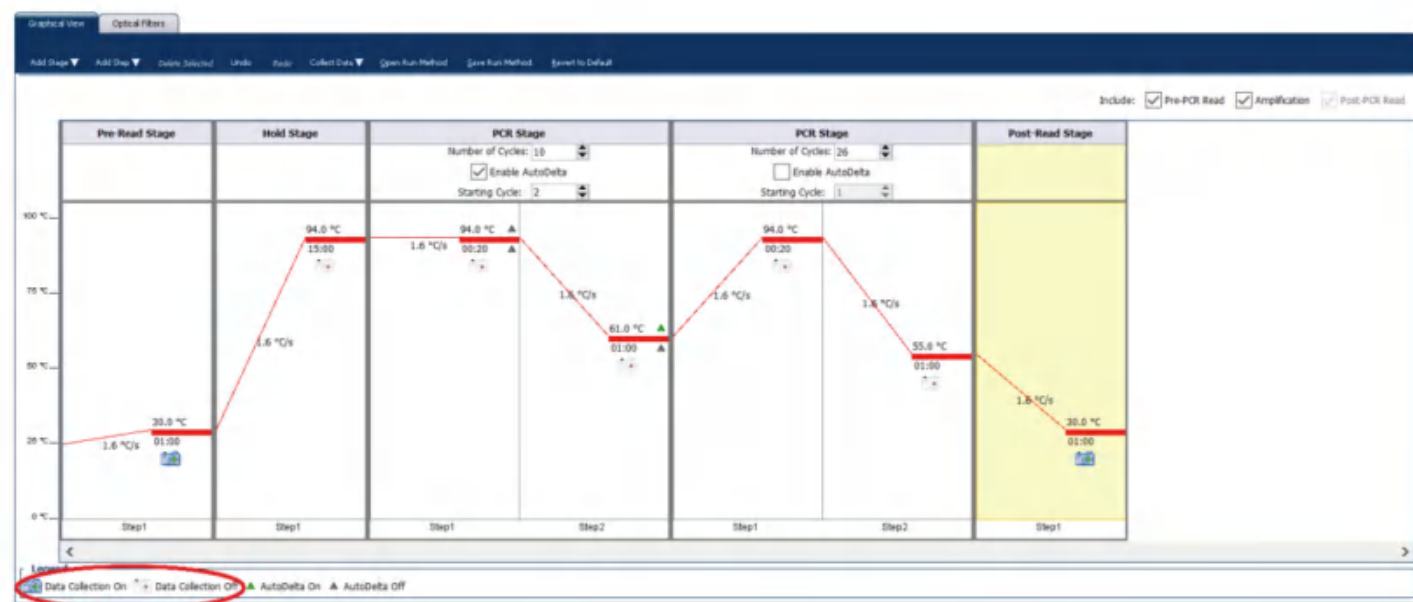
- 在设置降落式PCR阶段时，需要勾选相关循环阶段的Enable AutoDelta框。将Starting Cycle更改为2，即从第2个循环开始逐步降低温度。然后点击温度(61°C)旁边的灰色三角形，打开AutoDelta Settings窗口。



选择减号(表示递减温度), 温度设置为0.6 (下图红圈处)。这将确保在此循环阶段(10个循环)中每个循环温度下降0.6°C。点击Save Setting保存后返回运行方法窗口, 三角形将变为绿色, 表示已设置好了温度递减程序。



- 确保在Pre-Read阶段(30°C, 1分钟)和Post-Read阶段(30°C, 1分钟)开启了荧光信号采集(即有颜色)。PCR阶段(降落式PCR和剩余PCR循环阶段)无需采集信号。



在QuantStudio 6 & 7 Flex上运行KASP实验的程序如上图所示。

步骤2: 在反应体积栏输入准确的数值(LGC试剂推荐的反应体积为: 96孔板10 μ L, 384孔板5 μ L)。

Run Method

Reaction Volume per Well: 10 μ L

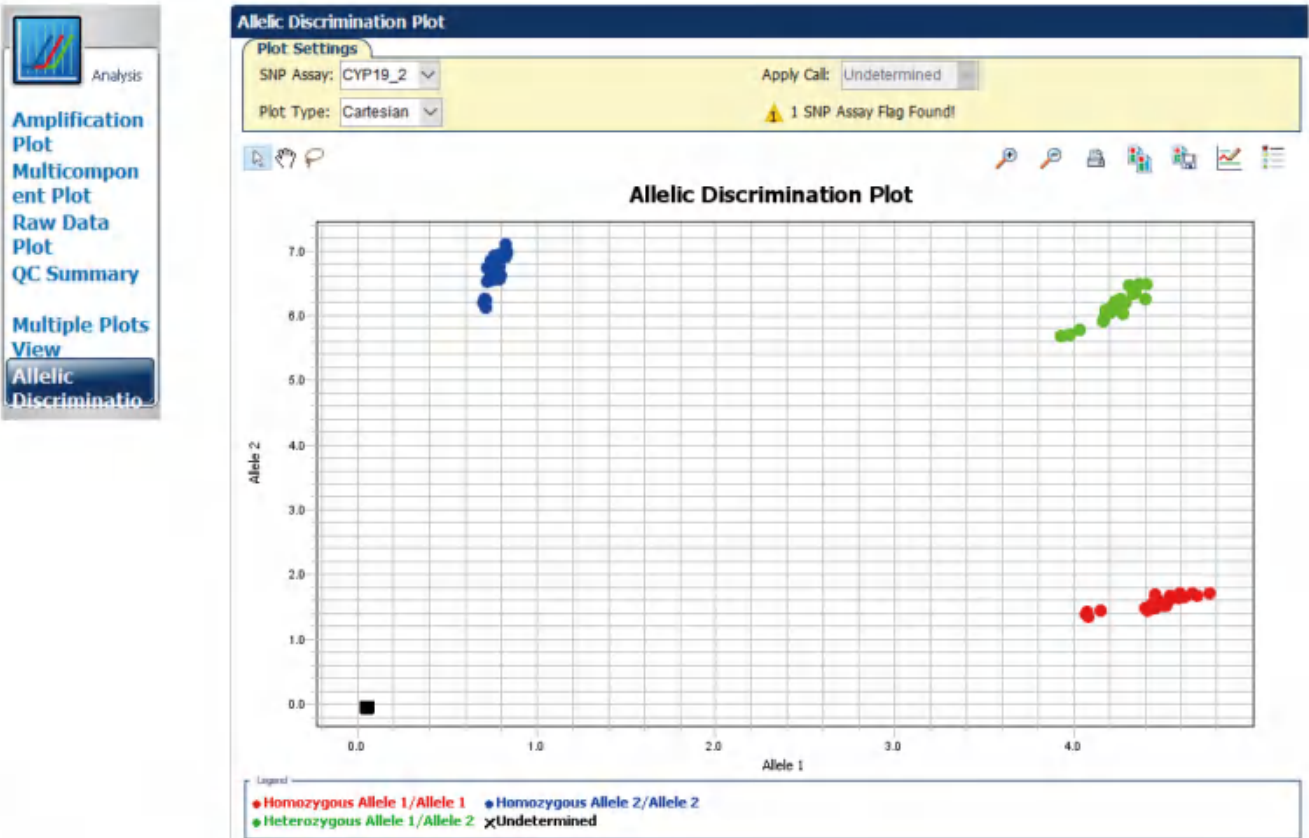
4.4 运行程序(包括扩增前读板和扩增后读板)

当设置好实验属性、反应板和运行程序, 就可以运行实验了。



4.5 结果分析

当实验运行结束后, 点击实验菜单的Analysis栏。
可以通过点击Allelic Discrimination Plot来查看基因分型图谱。



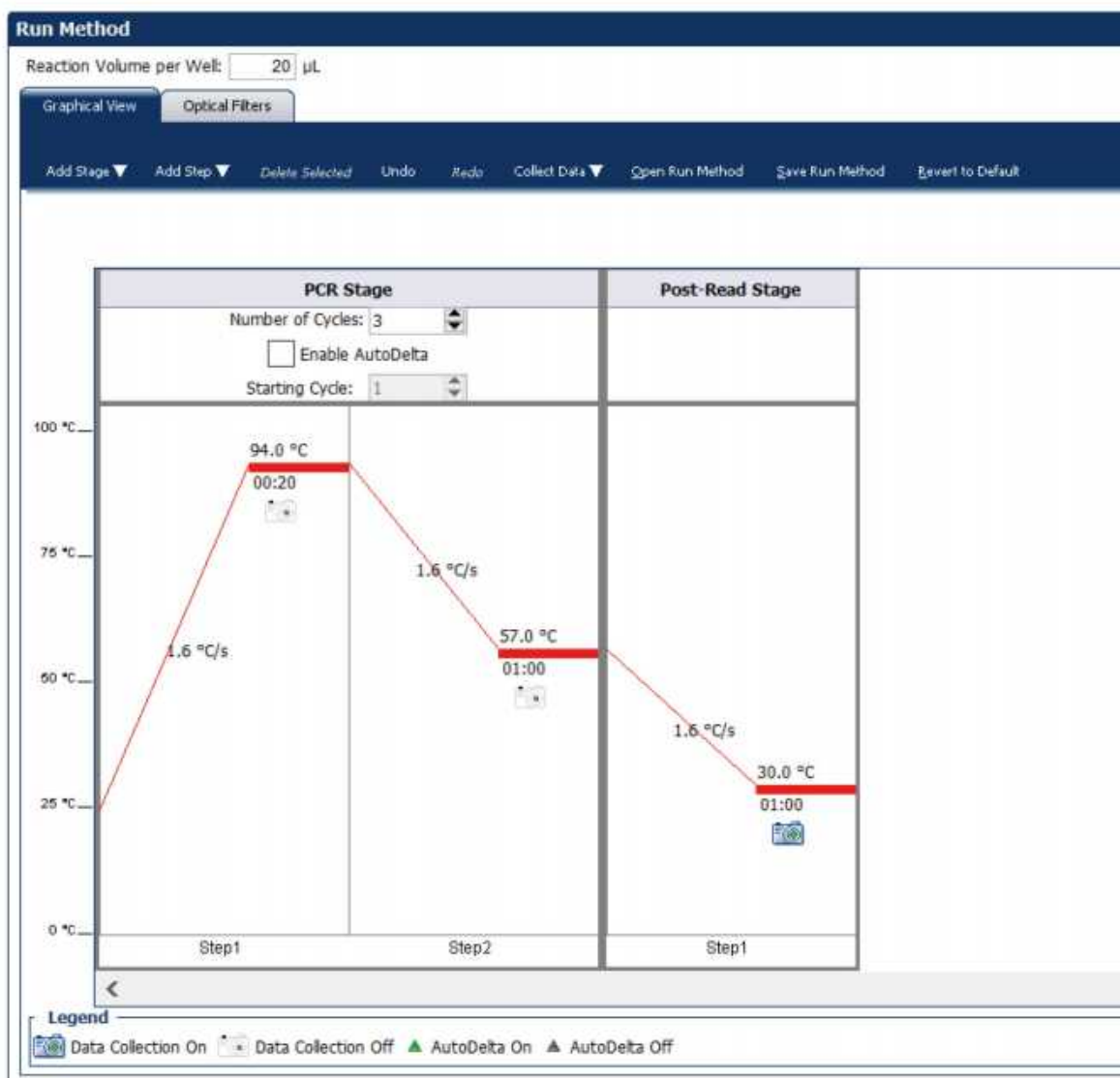
如果观察到异常孔结果(比如因为加样误差导致的离散孔)，可以从分析中排除这些样本。右键单击异常孔，选择Omit，然后点击右上角的Analyze键重新分析数据。



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 6 & 7 Flex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℃	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	

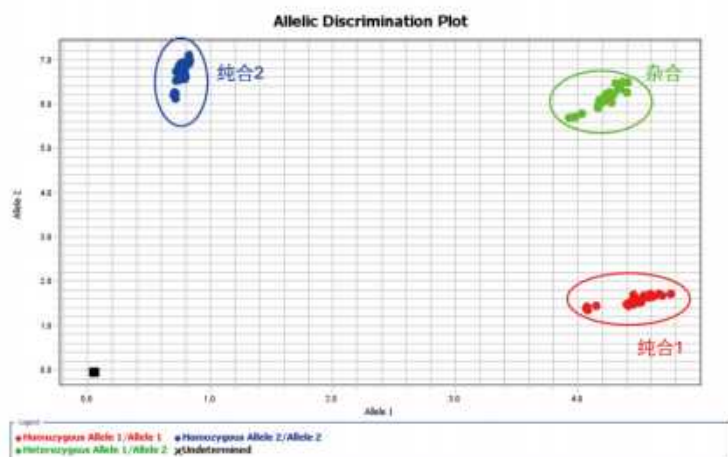


- 请注意：再次扩增反应板不需要进行扩增前读板(Pre-Read)。因为反应板已经扩增过，并积累了荧光信号。
- 再次扩增反应板的结果可以在QuantStudio Real-Time PCR Software软件的Analysis菜单下点击Allelic Discrimination Plot 查看(具体参考4.5)。

4.7 运行KASP试用试剂盒

如果您要在QuantStudio 6 & 7 Flex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：



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