

Applied Biosystems QuantStudio 6 & 7 Pro 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	6
4.3	反应板设置	9
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	14
4.6	(可选)再次扩增反应板	15
4.7	运行KASP试用试剂盒	16

1 指南简介

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

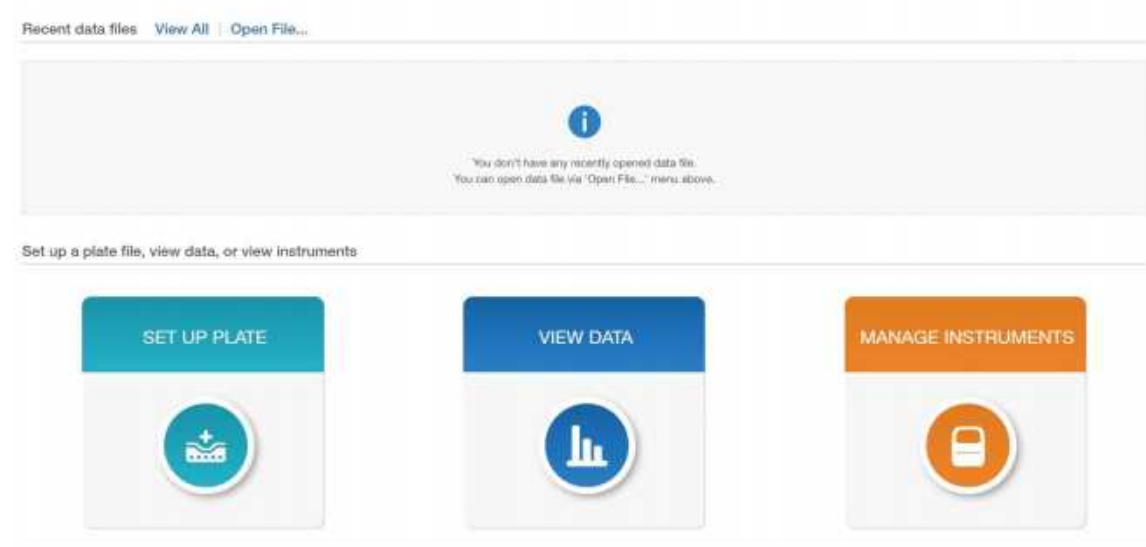
步骤	温度	时间	循环次数	说明
1	94℃	20秒	3	降温至低于40℃，采集荧光信号
2	57℃	1分钟		
3	30℃	1分钟	1	

**：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。

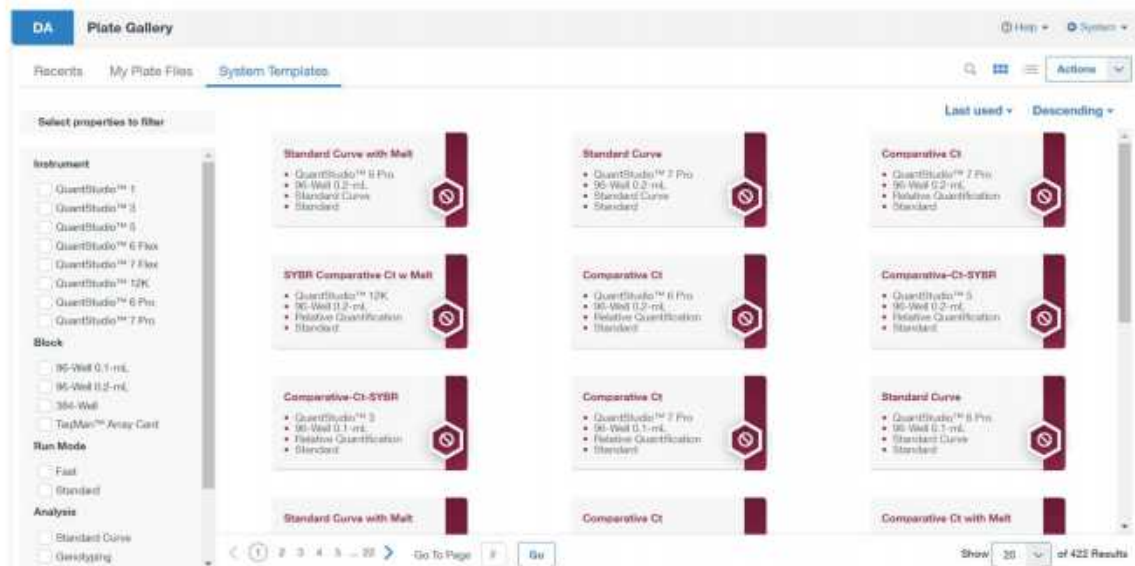
4 详细操作步骤

4.1 实验属性设置

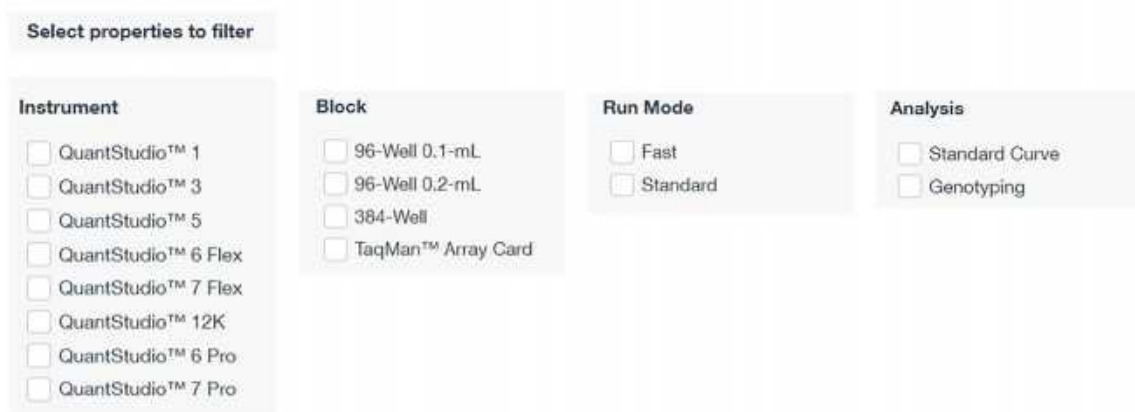
打开QuantStudio 6 & 7 Pro仪器配套的桌面软件Design & Analysis Software 2。



点击主页面上的SET UP PLATE模块，进入系统模板界面。该界面左侧为属性栏，右侧为系统模板文件。



属性栏包括仪器型号、加热模块类型、运行模式和分析方法四部分。



步骤1:

根据使用的仪器型号，选择对应机型，如**QuantStudio 6 Pro**。

步骤2:

选择与仪器一致的加热模块类型，如**96-Well 0.2-mL**。



步骤3：
KASP实验需要选择Standard反应模式。

Run Mode

☐ Fast

☒ Standard

步骤4：
KASP实验需要选择Genotyping分析方法。

Analysis

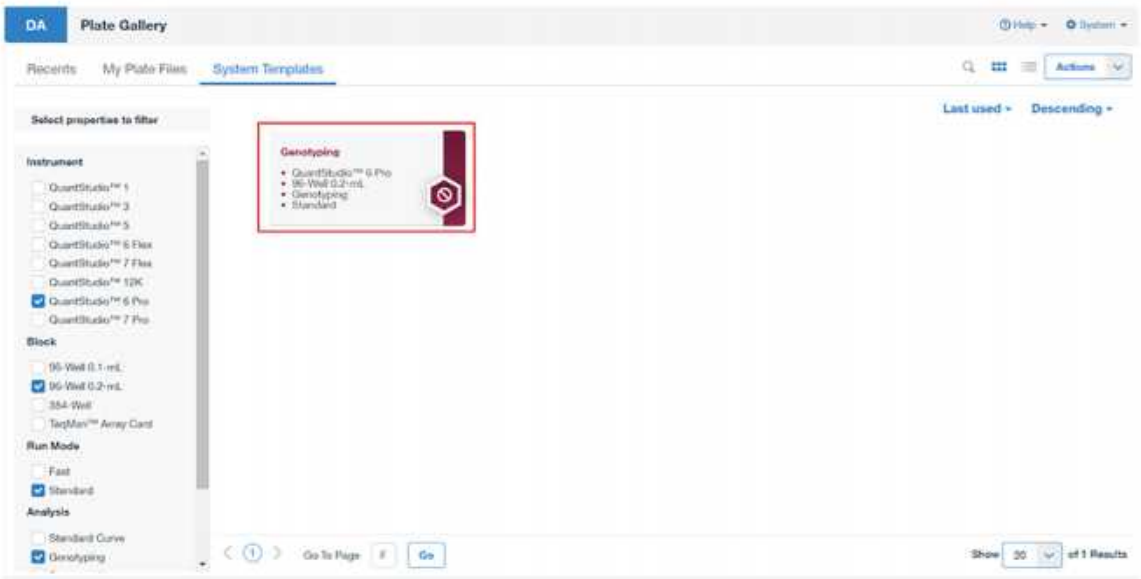
☐ Standard Curve

☒ Genotyping

☐ Presence Absence

☐ Relative Quantification

步骤5：
通过以上步骤筛选到名称为“Genotyping”的模板文件，点击进入实验设置页面。

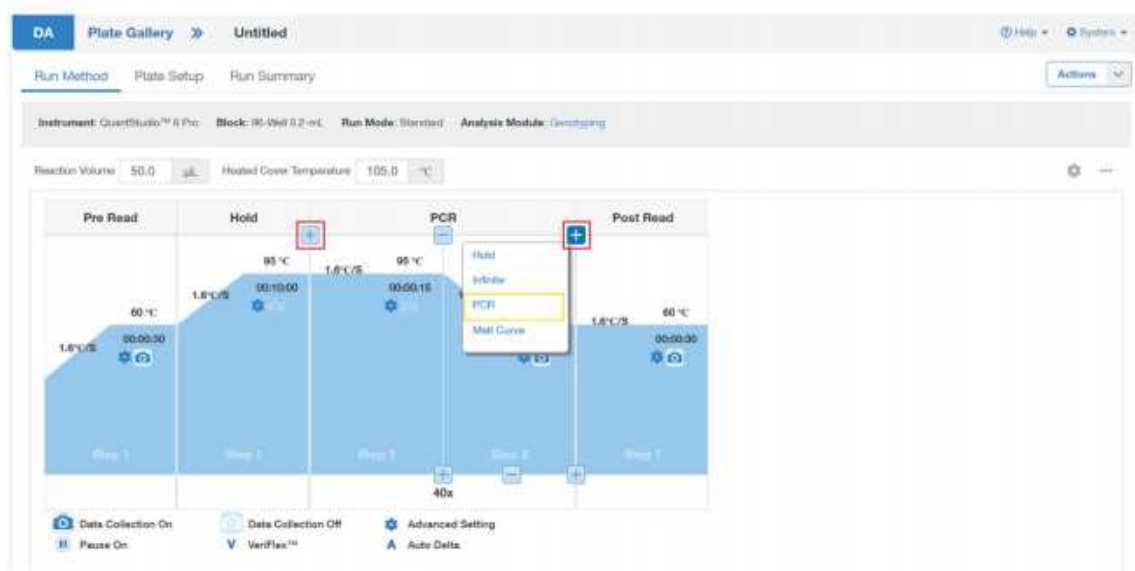


4.2 反应板设置

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

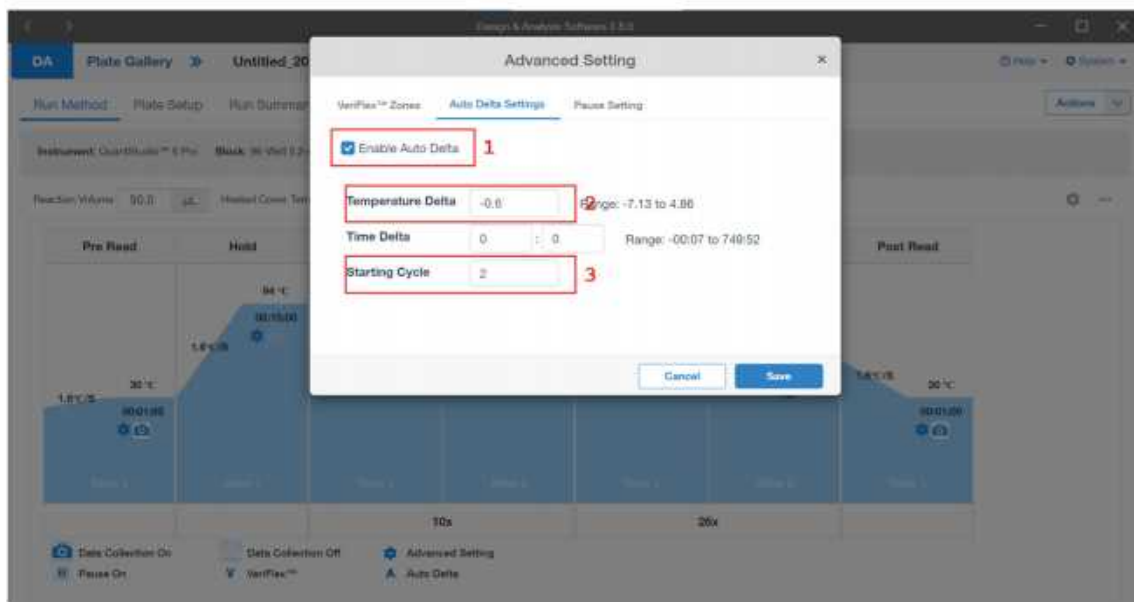
- 软件默认的Genotyping程序包括四个阶段：扩增前读板(Pre-Read)、保温阶段(Hold Stage)、PCR循环阶段(PCR Stage)和扩增后读板(Post-Read)。KASP实验需要在此基础上再添加一个PCR Stage。可以通过点击原有PCR Stage两边的“+”按钮(下图红框处)，选择PCR(下图黄框处)进行添加。



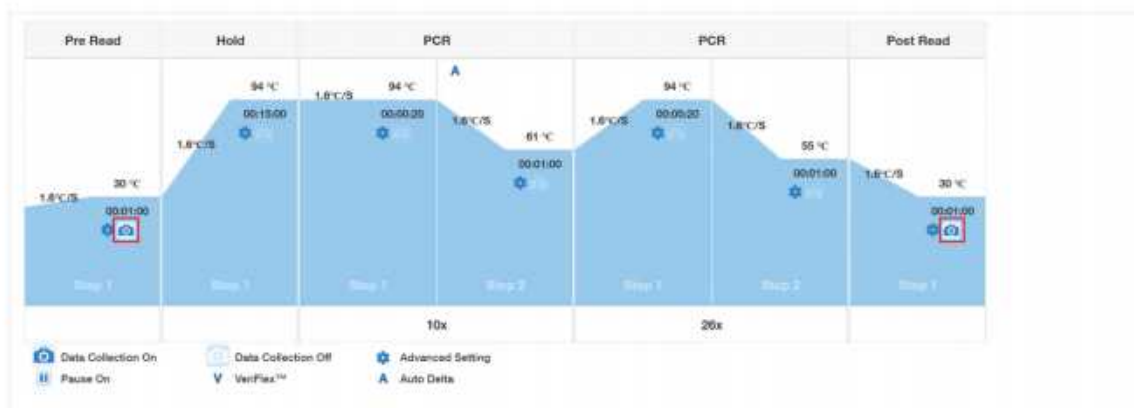
- 第一个PCR Stage是共10个循环的降落式PCR阶段，第二个PCR Stage是剩余26个循环的PCR扩增阶段。
- 按照KASP实验的反应程序对软件的Run Method页面进行设置。
- 软件默认的升降温速率为1.6°C/s，KASP实验不需要修改该参数。



- 在设置降落式PCR阶段时，需要点击对应步骤温度(61°C)下的齿轮标志(⚙️)，在Auto Delta Setting页面开启Enable Auto Delta功能(图中步骤1)，并输入每个循环温度改变的具体数值(-0.6°C，图中步骤2)，选择从第2个循环开始逐步降低温度(图中步骤3)，最后点击Save保存即可。



- 确保在Pre Read (30°C, 1分钟)和Post Read (30°C, 1分钟)阶段开启了荧光信号采集(图中红框), PCR阶段(降落式PCR和剩余PCR阶段)无需采集信号。



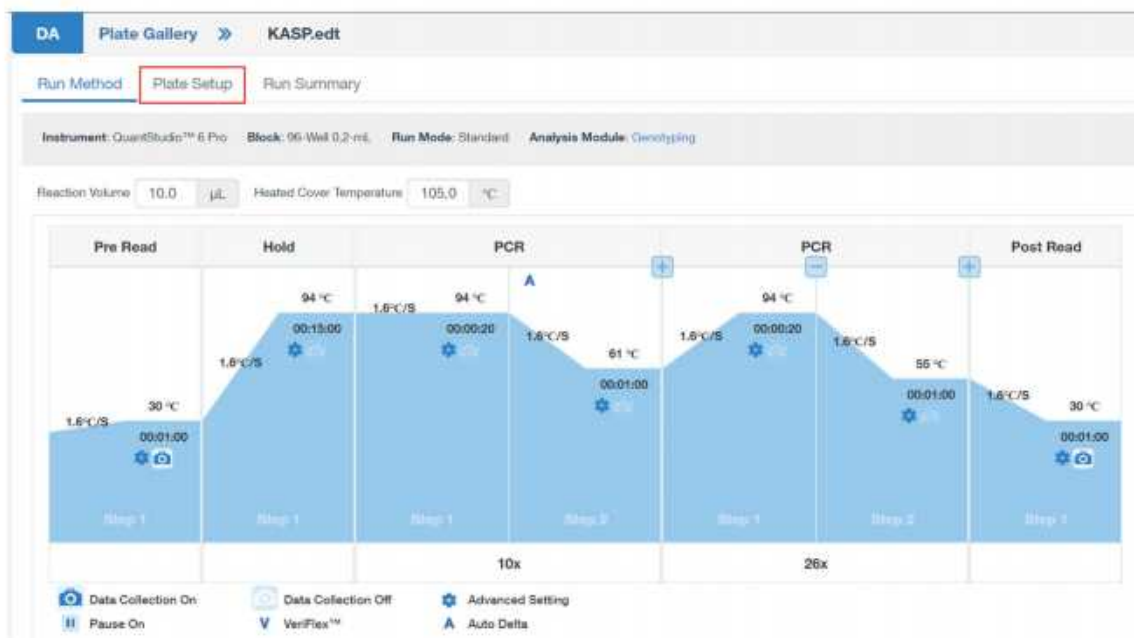
在QuantStudio 6 & 7 Pro上运行KASP实验的程序如上图所示。

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



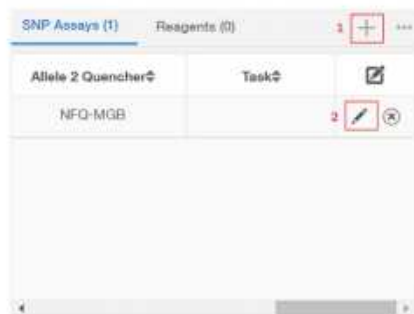
4.3 反应板设置

在设置好反应程序后，点击左上角导航栏的Plate Setup，进入反应板设置页面。



步骤1：在Plate Setup页面设置靶标和样本。

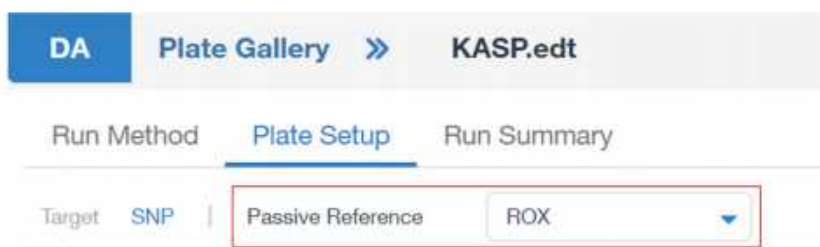
- 点击页面右下角SNP Assays栏右侧“+”按钮(图中编号1)，创建待检测SNP靶标，默认新建SNP靶标名称为“SNP Assay 1”。点击靶标栏的编辑按钮“✎” (图中编号2)，进入Edit SNP Assay页面，确认SNP位点两个等位基因的Reporter分别为FAM和VIC；Quencher为NFQ-MGB (图中编号3，KASP实际使用的报告基团分别为FAM和HEX，如果QuantStudio 6 & 7 Pro仪器没有校准过HEX，此处可以选VIC来代替HEX)。



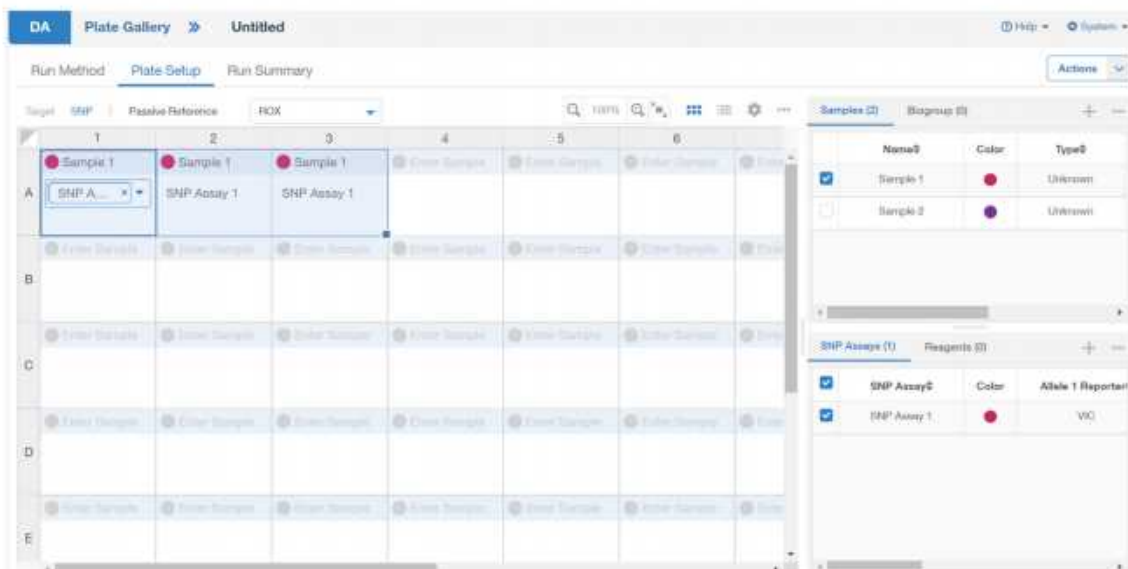
- 点击页面右上角Samples栏右侧“+”按钮(图中编号1)可以添加不同的样本名用来区分实验中检测的不同DNA样本(图中编号2)。



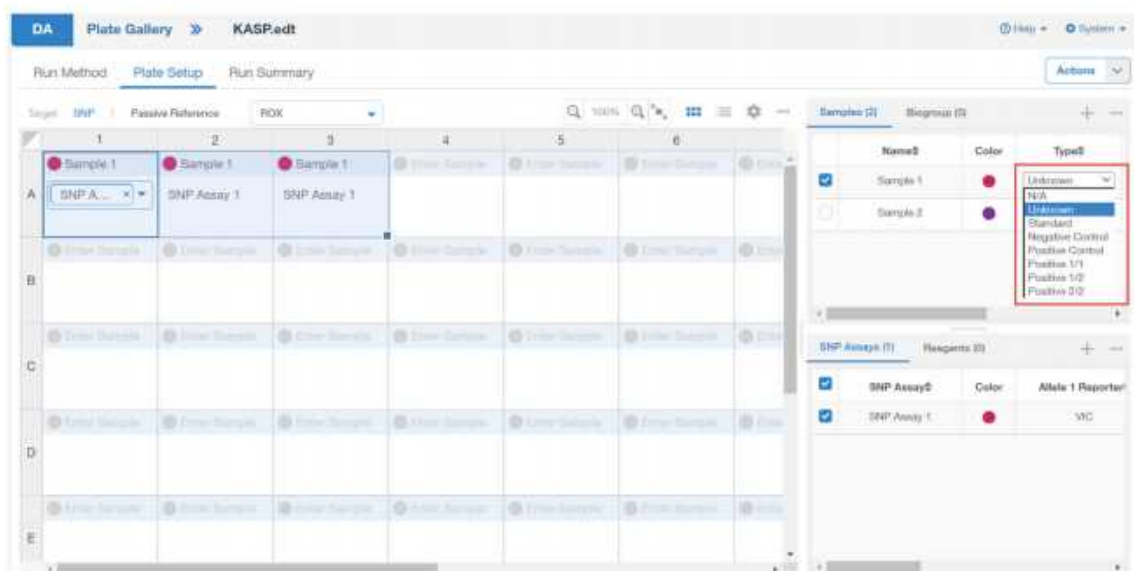
步骤2：确认反应板面上方的参比荧光项(Passive Reference)已选择ROX。



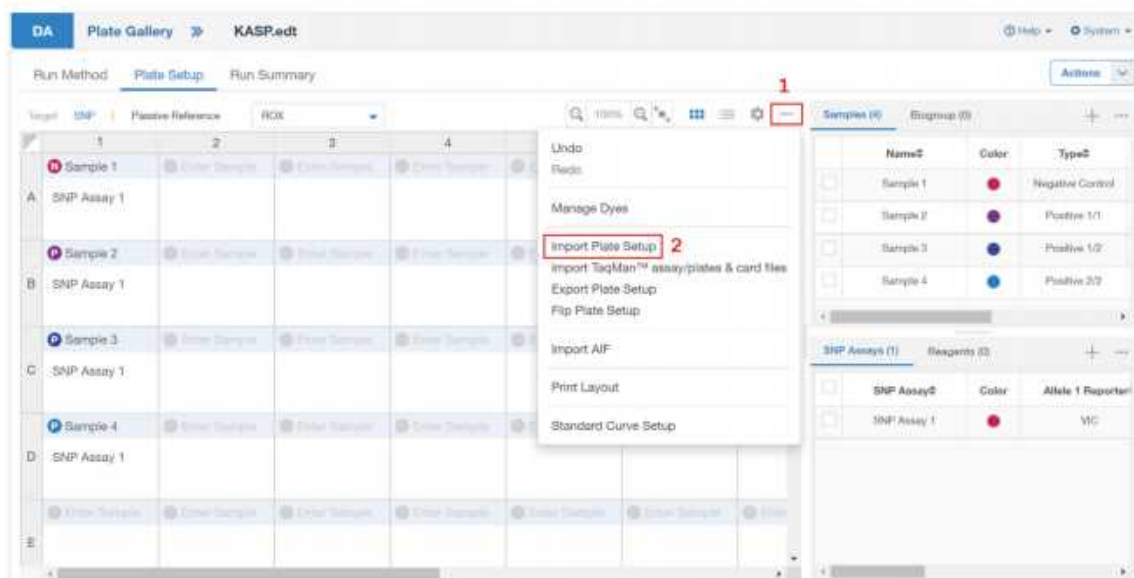
步骤3：在Plate Setup页面左侧反应板面上选中反应孔位置，然后在右侧勾选对应的待检测SNP靶标和样本信息。



步骤4：在右上角的Samples栏中为不同的待检测样本选择相应的Type，Unknown代表未知样本，Negative Control代表阴性对照，Positive 1/1、2/2、1/2分别代表三种基因型的阳性对照。



此外，也可以通过点击反应板右上角的“...” (图中编号1)，然后选择Import Plate Setup (图中编号2)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)

当完成了程序设置，编辑好反应板后就可以运行实验了。

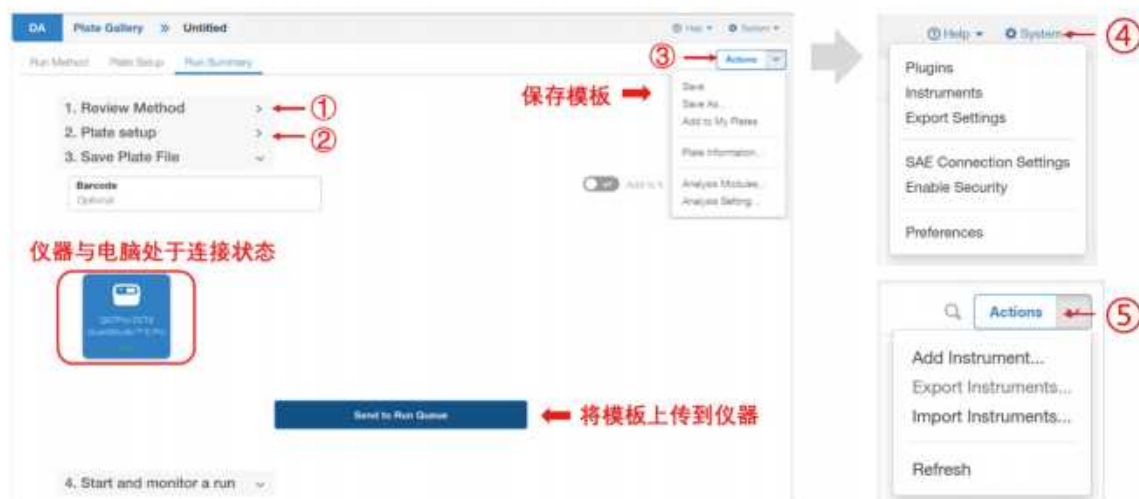
具体操作步骤如下：

步骤1：将软件端新建的模板文件发送至QuantStudio 6 & 7 Pro仪器。

点击软件左上角导航栏的Run Summary页面查看设置：① PCR程序(Review Method)，② 反应板样本和SNP位点排布(Plate setup)。确认无误后点击 ③ 右上角Actions，进行保存(Save或者Save As)，输入名称，设定好保存路径，保存模板。

当仪器与电脑已经处于连接状态，软件上显示仪器信息，点击Send to Run Queue，之后点击Done，完成模板上传。

如果显示No Instrument is available，检查仪器与电脑是否已经连接，然后点击 ④ 右上角System，进入Instruments，再通过 ⑤ 右上角Actions，添加仪器(Add Instrument)或进行刷新(Refresh)。

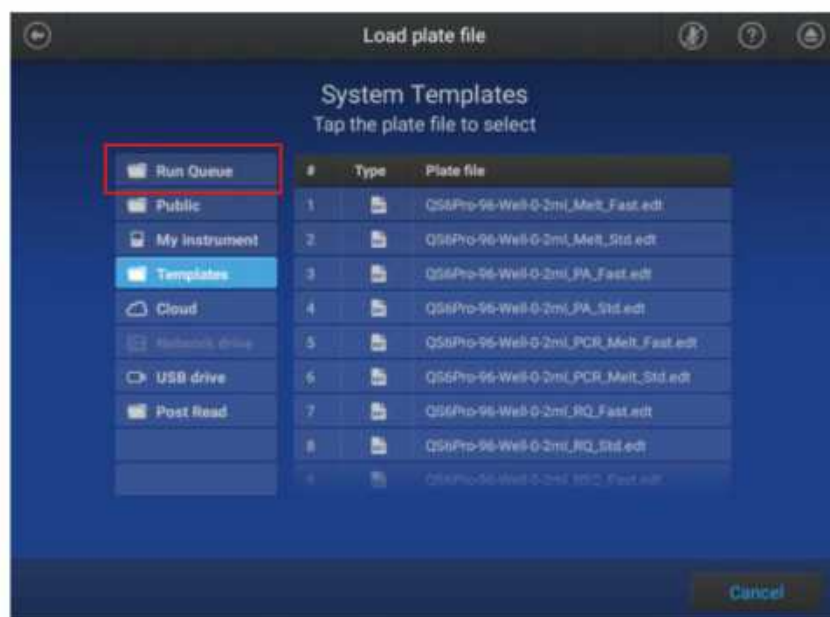


步骤2：到仪器端，将反应板或者八连管按照设定的排布放入仪器。

在屏幕上点击Load plate file (下图所示)。

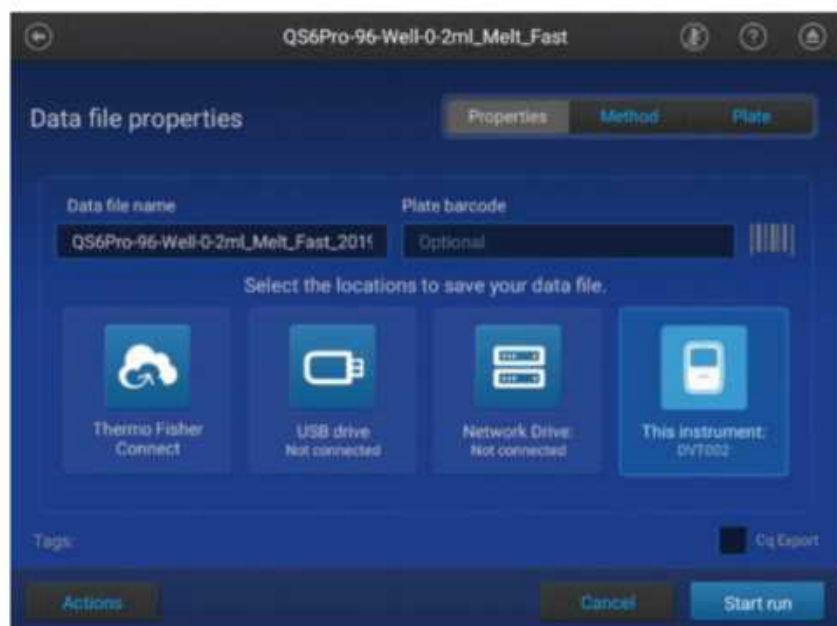


点击Run Queue文件夹(下图所示)，选择上传到仪器上的模板。



步骤3：在待运行模板文件的**Properties**下选择保存路径，所有实验结果会自动保存在仪器上，其他保存路径可选：

- A.** Thermo Fisher Connect: 通过网络传输到ThermoFisher云端(仪器需连接网络，并使用云端账户登录仪器)；
- B.** USB Drive: 可将U盘插在仪器上，选择该选项，结果将同步保存在U盘；
- C.** Network Drive: 需要提前在与仪器相连的电脑上设置共享文件夹，选择该选项，结果将传输到电脑的指定文件夹。



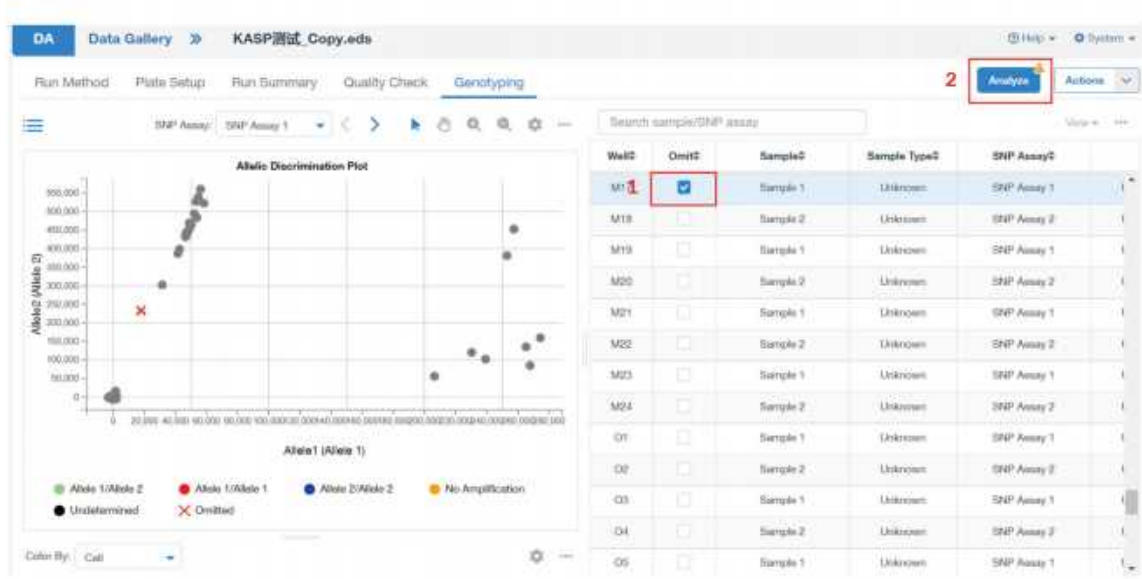
步骤4：设置结束后，点击右下角**Start run**，开始实验。

4.5 结果分析

当实验运行结束后，点击导航栏的Genotyping查看分析结果。



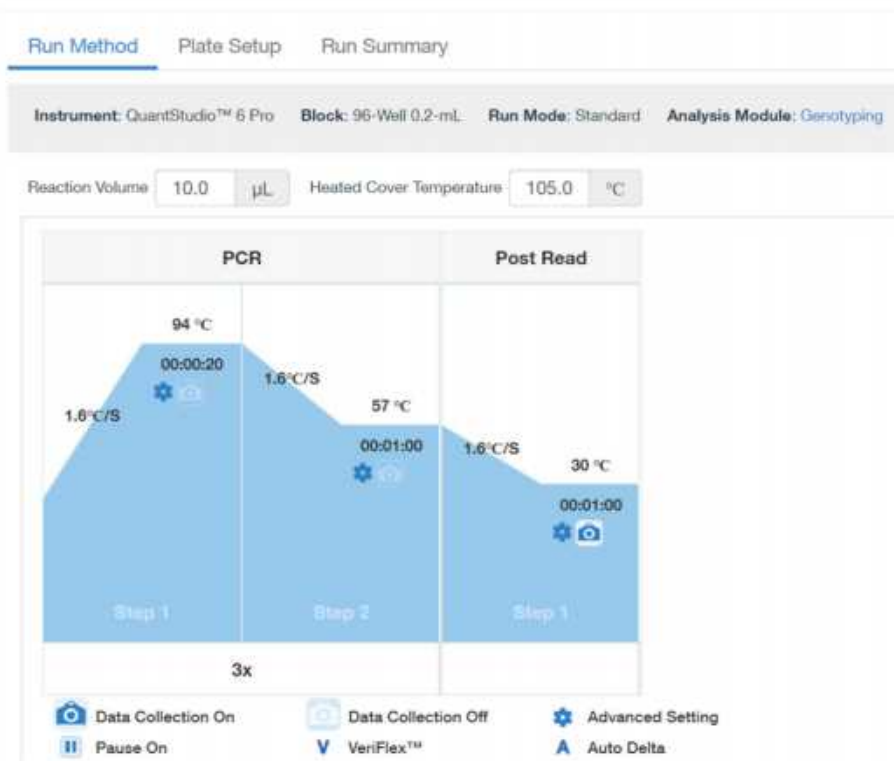
如果观察到异常孔结果(比如因为加样误差导致的离散孔), 可以从分析中排除这些样本。在软件右侧表格栏选中异常孔所在行, 勾选Omit (图中编号1), 然后点击右上角Analyze重新分析(图中编号2)。



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 Pro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	

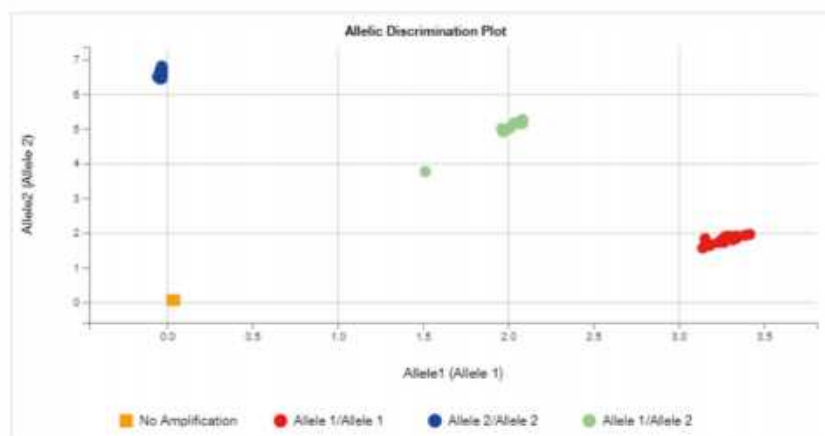


- 请注意：再次扩增反应板不需要进行扩增前读板(Pre-Read)。因为反应板已经扩增过，并积累了荧光信号。
- 再次扩增反应板的结果可以在Design & Analysis 2软件的Genotyping模块下查看(具体参考4.5)。

4.7 运行KASP试用试剂盒

如果您要在QuantStudio 6 & 7 Pro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