

Applied Biosystems™ QuantStudio™ 6 & 7 Pro 实时定量 PCR 仪

简明中文手册


第三部分：基因分型

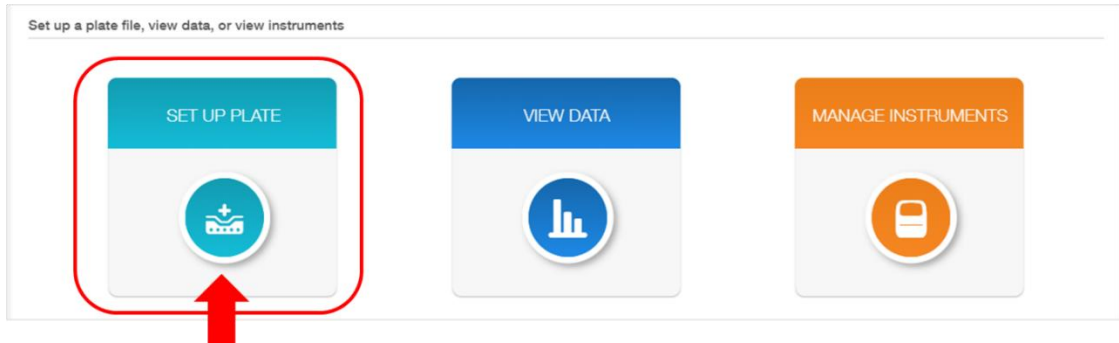
Design and Analysis Software V2.3.0



英潍捷基（上海）贸易有限公司
赛默飞世尔科技公司

Applied Biosystems™ QuantStudio™ 6 & 7 Pro 实时定量 PCR 仪

1. 双击桌面图标  开启 Design and Analysis Software v2。
2. 进入主界面以后，点击“SET UP PLATE”。



3. 选择合适的模板：在左侧条框中选择以下过滤条件。

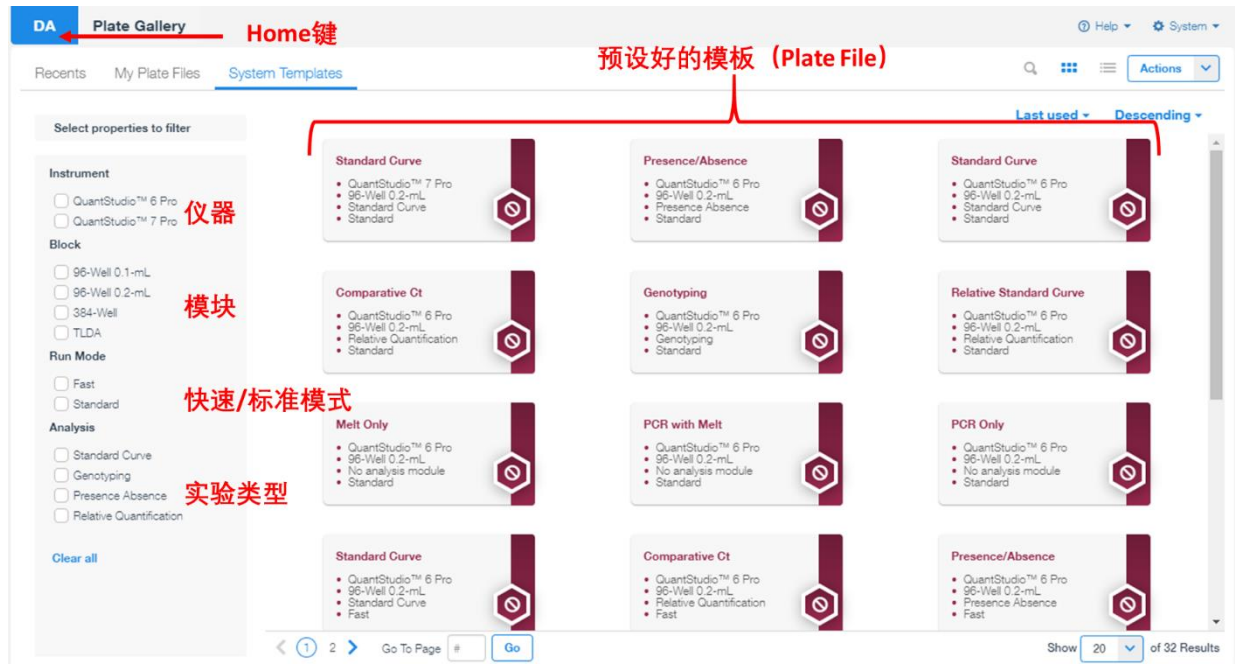
Instrument——使用的仪器

Block——加热模块的型号

Run Mode——PCR 模式（快速或者标准）

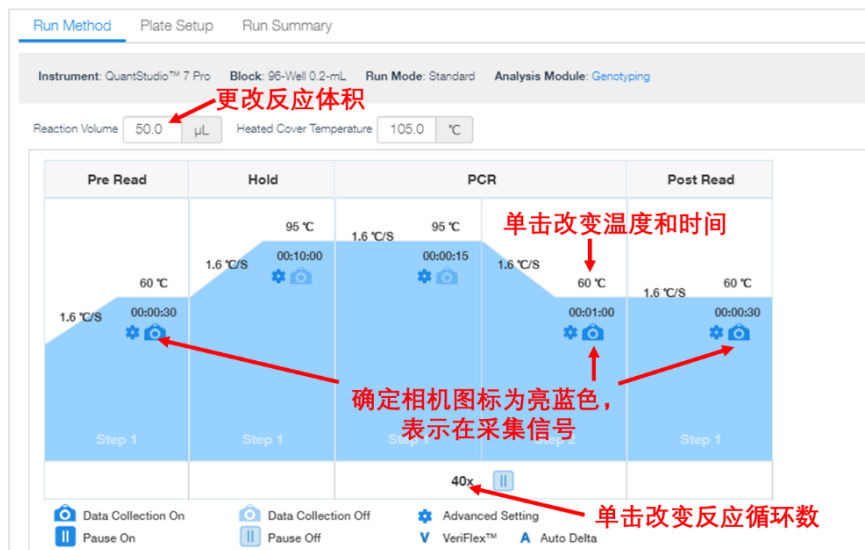
Analysis——实验类型（基因分型实验选择 Genotyping）

选择好后，会在右侧显示出对应模板，点击进入模板。

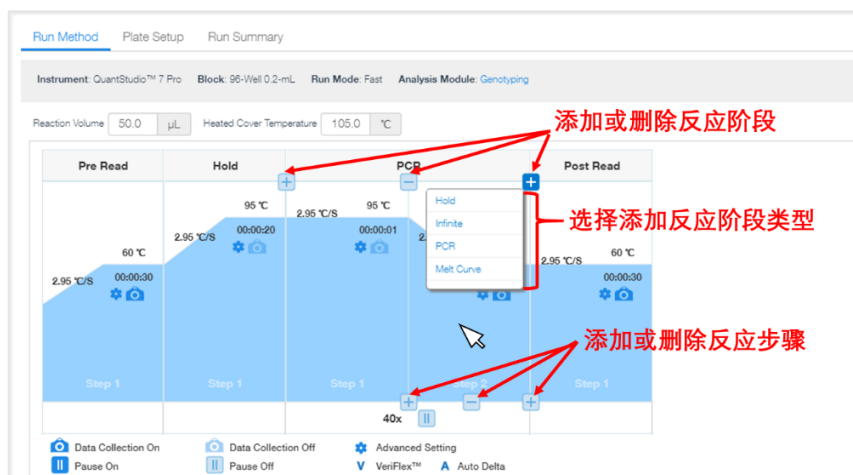


4. 进入 Run Method 界面，设定 PCR 条件：反应体积、退火温度、延伸时间和循环数等。

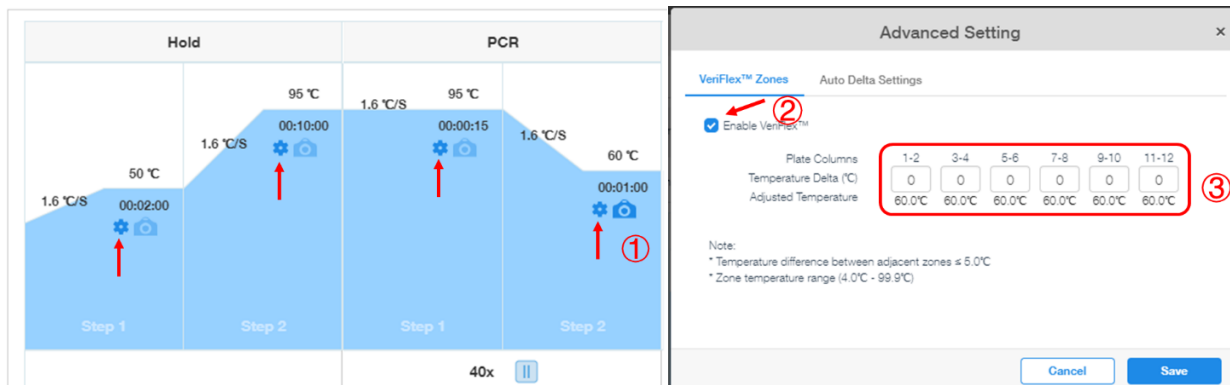
注：TaqMan® SNP Genotyping Assay 可直接使用默认程序，TaqMan® DME Assay 需根据说明书要求更改延伸时间和循环数。



如需添加或删除反应阶段（Stage）和反应步骤（Step），可将鼠标放在对应位置，点击加减号进行更改。



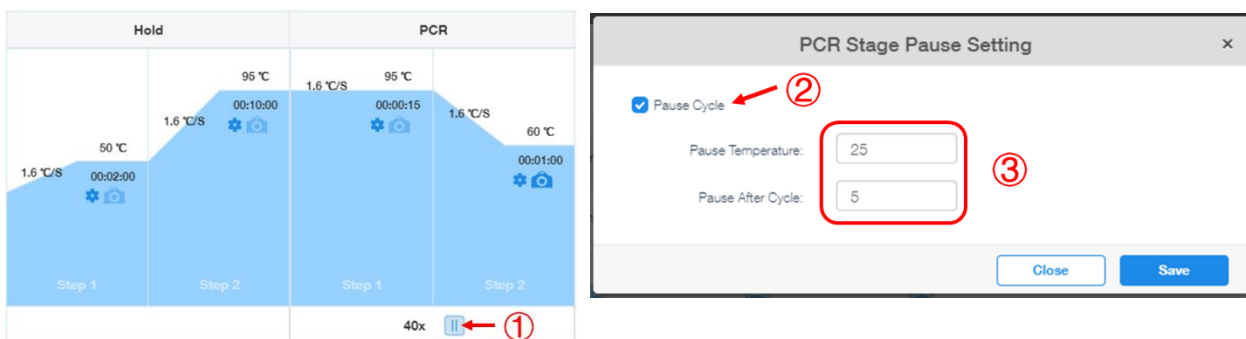
4.1（可选）设置梯度反应温度：①单击小齿轮（Advanced Setting）；②勾选 Enable VeriFlex；③然后更改 Block 上相应区域的反应温度，相邻区域温度差异不能超过 5°C。



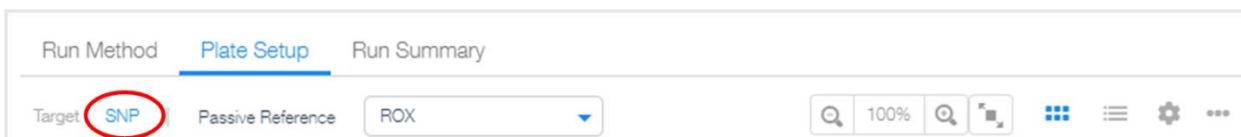
注：梯度反应温度设置仅限于96孔加热模块。上图为QuantStudio 7 Pro示意图，可设置6个梯度反应温度；QuantStudio 6 Pro 可设置3个梯度反应温度。

4.2（可选）设置暂停程序：点击图标①，勾选②Pause Cycle，③设置暂停后的温度（Pausing Temperature，范围：4~99.9℃）和暂停前反应循环数（Pause After Cycle）。

注意：反应板在反应过程中温度较高，为防止烫伤，建议将暂停后温度设定在室温，并等待反应板温度下降后将其取出。



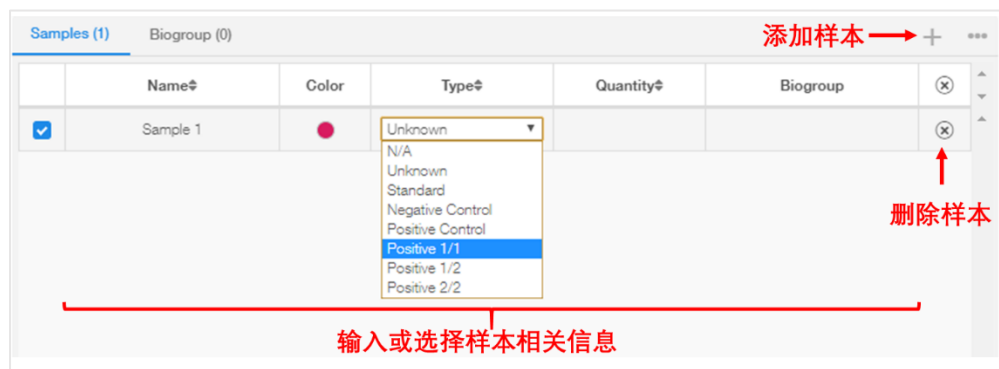
5. 进入 Plate Setup 界面，确定左上角选择为 SNP，进行基因分型反应板设置。




5.1 输入样本名（Sample）和 SNP Assay 信息（SNP Assay），有以下三种方式。

A. 添加&分配方法：

在右侧样本信息栏（Samples）内点击 + 添加新的样本：输入样本名称（Name）、样本扩增曲线的颜色（Color）、样本类型（Type）。基因分型常用样本类型：待测的未知样本（Unknown），阴性对照（Negative Control）和三种基因型的阳性对照（Positive 1/1, Positive 1/2, Positive 2/2）。未使用的样本点击 ⊗ 去除。



在右侧 SNP Assay 信息栏（SNP Assays）内点击 + 添加新的 SNP 位点：输入位点名称（SNP Assay）和该 SNP 位点扩增曲线的颜色（Color），分别输入等位基因 1（Allele 1）和等位基因 2（Allele 2）的报告荧光基团（Reporter）和淬灭基团（Quencher）。成品 TaqMan® SNP Genotyping Assay 的淬灭基团选择 NFQ-MGB。如果淬灭基团是非荧光淬灭

基团（如 BHQ），在 Quencher 处选择 None。可点击 ，编辑更多 SNP 位点信息，例如输入等位基因对应的碱基以及基因名称等。

添加好后在左侧 96 孔板中进行样品板的排布。利用鼠标单选或拖拽以选择反应孔，然后勾选右侧的样本和 SNP 位点前 ，完成所有反应孔的样本和 SNP 位点排布。

B. Excel 形式输入样本和 SNP 位点信息：

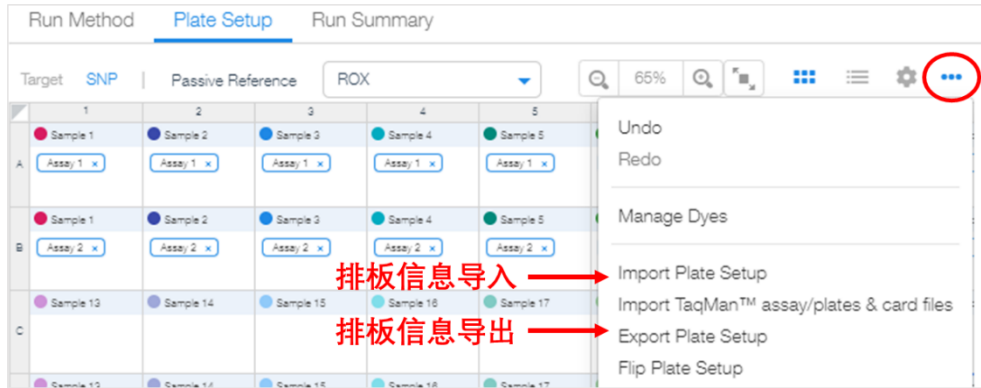
在 Excel 表格上对应 96 孔板的位置输入样本名和 SNP 位点，单数行为样本名，双数行为 SNP 位点名。如果不输入 SNP 位点名，则空出双数行。然后将对应孔信息直接通过复制和粘贴方式拷贝到 DA2 软件的 96 孔板位置，完成设定。此外，也可直接点击修改 96 孔板上的样本名和 SNP 位点信息。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A行样本名	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10	Sample 11	Sample 12
A行基因名	Assay 1	Assay 1	Assay 1	Assay 1	Assay 1	Assay 1	Assay 1	Assay 1	Assay 1	Assay 1	Assay 1	Assay 1
B行样本名	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10	Sample 11	Sample 12
B行基因名	Assay 2	Assay 2	Assay 2	Assay 2	Assay 2	Assay 2	Assay 2	Assay 2	Assay 2	Assay 2	Assay 2	Assay 2
C行样本名	Sample 13	Sample 14	Sample 15	Sample 16	Sample 17	Sample 18	Sample 19	Sample 20	Sample 21	Sample 22	Sample 23	Sample 24
C行基因名												
D行样本名	Sample 13	Sample 14	Sample 15	Sample 16	Sample 17	Sample 18	Sample 19	Sample 20	Sample 21	Sample 22	Sample 23	Sample 24
D行基因名												

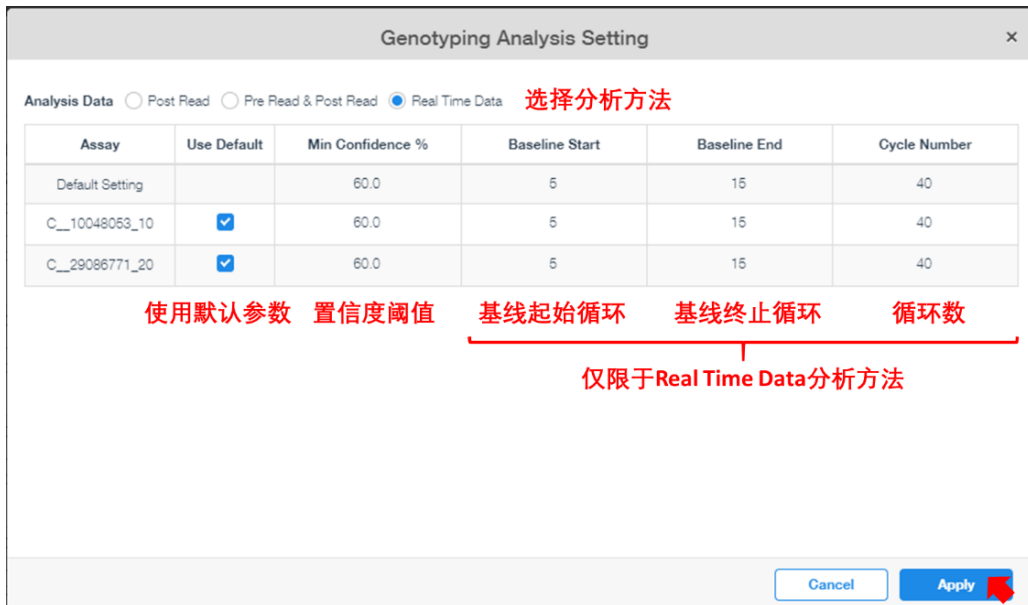
粘贴复制样本和SNP位点信息

C. 通过 CSV/ TXT 文件导入样本和 SNP 位点信息：

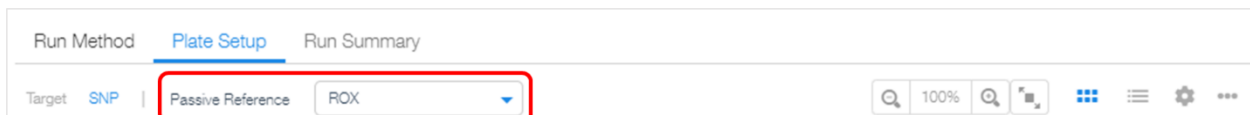
点击 96 孔板右上角 **...** 在下拉菜单中选择“Export Plate Setup”，将排版信息以 csv 或 txt 格式导出，将新的样本信息输入该 csv 或 txt 文件内，再通过“Import Plate Setup”直接导入样本和 SNP 位点，完成快速设定。



5.2 基因分型分析参数设定：通过右上角 Actions 进入 Genotyping Analysis Setting，选择分析方法。Post Read：使用 PCR 结束后读取的信号进行分型分析；Pre Read & Post Read：使用 PCR 结束后信号与 PCR 前的信号差值进行分型分析；Real Time Data：使用 PCR 过程中任一循环的信号进行数据分析（默认参数为第 40 个循环）。设定完成后点击 Apply。



5.3 输入参比荧光（Passive Reference）信息：在 Plate Setup 界面左上角，软件默认选择为 ROX，如果试剂中不含有参比荧光，在下拉菜单中选择 None；如果使用其他参比荧光，选择对应的荧光基团种类。

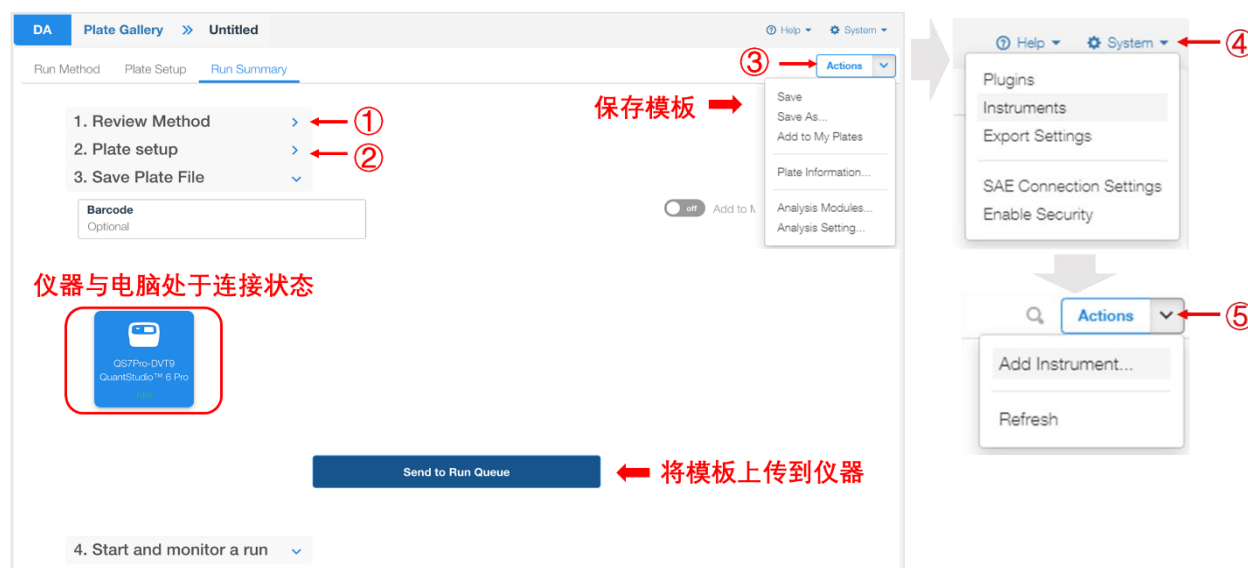


5.4 输入试剂信息（可选）：添加所使用试剂信息，如试剂的名称（Name）、类型（Type）、货号（Part Number）、批次号（Lot Number）、过期日期（Expiration Date）。

SNP Assays (3) Reagents (1)							+
<input type="checkbox"/>	Name	Type	Barcode	Part Number	Lot Number	Expiration Date	(X)
<input type="checkbox"/>	Reagent 1						(X)

6. 在 Run Summary 中查看设置：①PCR 程序（Review Method）和②96 孔板样本和 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，完成后点击 Done，完成模板上传。

如果显示 “No Instrument is available”，检查仪器与电脑在是否已经连接，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）。

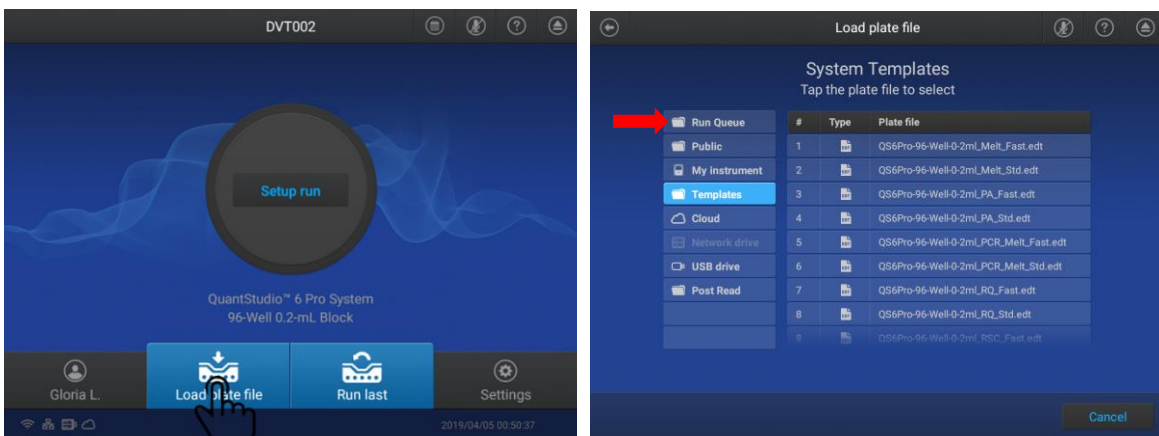


7. 开始实验：

到仪器端，将 96 孔板或者八连管按照设定的排布放入仪器。

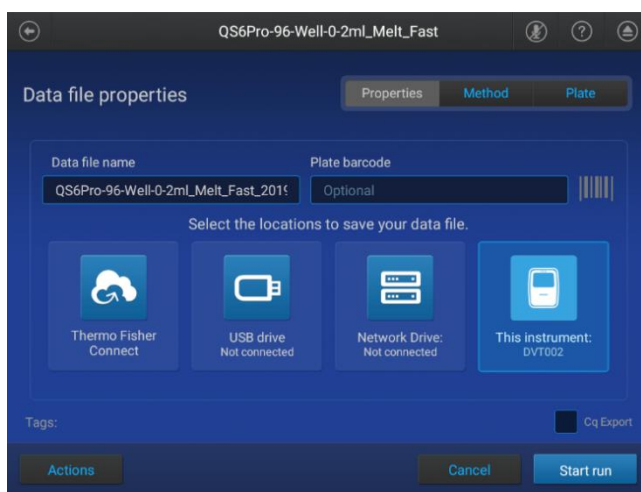
7.1 在屏幕上点击 “Load plate file”（左下图所示）；

7.2 选择 “Run Queue” 文件夹（右下图所示），选择上传到仪器上的模板。



7.3 在 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。



7.4 设置结束后，点击 Start run，开始实验。

8. 监控实验运行状况：

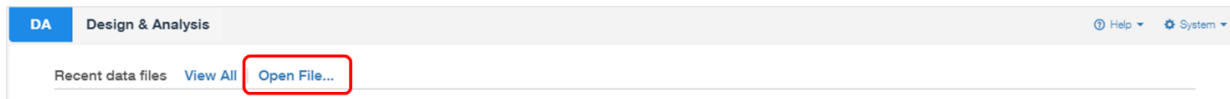
8.1 可通过仪器触屏监控实验运行情况，通过左右滑动，获取不同信息。

8.2 可在 DA2 软件上监控实验运行情况（暂时只能看到实验剩余时间，无法看到实时扩增曲线）。

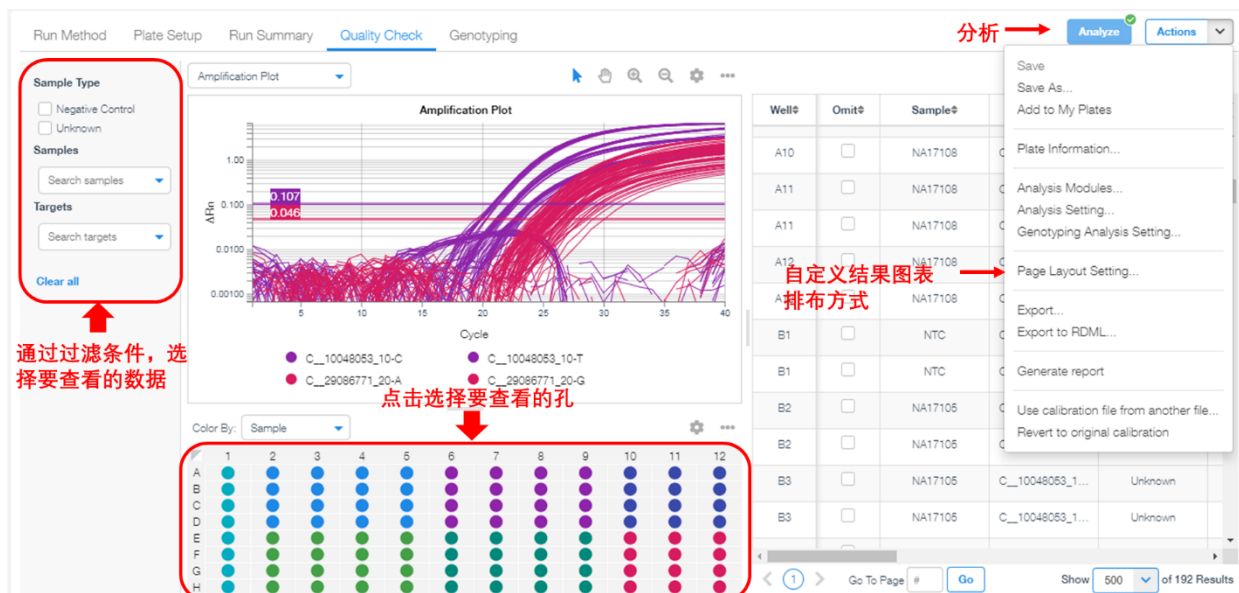
9. 数据传输和下载：

实验结束后屏幕上显示“Run Completed”和实验结果传输位置，点击 Done。如果需要下载之前实验的数据，可回到仪器主界面，点击 Settings → Run History，选择要导出的结果文件，进行导出。

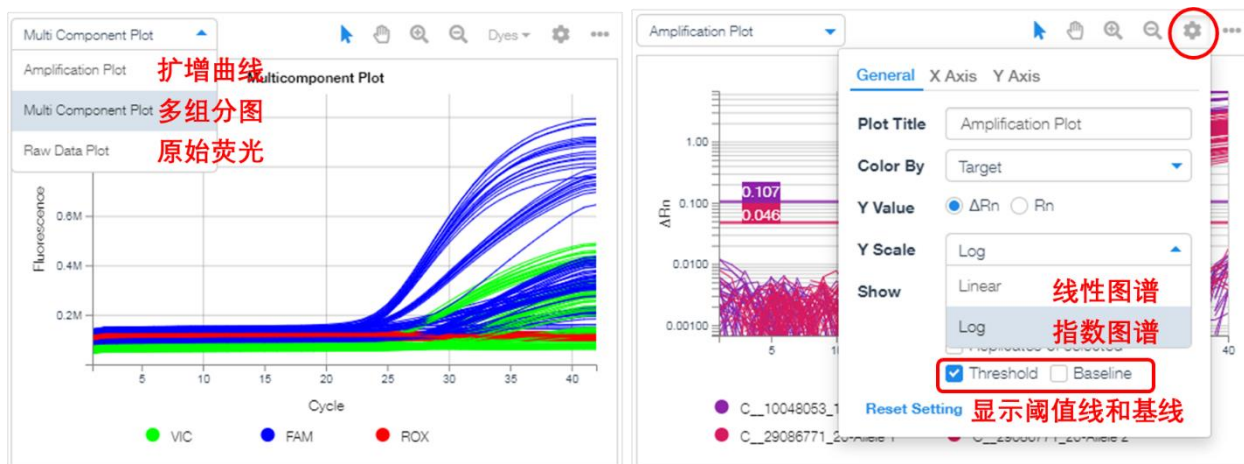
10. 在 DA2 软件上查看和分析结果，通过 Open File 打开待分析的.eds 文件。



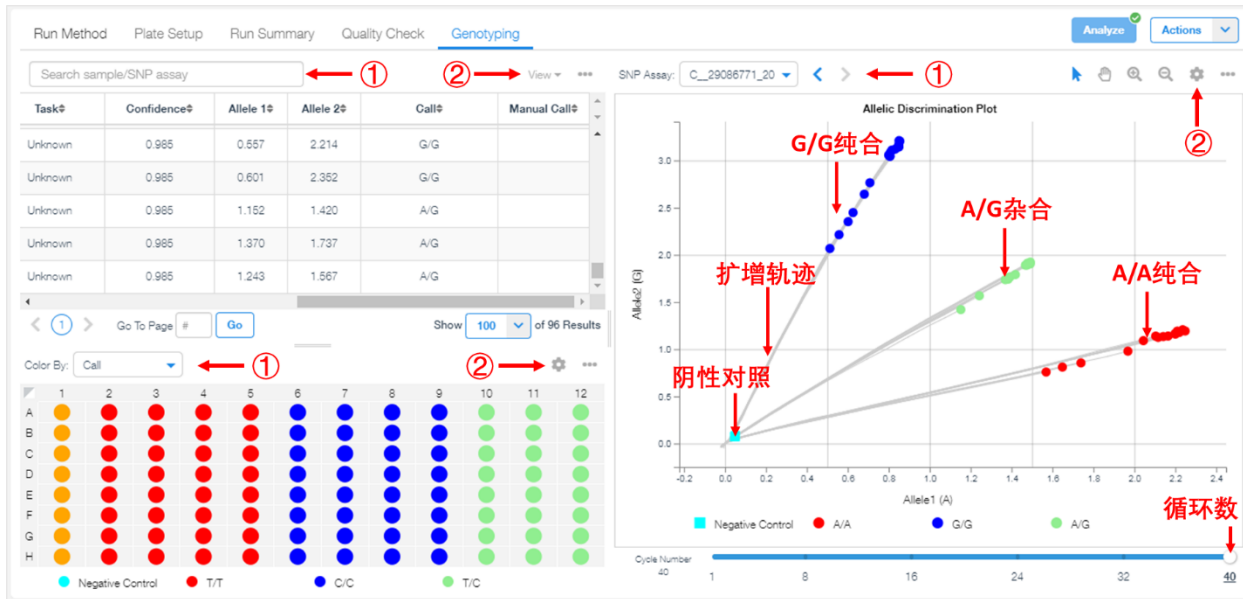
10.1 在 Quality Check 中查看扩增数据。可在左侧过滤条件中选择要查看的结果，或者直接在 96 孔板上选择特定样品孔。不同的图表排布方式可通过选择 Actions → Page Layout Setting 进行自定义。



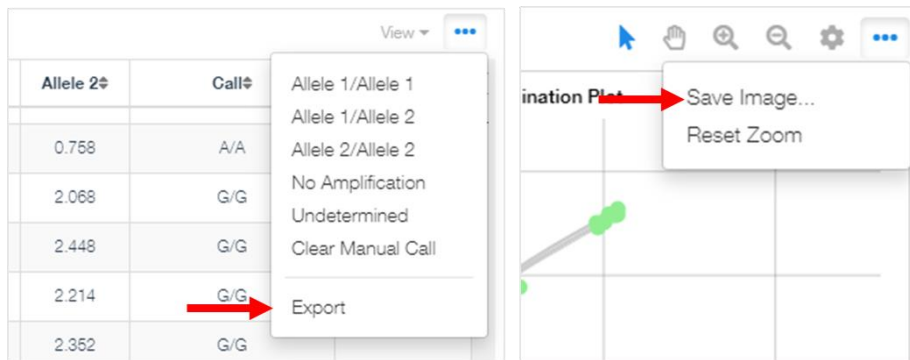
可选择不同的扩增曲线图展现方式:



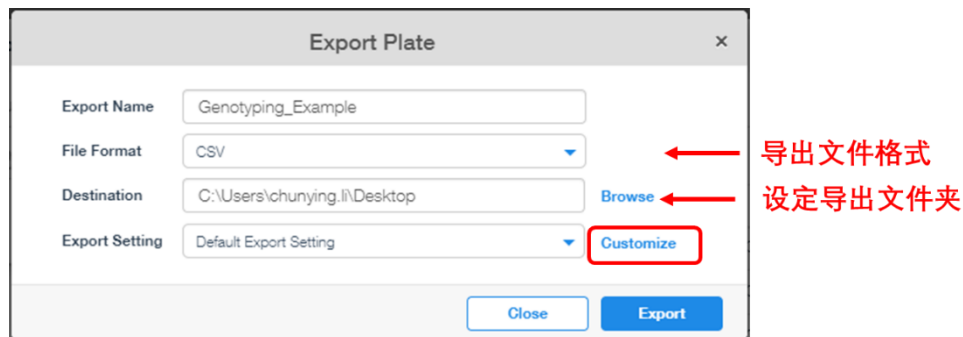
10.2 查看基因分型结果：在 Genotyping 中查看基因分型结果。不同的图表排布方式可通过选择 Actions → Page Layout Setting 进行自定义。可在①下拉菜单中选择显示的图表内容，点击②设定该图表的显示格式。



11. 结果导出：可将实验结果以Excel表格或图片的形式导出。在需要导出的部分，点击该图表右上角 ... 选择 “Export” 或者 “Save Image” 进行结果导出。



也可将多个Excel表格同时导出。通过Actions进入到Export，点击Customize，设定参数。



选择需要导出的数据①，如果不需要导出，则点击右下角②Export Results为Off状态。可在每一部分导出数据类型中对需要导出的具体信息进行筛选③，所有都设定好之后，可以将这种导出方式进行保存④Save Current Setting As。最后点击⑤Export，导出结果。

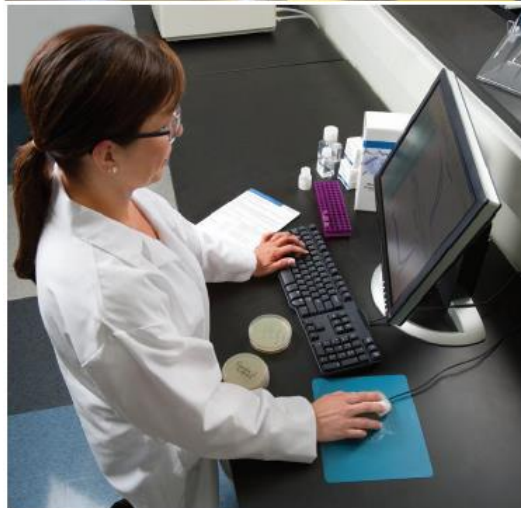
The screenshot shows the 'Export Plate' interface. At the top, there are tabs for 'Results', 'Amplification Data', 'Multicomponent', 'Raw Data', 'Replicate Group Result', and 'Genotyping Result'. A red box labeled '1' highlights these tabs. Below the tabs is a 'Select Columns' panel with a list of columns and checkboxes. A red box labeled '3' highlights the 'Assay ID' checkbox, which is currently unchecked. The main area contains a table with 11 rows and 12 columns. At the bottom, there are options for 'Include Empty Wells', 'Include Omitted Wells', 'Include section header', and 'Use double quote'. A red box labeled '2' highlights the 'Export Results' toggle, which is currently turned 'on'. At the bottom left, there is a 'Save Current Setting As...' button labeled '4'. At the bottom right, there are 'Close' and 'Export' buttons, with a red box labeled '5' highlighting the 'Export' button.

Well#	Well Pos...	Sample#	Sample ...	SNP Assay..	Task#	Confide...	Allele 1#	Allele 2#	Call#	Manual ...
1	A1	NTC	Negative ...	C__1004...	Negative ...	1.0	0.030134...	0.048627...	No Amplif...	false
2	A2	NA17105	Unknown	C__1004...	Unknown	0.984921...	3.233314...	1.719236...	T/T	false
3	A3	NA17105	Unknown	C__1004...	Unknown	0.984921...	3.181159...	1.628751...	T/T	false
4	A4	NA17105	Unknown	C__1004...	Unknown	0.984921...	3.186512...	1.651829...	T/T	false
5	A5	NA17105	Unknown	C__1004...	Unknown	0.984921...	3.141578...	1.560852...	T/T	false
6	A6	NA17104	Unknown	C__1004...	Unknown	0.984921...	-0.03091...	6.448758...	C/C	false
7	A7	NA17104	Unknown	C__1004...	Unknown	0.984921...	-0.04159...	6.439357...	C/C	false
8	A8	NA17104	Unknown	C__1004...	Unknown	0.984921...	-0.04485...	6.521665...	C/C	false
9	A9	NA17104	Unknown	C__1004...	Unknown	0.984921...	-0.05480...	6.496975...	C/C	false
10	A10	NA17108	Unknown	C__1004...	Unknown	0.984921...	2.003988...	5.004607...	T/C	false
11	A11	NA17108	Unknown	C__1004...	Unknown	0.984921...	2.011468...	5.019930...	T/C	false



遍布全球的技术支持服务

我们在全球 60 多个国家和地区设立了办事处，拥有备受赞誉的技术支持团队以及现场服务工程师。您可以在我们的官方网站上订购产品、下载技术文件，以及寻找问题答案。也非常欢迎您通过电子邮件、电话、以及微信平台和我们联系获取信息。



Thermo Fisher Scientific

官方网站: <http://www.thermofisher.com>

免费热线电话: 8008208982/4008208982

技术支持邮箱: cntechsupport@lifetech.com

微信公众号: 赛默飞生命科学服务平台



出版编号 MAN0019219 修订版 A