



定量 PCR 实验报告范例

1. 实验目的: 检测 3 个组中基因 A 表达量的变化。

1 组	1,2,3
2 组	4,5,6
3 组	7,8,9

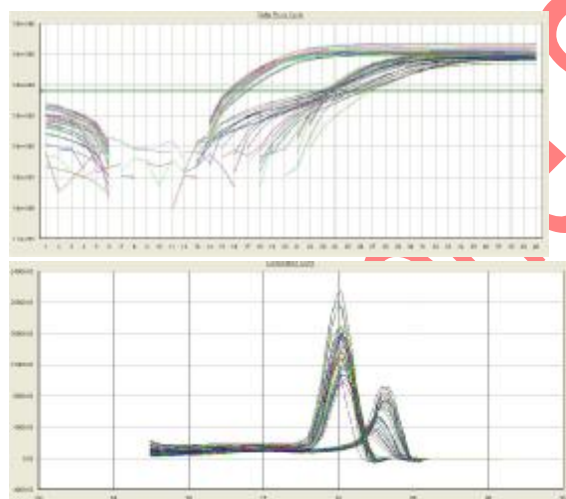
2. 基因和引物信息:

No.	Symbol	Species	mRNA 信息	引物	产物大小
A	Xxx	RAT	NM_XXXXX	AF:ggagtgaagaccagcaaagg AR:ttgtccagctggctccttctt	120bp
ACTIN	Actb	RAT	NM_031144.2	RACTINbF:5'gctacagcttcaccaccaca3' RACTINbR:5'gccatctcttgctcgaagtc3'	94bp

3. 实验结果

3.1 定量 PCR 结果

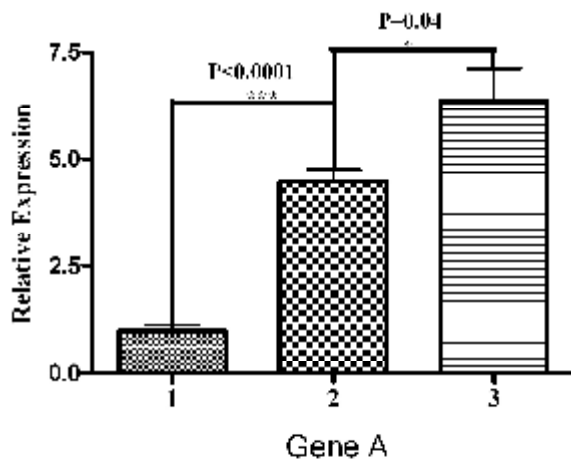
A



分别提取各样品总 RNA (Omega R6934), RNase-free DNase I (Fermentas EN0521) 消化后取 1ug 总 RNA 反转录 (Fermentas K1621)。

从扩增曲线和溶解曲线上可以看出没有任何其他非特异性扩增, 引物扩增效果比较好。A 和 Actin 在 1,2,3, 组中的平均 Ct 分别为 26.8, 24.2, 24.5 和 16.3,16.1,16.7。运用 $\Delta\Delta Ct$ 分析方法, 相对于 1 组, 2 组中 A 的表达量大约增加了 4 倍; 相对于 2 组, 3 组的表达量增加了 40%。

3.2 定量 PCR 数据统计分析



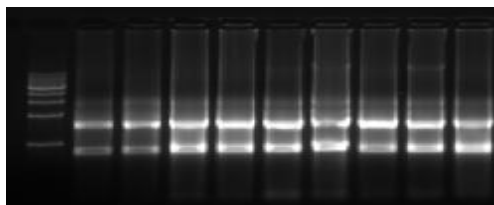
运用 Prism 4 统计分析软件进行 T-test 分析, A 基因在 2 组的表达相对于 1 组具有非常显著的统计学意义 ($P < 0.0001$)。A 在 3 组的表达量增加具有统计学意义 ($P = 0.04$)。

SinoGene Scientific



附件一:

1. RNA 提取图片



2. 总 RNA 浓度

NO.	OD _{260/280}	OD _{260/230}	Concentration(ng/ul)
1	1.87	1.83	3799.7
2	1.92	1.68	4094.2
3	2.12	2.13	4194.3
4	1.84	1.89	3735.5
5	1.93	1.64	4101.9
6	1.98	1.61	4000.7
7	1.9	1.77	3924.3
8	1.89	1.64	3929.2
9	2.08	2.03	3655.6

3. 各样品对应 Ct 值

Group	Sample	Gene A	Actin
1	1	27.56	17.31
		26.89	17.43
		27.21	17.53
	2	26.9	16.25
		26.22	15.93
		25.99	16.02
	3	26.14	15.59
		26.8	15.48
		27.09	15.36
2	4	24.62	16.46
		24.18	16.2
		23.98	16.32
	5	24.06	15.96
		24.1	16.18
		24.25	16.4
	6	24.62	16.21
		24.37	15.85
		24	15.74
3	7	24.23	16.88
		24.03	16.74
		23.87	16.56
	8	23.61	16.67
		24.05	16.88



		23.98	17.03
	9	25.2	16.65
		24.64	16.32
		24.9	16.4

附件二

信诺金达 real-time PCR 详细中文操作步骤

第一部 总 RNA 提取 (试剂盒 Omega R6934/R6834)

1. 取 50-100mg 样品,液氮研磨,转入一 RNase-free 1.5ml 离心管里,加入 1ml 裂解液。剧烈震荡,室温静置 2-3 分钟。
或取 $5-10 \times 10^6$ 细胞,加入 1ml 裂解液,转入 RNase-free 1.5ml 离心管里,剧烈震荡。室温静置 2-3 分钟。
2. 加入 200 μ l 氯仿,剧烈涡旋 30 秒,室温静置 5 分钟。
3. 4 度,12000 $\times$ g 离心 15 分钟。
4. 小心转移上清至一 RNase-free 1.5ml 离心管中,加入 1/3 体积无水乙醇混匀。
5. 转移 700 μ l 混合液至套在收集管上的 RNA 吸附柱中,4 度,10000 $\times$ g 离心 30 秒,弃滤液。
6. 重复步骤 5 至所有混合液全部从吸附柱中过滤。弃滤液。
7. 加入 700 μ l RNA Wash Buffer I 至柱子中,4 度,10000 $\times$ g 离心 30 秒。弃滤液。
8. 加入 500 μ l RNA Wash Buffer II 至柱子中,4 度,10000 $\times$ g 离心 30 秒。弃滤液。
Buffer II 使用前,按说明加入指定无水乙醇。
9. 重复步骤 9。
10. 10000 $\times$ g 离心空柱子以甩干柱子基质。
11. 把离心柱转移至一 RNase-free 的 1.5ml 离心管里,加 45 μ l DEPC 处理水,室温静置 2 分钟,12000 $\times$ g 离心 2 分钟,收集滤液,即为 RNA 溶液。
12. 即可使用或-80 度保存。

第二部分 DNase I 处理 (Fermentas EN0521)

1. 体系配置

RNA	1 μ g
10 $\times$ Reaction Buffer with MgCl ₂	1 μ l
DNase I, RNase-free	1 μ l
DEPC 处理水	至 10 μ l
总体积	10 μ l

2. 37 度水浴 30 分钟。
3. 65 度水浴 10 分钟灭活 DNase I。

第三部分 反转录 (Fermentas K1621 or K1622)

1. 体系配置

总 RNA	1 μ g
Oligo(dT) ₁₈	1 μ l
5 $\times$ Reaction Buffer	4 μ l
RibiLock™ RNase Inhibitor	1 μ l
10mM dNTP Mix	2 μ l
RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (200U/ μ l)	1 μ l



DEPC 处理水	至 20 μ l
总体积	20 μ l

2. 混匀, 离心。
3. 42 度水浴 60 分钟。
4. 70 度水浴 5 分钟, 灭活逆转录酶。

第四部分 Real-time PCR 反应 (仪器 Applied Biosystems ABI PRISM® 7300;试剂 Fermentas K0221 or K0222)

1. PCR 体系配置 (20 μ l 体系)

Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2 $\times$)	10 μ l
Forward Primer (10 μ M)	0.2 μ l
Reverse Primer (10 μ M)	0.2 μ l
cDNA	1 μ l
Water, nuclease-free	8.6 μ l
Total volume	20 μ l

2. 混合均匀, 离心, 分到 8 联排管或者 96 孔 PCR 板 (Axygen) 里, 每个样品每个基因 3 个 PCR 平行反应。
3. PCR 反应程序设置

Step	Temperature, °C	Time	Number of cycles
Initial denaturation	95	10 min	1
Denaturation	95	15 s	40
Annealing/Extension	61	31 s	
Dissociation	95	15 s	1
	60	30 s	
	95	15 s	

4. 比较Ct方法分析数据, Prizm 4统计分析。

北京信诺金达生物科技有限公司

地址: 北京海淀区东北旺南路一号院北 321

电话: 010-62419956 传真: 010-62419956

www.sinogenesci.com sinogenesci@163.com