

All-in-One™ Q-PCR Primer Array 使用说明书

■ 产品概述.

Real-Time PCR 技术是在 PCR 反应体系中添加荧光物质或含荧光基团的探针,利用荧光信号的积累实时监控整个 PCR 的过程,以达到对未知样品的定性或定量分析的目的,与常规 PCR 技术和芯片技术比较,其快速、精确、定量、无污染及高通量等优点成为国际公认的核酸分子定量的标准方法。

All-in-One™ Q-PCR Primer Array 是采用 SYBR Green 染料法检测的 Real-Time PCR 技术,对不同样品中具有相似生物功能的基因簇或自选的特异 Pathway 基因进行表达差异谱分析的系统。其已把优化并通过实验验证的 96 对各异的 All-in-One™ Q-PCR Primer 按使用浓度交联到 96-Well-qPCR 反应板中,其中已包含有四对内参基因引物,研究人员仅需加入 All-in-One™ Q-PCR Mix、cDNA 及 ddH₂O,即可上机反应,并且所得结果可通过在线数据分析系统(采用 $\Delta\Delta C_t$ 分析方法)立即进行分析,利用这种 Ready-to-Use 的 Primer Array 及其已优化的实验条件,研究人员可以快速、精确的筛选出感兴趣的基因进行下游研究。

■ 产品优势

1. 采用 Real-Time-PCR 技术进行样品间基因表达差异分析,具有快速、精确、定量、高通量等优点。
2. 已对具有相似生物功能的基因簇或特异 Pathway 基因进行归纳整理到同一 Panel 中检测,可很直观的筛选出具有特殊意义的基因进行下游功能研究。
3. Ready-to-Use 的包装形式,仅需加入 All-in-One™ Q-PCR Mix、cDNA 及 ddH₂O 即可进行反应,方便快捷。
4. 采用 $\Delta\Delta C_t$ 分析方法的在线数据分析系统,快捷方便的进行结果处理

■ 使用注意事项

1. 本产品采用常温寄送、请将其保存于 +2℃ ~ +8℃。
2. 在使用本产品前请充分去除表面积累的水份,并短暂离心。
3. 使用本产品前注意产品所提示的与之匹配 Real-Time PCR 仪器。
4. 为防止污染,实验时请严格遵守标准的 PCR 流程。

■ 产品提供形式

1. All-in-One™ Q-PCR Primer Array 产品提供的最小规格为 2 张交联有引物的 96-Well-qPCR 反应板及相对应数量的 qPCR 热封膜。

2. All-in-One™ Q-PCR Primer Array 根据各研究人员实验室所使用 Real-Time PCR 仪器的不同, 可提供四种与各仪器匹配的 96-well-qPCR 反应板的包装形式, 如下所示:

包装形式	仪器公司	仪器型号
A	ABI	PRISM SDS (7000、7300、7500、7700、7900)
	Bio-Rad	iCycler iQ、MyiQ、iQ5、
	Stratagene	Mx3000P、Mx3005P、MX4000
	Eppendorf	Realplex
B	ABI	PRISM SDS (7500fast、7900fast)
C	Bio-Rad(原 MJ)	Opticon (MJ)、Opticon2 (MJ)、Chromo4 (MJ)
D	Roche	LightCycler480、LightTyper System

■ 另需配套试剂、耗材及仪器

1. First Strand cDNA Synthesis Kit: GeneCopoeia (Catalog# C0210A)
2. 2×All-in-One™ Q-PCR Mix: GeneCopoeia (Catalog# D0101A)
3. 无DNase/RNase污染的枪头和离心管。
4. 与All-in-One™ Q-PCR Primer Array相配套的Real-Time PCR仪器。

■ 详细操作流程

1. Q-PCR 反应 Mix 量的准备

公司同时提供有与 All-in-One™ Q-PCR Primer Array 配套的 2×All-in-One™ Q-PCR Mix 以供进行 Real-Time PCR 实验, 研究人员可根据 96-well-qPCR Panel 的数量来确定 Q-PCR 反应数, 一般 1 个 Panel 需要准备 100 次 qPCR 反应的 2×All-in-One™ Q-PCR Mix, 依次类推。

2. RNA 样品操作前的准备工作

为避免 RNase 对 RNA 样品的污染, 所有实验要严格遵守 RNA 操作的要求。在实验前需准备高温高压灭菌的微量离心管和移液枪头 (如有条件, 尽可能使用 DEPC 处理的耗材); 在实验操作中, 需戴口罩和一次性橡胶手套; 所有反应液的配制等都需在冰上完成。

3. RNA 样品准备

高质量的 RNA 是基因表达精确检测的首要条件, 对于抽提的 RNA 必须保证 RNA 无降解、无 DNA、RNase 及抑制剂污染。RNA 是否有降解可通过甲醛变性胶电泳检测, 理论上当 28S:18S=2:1 时基本可以判定 RNA 无降解。同时 RNA 的质量还可以通过紫外分光光度法检测, 质量好的 RNA

其 OD_{260/280} 应在 1.7~2.0 范围内。

4、cDNA 的准备

高质量的 cDNA 也是基因表达精确检测的必要条件。建议使用 First Strand cDNA Synthesis

Kit(Catalog# C0210A) 进行 RNA 的反转录，其具体反转录流程可参考如下：

a. 融解 First Strand cDNA Synthesis Kit 内的试剂，上下轻微颠倒混匀，短暂离心后放置冰上待用。

b. RNA-Primer Mix 的配制反应

往放置于冰上的 RNase free 的反应管内加入以下试剂

试剂组分	标准反应	2 倍标准反应体系★
total RNA★	1μg	2μg
250μM Random Primer	1μl	2μl
DEPC H ₂ O	至总体积 13μl	至总体积 26μl

★ 请使用足量的 RNA 进行反转录，建议每个标准反应 RNA 的量控制在 500ng~2μg 之间，如每标准反应 RNA 量小于 100ng 进行反转录可能会影响低表达基因的检测。

★ 因引物锚定的序列位置不一致，为提高反转录效率及扩增效率，建议使用随机引物反转录

★ 因一个 Panel 检测一个样品的表达，考虑到 cDNA 的使用量问题，建议采用 2 倍标准反应体系进行 RNA 反转录，如同一个样品要进行 2 个或更多 Panel 的检测，请按 2 倍标准反应体系重复进行 2 次或更多次的反转录

c. RNA 变性

混匀 RNA-Primer Mix，短暂离心，直接 65℃ 变性 10min 后立即放置冰上。这有助于减弱 RNA 二级结构对反转录的影响，从而提高反转录效率。

d. 配制反转录反应液。

在 RNA-Primer Mix 反应管内加入以下试剂

试剂组分	标准反应	2 倍标准反应体系★
RNA-Primer Mix	13μl	26μl
5×RT Reaction Buffer	5μl	10μl
25mM dNTP	1μl	2μl
25U/μl RNase Inhibitor	1μl	2μl
200U/μl M-MLV RTase (RNase H free)	1μl	2μl
ddH ₂ O(DNase/RNase Free)	4μl	8μl
Final Volume	25μl	50μl

e. 反转录反应

反应条件设置为 37℃ 反应 1 小时。反应结束后，85℃ 灭活处理 5min

f. cDNA 样品处理及保存

混合相同样品反转录成的 cDNA 产物，用 ddH₂O 稀释 5 倍，-20℃ 保存待用。

5. RNA 或 cDNA 质量的质检（可选步骤）

如对抽提的 RNA 质量、反转录效率或最终的检测结果存在怀疑的，可选用此步进行质检。质检内容：RNA 中是否有基因组 DNA 污染、RNA 质量或反转录效率是否有问题、All-in-One™ Q-PCR Primer Array 检测后发觉有问题后的质检。

具体可以参考 All-in-One™ Q-PCR QC Array 的使用说明书。

6. All-in-One™ Q-PCR Primer Array 的 Real-Time PCR 检测

- a. 融解 2×All-in-One™ Q-PCR mix(如有必要，融解 50×ROX Reference Dye)，上下轻微颠倒混匀，短暂离心后放置冰上待用。同时取出 96-Well-qPCR 反应板，擦去表面水份并短暂离心后待用。再次确认所使用的仪器是否与 96-Well-qPCR 反应板相匹配。
- b. 冰上进行 Q-PCR 反应液的配制（每个 Panel 量）

试剂组分	单次反应量	每个 Panel 使用量★
2×All-in-One™ Q-PCR Mix	10μl	10μl×100=1ml
First strand cDNA（diluted 1:5）	2μl	2μl×100=200μl
ddH ₂ O	8μl	8μl×100=800μl
Final Volume	20μl	20μl×100=2ml

- ★ 实验前必须对所使用的移液枪进行校正，防止吸液或分液不精确。
- ★ All-in-One™ Q-PCR Primer Array 采用对同一样品的 96 个基因进行检测，其反应液可直接按“每个 Panel 使用量”进行配制，其已放大了 80μl 体积（已放大四个反应的量）
- ★ Rox Reference Dye 使用在需要用 Rox 校正的 Real-Time PCR 仪，如 ABI 的定量 PCR 仪

- c. 充分混匀 Q-PCR 反应液，务必精确的分取 20μl 反应液添加至 96-Well-qPCR 反应板中（为防止交叉污染，建议每分一次液体更换一个 Tips），封好热封膜，短暂离心，确保所有试剂都甩至反应管底部。

- d. Q-PCR 反应，建议使用标准的三步法进行检测（以 Bio-Rad 的 iQ5 为例）

循环数	步骤	温度	时间	检测
1	预变性	95℃	10min★	否
40	变性	95℃	10sec.	否
	退火	60℃★	20sec.	否
	延伸	72℃★	15sec.	是

反应结束后立即进行融解曲线分析（以 Bio-Rad 的 iQ5 为例）

检测温度范围	升温速率	恒温时间	检测
72℃~95℃★	0.5℃/次	6 sec./次	是
30℃		30sec.	否

- ★ 2×All-in-One™ Q-PCR Mix 中采用的 DNA 聚合酶为经过特殊修饰的热启动酶，95℃预热 10min 能充分激活酶的活性。
- ★ All-in-One™ Q-PCR Primer Array 中所有交联引物的 Tm 值已经过均一化优化，研究人员仅需参考此条件退火即可
- ★ 以上的反应条件主要参考 Bio-Rad 的 iQ5 定量 PCR 仪器，如使用其它公司的定量 PCR 仪，请按照相应的仪器要求，调整延伸时间及融解曲线分析的条件

7. 数据分析

a. Threshold Cycle(Ct)值或 Crossing Point(Cp)值的获得

基线（Baseline）的设置一般都直接选择为仪器自动设置值，如研究人员认为需手动设置时，其一般的设置原则为：起始值设置为 2 或 3，终止值的设置为整个 Panel 中扩增最强基因的 Ct 值减去 2 或 3 所得的值即可，如整个 Panel 中扩增最强的基因其 Ct 值为 18，则我们选择的基线终值可为 16 或 15。

阈值（Threshold）的设置，一般情况下，可选择仪器自动设置，如需改动，则在完成基线设置的基础上，其阈值的设置应为超过无规则噪音线的最高点，并且把阈值线设置在 PCR 的指数扩增期。

Ct 值或 Cp 值即为完成设置的阈值线和扩增曲线的交点对应的循环数，可以通过仪器软件直接导出到 Excel 表中，

b. Real-Time PCR 数据分析系统的应用

此数据分析系统采用的为 $\Delta\Delta Ct$ 法进行数据分析，研究人员根据所测的数据直接利用此数据分析系统进行数据分析处理。其步骤如下

首先根据 Catalog#下载与订购对应的 All-in-One™ Q-PCR Primer Array 数据上传模板，把从软件中导出的 Ct 值按对应的位置顺序拷贝到上传模板中，注意：下载的数据上传模板需命名有两份，一份为拷贝对照样品测试所得的 Ct 值，另一份为拷贝样品测试所得的 Ct 值，同一样品重复测试所得的 Ct 值拷贝到同一个数据上传模板中。

其次，根据数据上传系统，分别上传对照和样品的 Ct 值，同时根据提示选择需要进行数据分析的基因和内参基因，注意：内参基因的定义为表达量相对恒定的基因，在整个 All-in-One™ Q-PCR Primer Array 中共提供有四个不同的内参基因，研究人员可以根据实际情况选择实验中表达恒定的基因作为内参基因（可为一个或多个）进行数据分析。

最后分析系统能根据研究人员提供的数据自动给出样品中各基因的表达量差异倍数报告，同时如果所有的结果重复测试 3 次或 3 次以上，则数据分析系统还能给出数据统计结果(t 检验结果)，研究人员可以根据此报告简捷、快速的筛选出感兴趣的基因进行下游研究工作。

■ 常见问题及其对策

1. 抽提的 RNA 有降解或 RNA 纯度不够

为避免 RNase 对 RNA 样品的污染,所有实验要严格遵守 RNA 操作的要求,在实验前需准备高温高压灭菌的微量离心管和移液枪头(如有条件,尽可能使用 DEPC 处理的耗材);在实验操作中,需戴口罩和一次性橡胶手套;同时严格按照 RNA 抽提试剂盒的说明书进行抽提。

2. All-in-One™ Q-PCR Primer Array 为什么没有设计基因组 DNA 污染检测

All-in-One™ Q-PCR Primer Array 中 95% 以上所交联的 All-in-One™ Q-PCR Primer 都采用了跨内含子设计,可有效的避免基因组 DNA 的污染,所以在 panel 中没有必要设计基因组 DNA 的污染检测对照,如研究人员认为有必要,可以用 All-in-One™ Q-PCR QC Array 来检测基因组 DNA 的污染,具体请查看 All-in-One™ Q-PCR QC Array 说明

3. All-in-One™ Q-PCR Primer Array 为什么没有反转录效率检测

关于反转录效率的问题,在 Panel 中可以简单的从内参 GAPDH 或 ACTB 的扩增 Ct 值来判定,如其 Ct>25,存在的问题可能有, a. 反转录的 RNA 量不够,需再次确认所加的 RNA 量是否达到标准; b. RNA 的质量有问题,需再次通过甲醛变性胶电泳和紫外分光光度法检测来判断 RNA 的质量是否达标; c. 反转录效率的问题,在以上两项检测都没有问题并且所有试剂和反应条件都准确无误的情况下,再来判断是否为反转录效率的问题,此时可以参考 All-in-One™ Q-PCR QC Array 来测试 RNA 的反转录效率,具体请查看 All-in-One™ Q-PCR QC Array 说明。

■ 附录 1. $\Delta\Delta Ct$ 法数据分析原理

$\Delta\Delta Ct$ 法数据分析是进行基因表达量分析中最简单、最直接的分析方法,属于相对定量数据分析范畴。在不同样品间进行基因表达量差异分析时,由于存在着取样量、RNA 抽提效率、反转录效率等的差异,为此必须以一个表达量相对恒定的内参因子来对这些差异进行校正。所以说进行表达量分析的第一步即为选择恒定表达的内参因子。Real-Time PCR 是属于 PCR 的范畴,必定符合 PCR 的扩增理论方程: $N = N_0 \times (1 + E)^{Ct}$ (N: 扩增产物数量, N_0 : 起始模板数量, Ct: 循环数; E: 扩增效率)。当假定扩增效率为 100% 时,起始模板 $N_0 = N \times 2^{-Ct}$, 在比较不同样品间某基因的表达量差异时,首先在同一个样品中,需要用内参因子进行差异校正,即同一样品中,检测基因与内参因子起始模板的相对含量比为 $N_{rel} = N_{01}/N_{02} = N_{Ct1}/N_{Ct2} \times 2^{-(Ct1-Ct2)} = 2^{-\Delta Ct}$ (1: 为检测基因, 2 为内参因子), 其次再比较不同样品间检测基因的相对含量 $= N_{rel1}/N_{rel2} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ (1 为样品 1; 2 为对照), 所得比值即为检测基因在不同样品间的表达量差异。

■ 附录 2. Human Wnt Signaling 96 All-in-One™ Q-PCR Primer Array (Catalog#: HAQPA-101-01)

1. Human Wnt Signaling 96 All-in-One™ Q-PCR Primer Array Description

The human Wnt genes encode a large family of secreted, cysteine-rich proteins that play key roles as intercellular signaling molecules in development. Genetic studies have demonstrated the involvement of Wnts in processes as diverse as segmentation, CNS patterning, and control of asymmetric cell divisions. The transduction of Wnt signals between cells proceeds in a complex series of events including post-translational modification and secretion of Wnts, binding to transmembrane receptors, activation of cytoplasmic effectors, and, finally, transcriptional regulation of target genes. The product of human Wnt Signaling 96 All-in-One™ Q-PCR Primer Array include 92 key genes that are most closely associated with this Wnt family members. Using the Real-Time PCR technology, researcher can easily and accurately analyze expression of the Wnt relational genes with this array

2. Very Important Thing

This 96-well-qPCR plate Match to The “A” format Real-Time PCR Instrument

3. Human Wnt Signaling 96 All-in-One™ Q-PCR Primer Array Plate Layout

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	APC	DIXDC1	EP300	FRZB	RHOA	CSNK2A2	CTNNB1	GSK3B	LRP6	MYC	SFRP1	T
B	WNT2	WNT5A	FZD6	CUL1	FOXN1	RUVBL1	SLC9A3R1	BCL9	DVL2	DVL3	AXIN2	TLE1
C	SMAD4	CER1	PPARD	WIF1	DKK4	DKK2	DAAM1	PYGO1	CAMK2A	NLK	LEF1	FZD3
D	SENP2	TCF7L2	TCF7L1	WNT8A	CSNK1A1	MAP3K7	AES	CSNK1D	FBXW11	PPP2R5D	BTRC	PORCN
E	JUN	SFRP2	FZD1	FSHB	FZD7	DKK1	FZD4	KREMEN1	WNT11	FZD8	CREBBP	CCND2
F	TCF7	WNT10B	FZD9	WISP1	WNT7A	FRAT2	RHOJ	PITX2	NKD1	WNT9B	FZD5	WNT7B
G	VANGL1	FOSL1	WNT3	CTNNBIP1	WNT1	WNT5B	WNT9A	FRAT1	WNT3A	CCND1	APC2	WNT6
H	SOX17	FZD2	WNT4	AXIN1	NKD2	CTBP1	DVL1	CSNK2A1	GAPDH	ACTB	B2M	RPL13A

■ 相关产品

All-in-One™ Q-PCR QC Array	HAQPA-100-01
All-in-One™ Q-PCR Primer	http://www.fulengen.com/product/qpcr/
First Strand cDNA Synthesis Kit	Catalog #: C0210A
2×All-in-One™ Q-PCR Mix	Catalog #: D0101A

该产品仅限于实验科学研究用，若有任何单位或个人将该产品用于临床诊断、治疗等其他国家专门规定的特殊用途，本公司概不承担任何责任。



地址:广州高新技术产业开发区广州科学城掬泉路3号广州国际企业孵化器D区8楼, 510663

客服电话:020-32068595 电子信箱:support@fulengen.com 网址:www.fulengen.com