



ExProfile™ Gene qPCR Array 配套试剂使用说明书

——高通量基因表达量分析阵列配套试剂说明书

适用于以下产品

All-in-One™ First-Strand cDNA Synthesis Kit for gene qPCR array

Cat.No. AORT-2020 (20 reverse transcription reactions)

Cat.No. AORT-2060 (60 reverse transcription reactions)

All-in-One™ qPCR Mix

Cat.No. AOPR-0200 (20 μ l \times 200 reactions)

Cat.No. AOPR-0600 (20 μ l \times 600 reactions)

Cat.No. AOPR-1200 (20 μ l \times 1200 reactions)

Cat.No. AOPR-1000 (20 μ l \times 1000 reactions)

Cat.No. AOPR-4000 (20 μ l \times 4000 reactions)

GeneCopoeia, Inc. 广州易锦生物技术有限公司

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 F 区 8 楼

邮编: 510663

电话: 4006-020-200

邮箱: sales@iGenebio.com

网址: www.genecopoeia.com

www.iGenebio.com

© 2016 GeneCopoeia, Inc.

使用说明书

ExProfile™ Gene qPCR Array 配套试剂

- I. 产品介绍
- II. 试剂盒组成
- III. 实验前准备
- IV. 实验步骤
- V. 数据分析
- VI. 使用许可与质量保证

I. 产品介绍

ExProfile™ Gene qPCR Array 专为检测不同组织或细胞中特定基因的表达式而设计，这些基因按照预制或定制要求成套设置。检测结果所显示的差异表达可帮助研究者鉴定或验证这些基因的生物学意义，以及与其研究的重要相关性。

逆转录试剂 All-in-One™ First-Strand cDNA Synthesis Kit for gene qPCR array 和以荧光染料 SYBR® Green 为基础的定量检测试剂 All-in-One™ qPCR Mix 作为被推荐的 RT-qPCR 试剂产品可与 ExProfile™ Gene qPCR Array 配套使用。该系列试剂均经过优化，具有高的灵敏度、效率和特异性。其他公司的类似试剂可能适用，但不推荐使用。

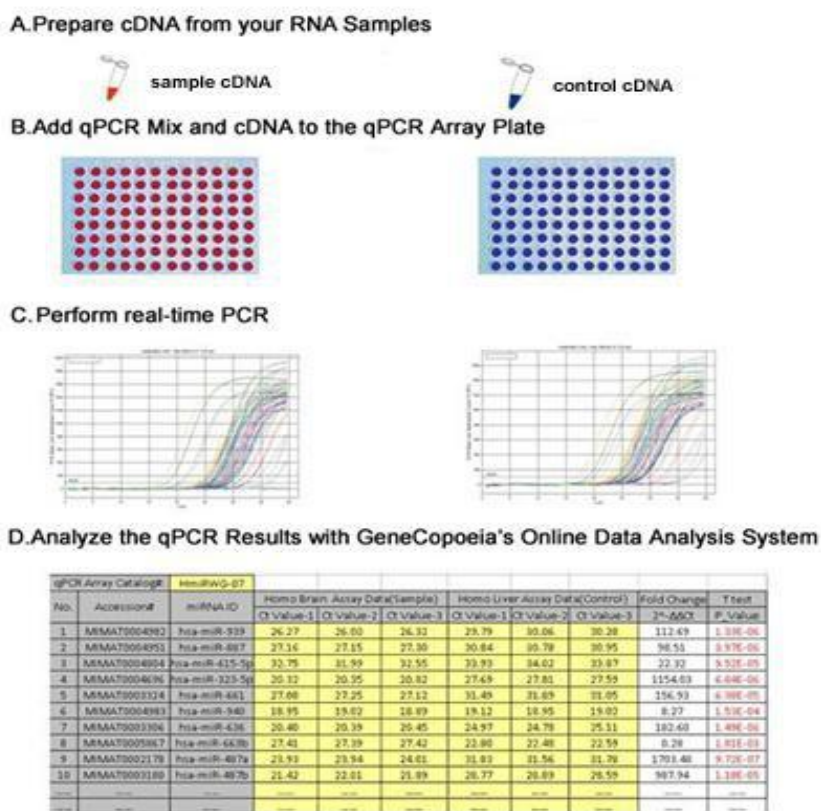


图 1. ExProfile™ Gene qPCR Array 实验工作流程

II. 试剂盒组成

逆转录试剂

All-in-One™ First-Strand cDNA Synthesis Kit for gene qPCR array(Cat.No.**AORT-2020**, **AORT-2060**)试剂组成如下表:

组份	规格	储存及运输条件
200 U/μL M-MLV Reverse Transcriptase (RNase H-)	1 x 20 μL 3 x (1 x 20 μL)	冰袋运输; -20℃ 保存至少 12 个月
5 x RT Reaction Buffer	1 x 100 μL 1 x (1 x 100 μL)	冰袋运输; -20℃ 保存至少 12 个月
25 U/μL RNase Inhibitor	1 x 20 μL 3 x (1 x 20 μL)	冰袋运输; -20℃ 保存至少 12 个月
25 mM dNTP	1 x 20 μL 3 x (1 x 20 μL)	冰袋运输; -20℃ 保存至少 12 个月
250 μM Random Primer	1 x 20 μL 3 x (1 x 20 μL)	冰袋运输; -20℃ 保存至少 12 个月
60 μM Oligo (dT)₁₈	1 x 20 μL 3 x (1 x 20 μL)	冰袋运输; -20℃ 保存至少 12 个月
Spike-in Control RNA	1 x 20 μL 3 x (1 x 20 μL)	冰袋运输; -20℃ 保存至少 12 个月
dd H₂O (RNase and DNase free)	1 x 1 mL 3 x (1 x 1 mL)	冰袋运输; -20℃ 保存至少 12 个月

qPCR 试剂

All-in-One™ qPCR Mix(Cat.No. **AOPR-0200**、**AOPR-1000**、**AOPR-4000**)试剂组成如下表:

组份	规格	储存及运输条件
2 x All-in-One™ qPCR Mix	1 x 2 mL 5 x 2 mL 20 x (1 x 2 mL)	冰袋运输; -20℃ 保存至少 12 个月
50 x ROX Reference Dye	1 x 80 μL 5 x 80 μL 20 x (1 x 80 μL)	冰袋运输; -20℃ 保存至少 12 个月

III. 实验前准备

注意事项:

1. 开始实验前请仔细阅读产品使用手册。
2. 使用前, 请移除积存在封闭的反应板表面的冷凝物, 短暂离心。
3. 严格按照 PCR 标准步骤操作, 避免核酸污染和非特异性扩增。

预计每个样本需要的 RNA 量和 RT-PCR 反应数

Array 类型	反应板数/样本	总 RNA 量/样本	RT 反应数/样本	qPCR 反应数/样本
96-well plate	1	0.04-2 µg	1	110
	2	0.04-2 µg	1	220
	5	0.12-6 µg	3	550
	10	0.2-10 µg	5	1,100
	20	0.4-20 µg	10	2,200
	40	0.8-40 µg	20	4,400
384-well plate	1	0.08-4 µg	2	450
	2	0.16-8 µg	4	900
	5	0.4-20 µg	10	2,250
	10	0.8-40 µg	20	4,500

RNA 定量与质量控制

1. 使用无菌水(RNase-free)稀释 RNA 样本, 检测 260 nm 和 280 nm 吸光值, A₂₆₀/280 应大于 1.8。
2. 使用公式 $A_{260} \times 40 \times \text{稀释倍数} = \text{XXXX } \mu\text{g/mL}$ 计算 RNA 浓度。
3. 使用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。

基因组 DNA 污染控制

每个 Array 板块上的 GDC(Genomic DNA Control)反应孔专为检测每个样品进行 qPCR 反应时可能存在的基因组 DNA 污染而设置。如果该反应孔的 Ct 值小于 35, 则表明存在可检测到的基因组 DNA 污染, 应采取措施予以解决。因此, 必须从 RNA 样品中去除基因组和其他全部残余污染物。

IV. 实验步骤

逆转录(cDNA 第一链合成)

注意: 高质量的 cDNA 是精确检测 miRNA 表达的先决条件。在使用我们推荐的 All-in-One™ First Strand cDNA Synthesis Kit 合成 cDNA 以前, 从您的 RNA 样品中去除基因组和其他全部残余污染物非常重要。

1. 融解反转录试剂盒中的各种试剂组份, 轻柔颠倒混匀, 短暂离心后冰上保存。
2. 准备 RNA-primer 混合物: 向置于冰上的离心管(RNase-free)中添加下表中的试剂组份, 终体积为 13 µL。

成分	体积	终浓度
Total RNA		1 µg ^a
Spike-in Control RNA	1 µL	0.08 ng
Random Primer (250 µM)	1 µL	10 µM ^b
Oligo (dT) ₁₈ (60 µM)	1 µL	2.4 µM
ddH ₂ O (RNase/DNase free)	to final 13 µL	

- a. 上表中的终浓度是一个推荐量，每个反应中 total RNA 起始量可由 10 ng 至 5 µg。如果反应起始量少于 10 ng，可能不能检测到低丰度的 RNA。
 - b. 为获得最佳反应效率，逆转录反应推荐同时使用 Random Primer 和 Oligo(dT)₁₈ Primer。
3. 充分混匀，短暂离心。于 65℃ 温育步骤 2 配制的 RNA-primer 混合物 10 分钟以使 RNA 变性。温育结束，立即将混合物置于冰上，接着短暂离心，再置于冰上保存。
 4. 准备反转录反应液：向步骤 3 配制的 RNA-primer 混合物中添加下表中的各种试剂组份，终体积为 25 µL。整个过程保持在冰上操作。

成分	体积	终浓度
RNA-primer mix	13 µL	
5 x RT Reaction Buffer	5 µL	1 x
dNTP (25mM)	1 µL	1 mM
RNase Inhibitor (25 U/µl)	1 µL	1 U/µL
M-MLV Rtase (200U/µl)	1 µL	8 U/µL
ddH ₂ O (RNase/DNase free)	to final 25 µL	

5. 反转录反应：充分混匀反转录反应液，短暂离心。于 37℃ 温育 60 分钟。
6. 85℃ 温育 5 分钟以终止反转录反应。
7. 每个 25 µl 反转录反应(产物)加入 225 µl 无菌水将 cDNA 产物稀释 10 倍，充分混匀，并短暂离心，用于后续 qPCR 反应。稀释的 cDNA 溶液可置于 -20℃ 保存数周。

qPCR 反应

注意： 在开始此步骤前请确认 ExProfile™ gene qPCR array 与您的 qPCR 仪器匹配。

1. 融解并充分混匀 All-in-One™ qPCR Mix 试剂。短暂离心使管中试剂处于底部，冰上保存。去除积存在封闭反应板表面的冷凝物，短暂离心。小心撕去板上的密封膜。
2. 按照下表准备 qPCR 反应液，配制过程在冰上操作。

成分	体积/孔	体积/N 孔 ^a
2 x All-in-One qPCR Mix	10 µL	11 µL x N
cDNA (10 times dilution)	1 µL	1.1 µL x N
50 x Rox Reference Dye ^b	0.4 µL	0.44 µL x N
ddH ₂ O		
■ Not using Rox Reference Dye	9 µL	9.9 µL x N
■ Using Rox Reference Dye	8.6 µL	9.5 µL x N
Final Volume	20 µL	22 µL x N

- a. ExProfile™ gene qPCR array 可对同一样本中多个基因同时进行检测，为了充分满足实验需要以及避免实验操作产生的损耗，在配制 qPCR 反应液时需要比实际体积多出 10%。
- b. 50xRox Reference Dye 仅用于需要 ROX 校对的 qPCR 仪器。
3. 充分混匀 qPCR 反应液，短暂离心。每个反应孔精确加入 20 µl 反应液。每次加样都需要换用新的枪头以避免交叉污染。
4. 使用产品包装中的新密封膜覆盖 qPCR 反应板，确保密封膜粘贴平整和紧密以防止光线折射和蒸发损耗，短暂离心去除气泡。
5. 开始 qPCR 反应，推荐使用下表中三步法 qPCR 反应程序。

循环数	步骤	温度	持续时间	检测与否
1	预变性	95℃	10min ^a	No
40	变性	95℃	10sec.	No
	退火	60℃ ^b	20 sec.	No
	延伸	72℃ ^c	15 sec.	Yes

- c. All-in-One™ qPCR Mix 中使用的 DNA 聚合酶是一种经过特异化学修饰的热启动酶，预变性能够充分激活这种酶。
- d. 使用 All-in-One™ qPCR Mix 反应时，ExProfile™ gene qPCR array 反应孔中交联的引物的退火温度为 60℃。
- e. 上表中设置的延伸时间适用于 Bio-Rad iQ5 real-time PCR 仪器，请参照您所使用仪器的操作手册调整延伸时间。
- f. 当使用 SYBR Green 染料监测 qPCR 反应时，需要在 qPCR 循环结束后立即进行溶解曲线分析。

温度范围	热比	恒定温度	检测与否
72℃~95℃	0.5℃/unit time	10sec./unit time	Yes
25℃		30 sec	No

V. 数据分析

基本设置

1. 确定基线

基线是 qPCR 扩增前期的荧光本底信号，一般都由仪器自动设置。不同仪器类型，基线的设置也略有不同，往往在荧光信号指数扩增阶段的前几个循环处，一般将定量 PCR 的前 15 个循环信号作为荧光本底信号，如果实验数据中最低 Ct 还小于基线的设置上限，研究人员则需要手动设置。其设置原则为：起始值设置为 2 或 3，终止值的设置为整个反应板中扩增最强检测因子的 Ct 值减去 2 或 3 所得的值即可，一般设置在 2-10 的范围内，不要超过 15。为了确保实验数据分析的可比性，每次定量 PCR 的基线设置须保持一致。

2. 设定阈值

荧光阈值的正确设置是进行数据分析的关键一步，荧光阈值的设置往往在荧光信号指数扩增的起始阶段。一般情况下，内参基因的表达水平往往高于大多数的检测基因。

3. Ct 值或 Cp 值的获得

所谓 Ct 值就是在荧光 PCR 扩增过程中，当扩增产物的荧光信号达到设定的阈值时所经过的扩增循环次数，也被称为 Cp 值。

4. 多数的定量 PCR 仪是以 Excel 的形式导出 Ct 值。
5. 选取合适的内参基因，用 $\Delta\Delta C_t$ 数据分析方法对定量 PCR 结果进行相对定量分析。
6. 所有 Ct 值大于 35 或显示 N/A，均认为没有检测到该基因的表达。

$\Delta\Delta C_t$ 数据分析方法

$\Delta\Delta C_t$ 数据分析法，是一种相对定量分析，是最简单直接的基因表达分析方法。此方法需要一个稳定表达的参照基因以校对每个步骤引入的误差，包括样本采集、RNA 分离、反转录和扩增。一般选用典型的管家基因作为参照基因。

在所有以扩增为基础的技术中，包括 qPCR 中，扩增产物(N)的数量都按照以下公式计算：

$$N = N_0 \times (1 + E)^{C_t}$$

N_0 : 模板量 C_t : 临界值 E: 扩增效率

当扩增效率 E 是 100%时，在预扩增混合物中的模板量按以下公式计算：

$$N_0 = N \times 2^{-C_t}$$

为了使用 $\Delta\Delta C_t$ 法分析多个样品中目的基因的表达水平变化，不同样本的扩增模板量需要通过对比目的基因与参照基因表达量水平进行标准化：

$$N_{rel} = N_{0x}/N_{0r} = N \times 2^{-C_{tx}} / N \times 2^{-C_{tr}} = 2^{-(C_{tx}-C_{tr})} = 2^{-\Delta C_t}$$

样本 1 和样本 2 中标准化的目的基因表达水平的变化根据以下公式计算：

$$N_{rel1}/N_{rel2} = 2^{-\Delta C_{t1}} / 2^{-\Delta C_{t2}} = 2^{-(\Delta C_{t1}-\Delta C_{t2})} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

$2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值即为不同样本之间目的基因的表达量变化。

VI. 使用许可与质量保证

使用许可

以下条款适用于 ExProfile™ gene qPCR Array 配套试剂 All-in-One™ First-Strand cDNA Synthesis Kit (for gene qPCR array) 和 All-in-One™ qPCR Mix 系列产品。若您不能接受这些条款，请在 5 个自然日内将产品完整退还给 GeneCopoeia。产品购买者需遵守最终用户限制许可条例。本产品仅限购买者内部研究使用，不得用于人体或诊断、治疗。未经 GeneCopoeia 事先书面同意，本产品不得转售，不得重新包装或修改后转售，不得用于生产商用产品。

质量保证

GeneCopoeia 保证产品与产品数据表中描述的规格保持一致。若经 GeneCopoeia 证实产品未达到规格要求，GeneCopoeia 将为您替换此产品。若无法替换，GeneCopoeia 将退款给购买者。此质量保证仅适用于最初产品购买者。GeneCopoeia 仅负责替换产品或退还实际的购买金额。对于由使用或不正确使用产品产生的损害或使用其他相关材料 and 试剂产生的损耗，GeneCopoeia 不承担责任。GeneCopoeia 不提供任何形式的明示的或者默示的保证，包括对适销性、适用于特定用途的默示保证。

GeneCopoeia 致力于为消费者提供高质量的研究产品。如果您对 GeneCopoeia 的产品有任何问题或疑虑，请拨打电话 4006-020-200 联系我们

GeneCopoeia, Inc. 广州易锦生物技术有限公司

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 F 区 8 楼

邮编: 510663

电话: 4006-020-200

邮箱: sales@iGenebio.com

网址: www.genecopoeia.com

www.iGenebio.com

© 2016 GeneCopoeia, Inc.