

Real-Time PCR 测试结果报告单

合同编号:

一: 背景资料

1. 样品为 5 个人源的细胞培养液, 其编号分别为: NO.1、No.2、No.3、No.4、No.5, 其中 No.1 为对照组, 其它四个为不同的样品组。
2. 测试基因共两个: 为 LIN28; 外加一内参基因 GAPDH。其中测试引物每个基因各提供了一对, 共两对引物。具体引物信息见附件:

qPCR information. xls 的 primer infor.

二: 要求服务内容

RNA 提取、反转录、引物设计合成及其相对定量 PCR 测试

三: 实验材料和仪器

1. 主要实验仪器

Real Time PCR : ABI

2. 主要实验试剂

Total RNA Kit : Omega: (Cat.No. R6834)

First Strand cDNA Synthesis Kit: GeneCopoeia(Cat.No. C0210A)

2xAllinOne™Q-PCR Mix: GeneCopoeia (cat.No. D0101A)

Primer synthesis: invitrogen

四: 实验操作

RNA 抽提

1. 样品处理: 取适量样本加入 1ml TRK 裂解液匀浆样品。室温 $14,000 \times g$ 离心 5 min 去除不溶解的杂质, 小心转移上清至 1.5ml 离心管。
2. 加入等倍体积 70% 乙醇至裂解液中, 抽打或涡旋混匀
3. 将柱子套在收集管中, 转移混合液至柱子中。室温 $10,000 \times g$ 离心 30-60 秒, 弃去滤液
4. 把柱套放新收集管中, 加入 300ul RNA Wash Buffer I 至柱子上, 按以上条件离心, 弃去滤液。把柱套放回收集管中。
5. DNase 消化: 配制 DNASE 消化液(Digestion Buffer, 73.5ul ; RNase-Free DNase I,1.5ul), 混匀, 将消化液转移至柱子膜的正中央, 室温静置 15 分钟。
6. 加 500ul RNA Wash Buffer I 至柱子, 按以上条件离心, 弃滤液
7. 把柱套放回收集管中, 加 500ul RNA Wash Buffer II 至柱子上, 按以上条件离心, 弃滤液。
8. 把柱套放回新收集管中, 加 500ul RNA Wash Buffer II 至柱子上, 按以上条件离心, 弃滤液。
9. 把柱套放回收集管中, $10,000 \times g$ 离心空柱 2min 以甩干柱子基质。
10. 把柱子装在 1.5ml 离心管上, 加入 30-100ul DEPC Water 柱子基质上, 室温静置 2min。 $10,000 \times g$ 离心 1min 洗脱出 RNA。
11. RNA 浓度测定
吸取 1ul 抽提的 RNA 用 DEPC 水稀释 10 倍后。在 Nanodrop 上测定 RNA 浓度, 以 DEPC 水做空白对照, 同时记录 RNA 浓度及其 OD260 / OD280。

7. RNA 电泳检测

7.1. 变性胶制备

取 1g Agarose+75ml 去离子水煮沸, 冷却至 70°C 左右加入 10ml $10 \times$ Mops 和 15ml 甲醛及 EB。倒胶至宽口梳子的胶板上, 盖上盖子。

7.2. 电泳缓冲液配制(1×Mops)

取 50ml 10×Mops。用去离子水稀释至 500ml，倒入电泳槽中，再在电泳缓冲液中添加 EB

7.3. RNA 样品处理

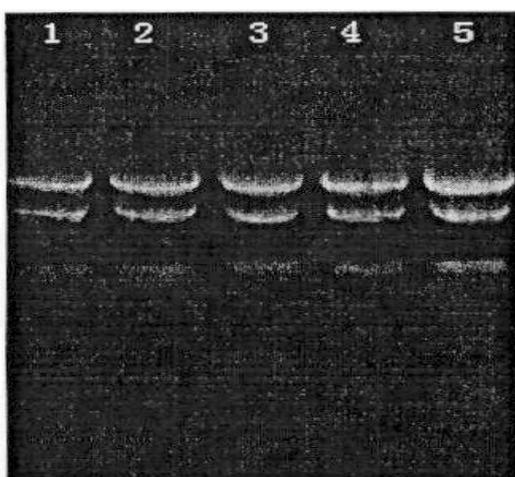
取 RNA 样品 3u1. 10×Mops 2u1. 最后补充 DEPC 水至 20ul，65℃变性 10min 后立即冷却。加入 2ul 10×RNA loadingbuffer 即可电泳

7.4. RNA 电泳

先把 RNA 胶放入电泳槽中，100V 作用电泳约 5min，再在点样孔中点入处理过的 RNA 样品，100V 左右电泳至溴酚蓝至胶的 2 / 3 处，取胶拍照。

8. RNA 抽提结果

8.1. RNA 电泳图(各 3ul RNA 样品):



Lane1:	No.1
Lane2:	No.2
Lane3:	No.3
Lane4:	No.4
Lane5:	No.5

8.2. RNA 电泳的各泳道所对应的样品及其样品浓度和 A260 / A280

泳道	RNA NO.	RNA 浓度(ng/ul)	A260/A280
1	NO.1	2397	1.97
2	NO.2	2246	1.95
3	NO.3	2553	1.91
4	NO.4	2484	1.95
5	NO.5	2454	1.93

反转录

1. 融解反应所需的试剂，上下轻微颠倒混匀，进行短暂离心后放置冰上待用。

2. RNA-Primer Mix 的配制反应（所有反应液的配制都在冰上操作）

在预冷的 RNase free 的反应管内加入以下试剂至总体积 13 μ l

试剂组分	体积	终浓度
Total RNA		1 μ g
60 μ M Oligo (dT) ₁₈	1 μ L	2.4 μ M
DEPC 水		至总体积 13 μ l

3. RNA 变性

混匀 RNA-Primer Mix，进行短暂离心，65℃变性 10min 后立即放置冰上。

4. 配制反转录反应液

在 RNA-Primer Mix 反应管内加入以下试剂至总体积 25 μ l

试剂组分	体积	终浓度
RNA-Primer Mix	13 μ l	
5 \times RT Reaction Buffer	5 μ l	1 \times
25mM dNTP	1 μ l	1mM
25U/ μ l RNase Inhibitor	1 μ l	1U/ μ l
200U/ μ l M-MLV RTase	1 μ l	8U/ μ l
DEPC 水	4 μ l	
总体积	25 μ l	

- 反转录反应
混匀反应 Mix, 短暂离心后 42 $^{\circ}$ C 孵育 1h。
- 灭活并保存反转录产物
反应结束后, 85 $^{\circ}$ C 灭活处理 5min, 最后 -20 $^{\circ}$ C 保存反转录产物。

定量 PCR 实验

本次服务是采用染料法 (SYBR Green I) 进行相对定量分析, 实验设计是按照 $\Delta \Delta C_t$ 解析法来进行设计。实验步骤如下:

- 将 2XAllinOneTMQ-PCR Mix 在室温下融解。轻柔得上下颠倒混匀并进行短暂离心。同时在使用过程中始终保持避光。
- PCR reaction mix 的制备 (在冰上操作)

试剂	用量	终浓度
2XAllinOne TM Q-PCR Mix	10 μ l	1 \times
ddH ₂ O	1 μ l	
PCR Forward Primer (4 μ M)	2 μ l	0.4 μ M
PCR Reverse Primer (4 μ M)	2 μ l	0.4 μ M
cDNA	5 μ l	
总体积	20 μ l	

注意: 在实验中也设计了 NTC(No Template Control), 其为阴性对照, 即在反应中用水来代替模板 cDNA, 其它试剂不变。从而来质控是否体系有污染。

迅速将 PCR reaction mix 稍混匀, 并加入 8 联管中。

- 将 8 联管进行短暂离心, 确保所有反应液在反应孔底部。
- PCR 反应, 采用了标准的三步法程序进行反应:

循环数	步骤	温度	时间	检测
1	预变性	95 $^{\circ}$ C	10min	Off
	变性	95 $^{\circ}$ C	10sec	Off
40	退火	57 $^{\circ}$ C	20sec	Off
	延伸	72 $^{\circ}$ C	15sec	On

- 在 PCR 反应后, 采用以下的程序进行熔解曲线分析

温度	温度间隔	时间	检测
72 $^{\circ}$ C ~95 $^{\circ}$ C	0.5 $^{\circ}$ C	6sec/each	On
30 $^{\circ}$ C		30sec	off

五: 定量 PCR 数据分析

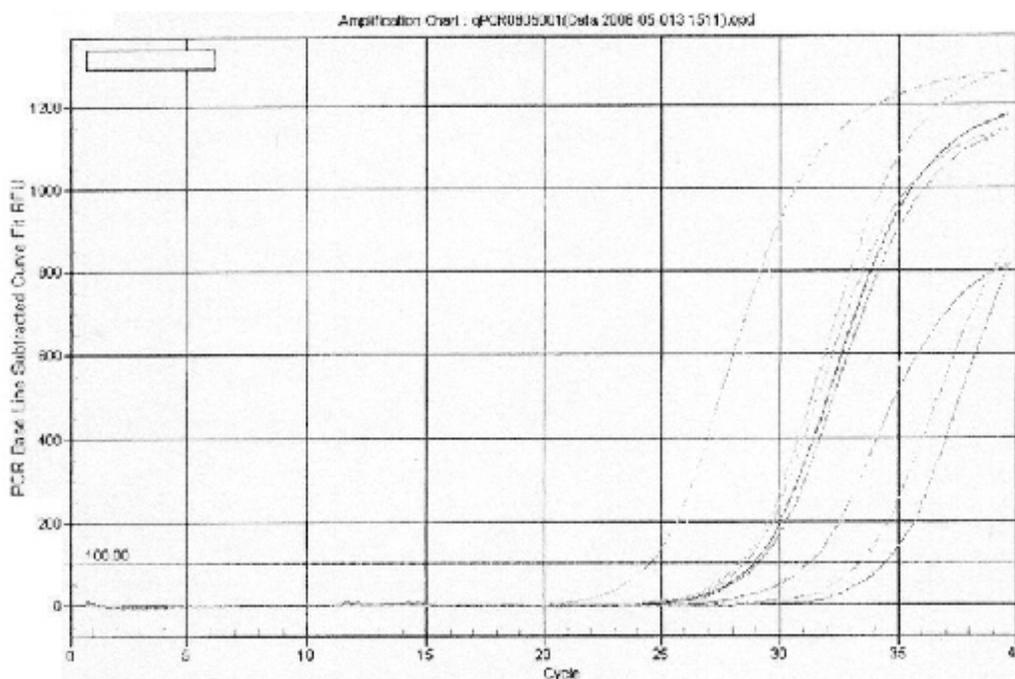
- 定量 PCR 试验原始数据
实验原始文件参考: qPCR.opd
经整理的数据(ct)请参考: qPCR information.xls-Original ct

2. 内参基因——GAPDH 在不同样本中的数据分析。

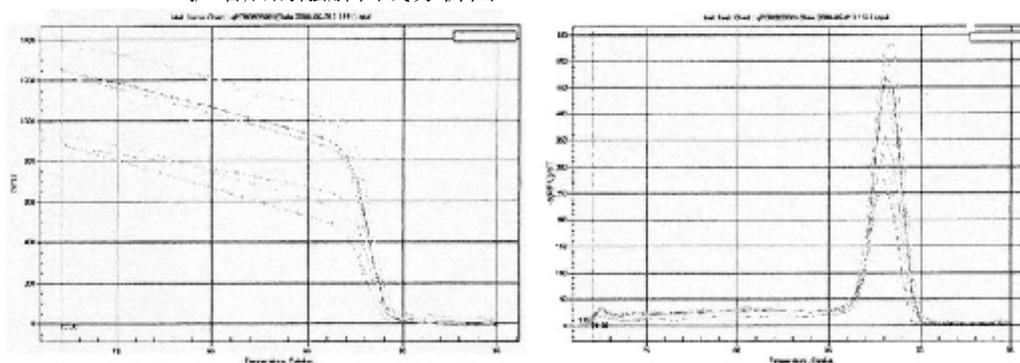
2.1 不同样品的 GAPCDH 的扩增 Ct 值

Sample	GAPDH		
	Ct1	Ct2	Ave.Ct
No.1	28.28	28.28	28.30
No.2	24.97	24.97	24.75
No.3	31.22	31.22	31.35
No.4	34.61	34.61	33.87
No.5	28.90	28.90	28.99
NTC	N/A	36.60	

2.2 GAPDH 的不同样品中的扩增曲线图

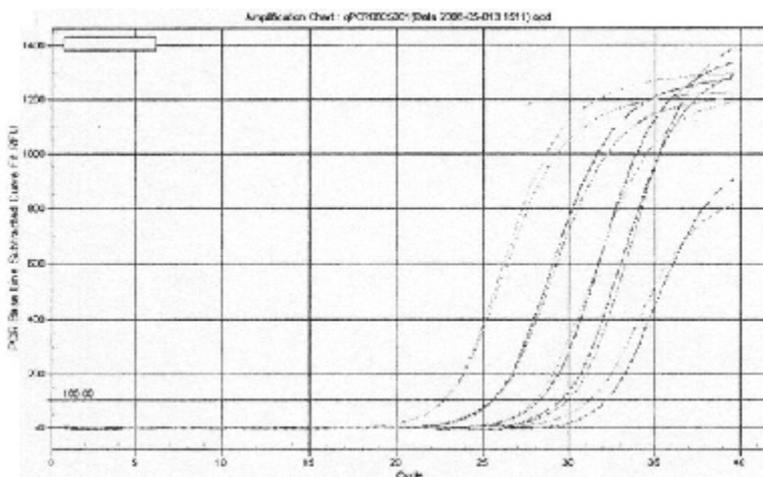


2.3 GAPDH 扩增后的融解曲线分析图

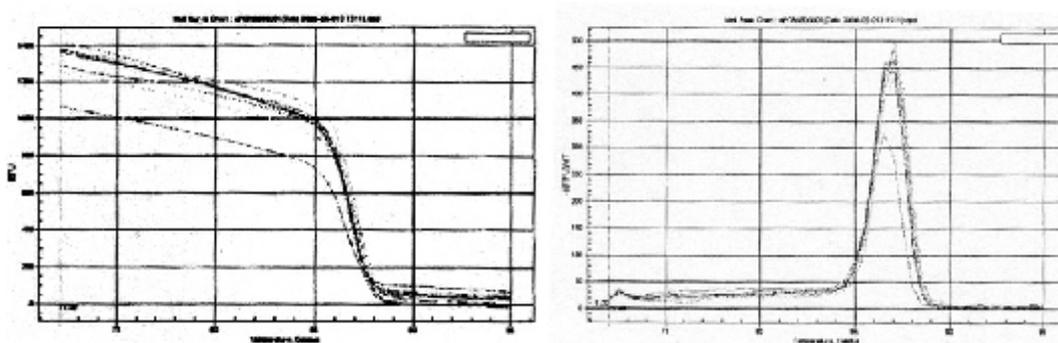


3. LIN28 表达量分析

3.1 LIN28 在不同样品中的扩增曲线图



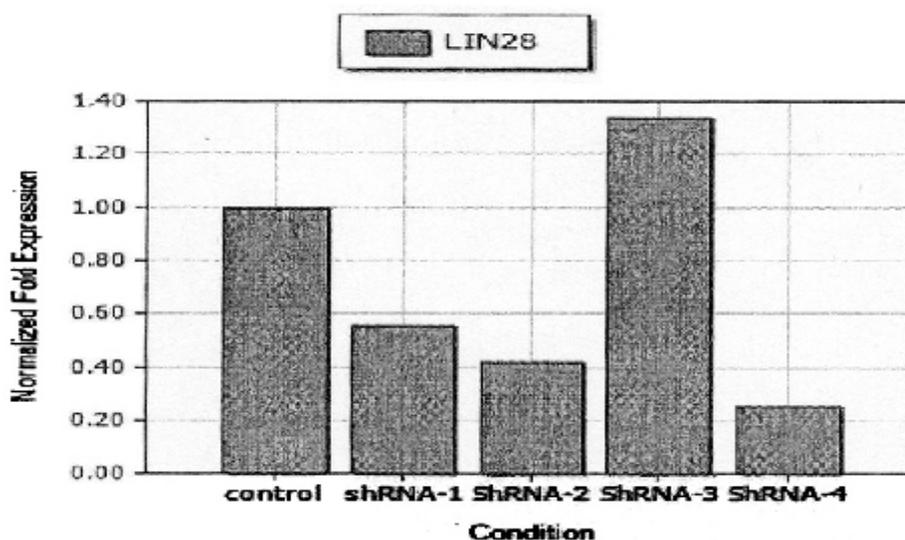
3.2 LIN28 扩增后融解曲线分析图



3.3 LIN28 表达量分析实验结果

Condition	Gene	Ctrl	Expression
Control	LIN28	*	1.00000
shRNA-1	LIN28		0.56018
shRNA-2	LIN28		0.42445
shRNA-3	LIN28		1.34550
shRNA-4	LIN28		0.25747

3.4 LIN28 表达量分析示意图



六：本次测试所附的资料清单：

1. 测试结果报告单.doc 一份
2. 相关图片.rar 一份
3. 信息资料 QPCR information.xls 一份

广州飞扬生物工程有限公司

实验负责人：

时间：