ttt

**实时荧光定量PCR实验**

**检测结题报告**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **客户姓名** |  | **订单编号** |  |
| **项目启动日期** |  | **项目完成日期** |  |
| **报告撰写人** |  | **报告复核人** |  |
| **报告授权人** |  | **报告生效日期** |  |

尊敬的客户：

您好！

**成都奥创生物科技有限公司**是联合多家高校、科研院所发起，由一批基础生物学、生物医药、临床医学领域杰出的科学家带队组成。主营业务包括整体课题项目服务实验（分子、蛋白、细胞、动物、病理等），全方位生物、医学研究技术服务和科研设计咨询、生物医药企业CRO外包服务等。

**成都奥创生物**联合多位来自于了中山大学、四川农业大学、华中农业大学、四川大学、中科院等著名高校以及研究机构的专家学者担任企业顾问，其中专业覆盖肿瘤学、蛋白免疫学、分子生物学、细胞生物学、形态学等诸多领域，并与国内相关领域的专家以项目合作的方式联合开展转化医学研究，组成了一个优势交叉互补、高度专业的科研团队，负责研发课题的具体实施和推进，确保各项目的高效与质量。致力于实验科研平台互联，资源共享。借助此平台为广大科研院校，生物医药企业及个人提供分子、蛋白、细胞、病理等研究技术服务。

1. **整体项目平台**

能为广大客户提供从课题咨询，课题设计，项目实施到论文撰写，润色，发表等一站 式整体课题外包服务，强大的科研团队，全面的技术平台和完善的管理体系，让您的课题进展更加高效。

1. **核酸研究平台**

服务项目：核酸抽提，常规PCR，荧光定量PCR，微滴式数字PCR，载体构建，甲基化检测等。

1. **蛋白与免疫平台**

服务项目：Western blot，IP/COIP检测，无标记分子互作检测，ELISA，多因子蛋白悬液芯片检测，蛋白表达纯化，蛋白质谱等。

1. **细胞研究平台**

服务项目：细胞周期，细胞凋亡，细胞增殖，细胞共培养及趋化，细胞迁移及侵袭，细胞粘附检测，流式细胞检测，稳转细胞系构建，细胞单克隆形成检测，双荧光素酶检测，显微拍照检测等。

1. **病毒包装平台**

服务项目：慢病毒包装，逆转录病毒包装，腺病毒包装，腺相关病毒包装等。

1. **病理染色**

服务项目：各类切片及染色服务，电镜检测，免疫荧光，免疫组化，tunel，原位杂交染色，全景扫描，分析阅片等。

1. **动物模型平台：**

服务项目：常见疾病动物模型及肿瘤模型构建，肝功，肾功，血糖，血脂，无机离子，尿常规，凝血检测，血常规等生化检测。

**我们的服务承诺：** █ 唯一 █ 真实 █ 专业 █ 效率

欢迎科研院所、医院、生物医药企业的广大用户来我公司进行科研项目订制，我们将为您提供专业高效的一站式科研服务。

## 声明

为保证独立、客观、公正地从事检验检测工作，提高服务质量。现以奥创生物名义，向社会各界和客户作如下声明，并接受有关单位和客户的监督。

1、遵守国家的各项法律、法规、政策，严格执行有关标准，规范及细则等技术文件开展检测工作，以诚实、公正的态度确保检测工作质量，并对检测结果负责。

2、公司具有固定的工作和检验检测场所，拥有与开展的检测工作相匹配的专业技术、管理人员，拥有相关检测所需的设备设施。

3、承诺对客户的技术、资料、数据和其他商业机密严格保密，切实维护客户的权益，绝不利用客户的技术和资料从事技术开发和技术服务。

4、承诺对所有委托方一视同仁，提供相同的优质、高效服务，保证检测数据和结果的真实、客观、准确。

5、承诺出具的检验检测数据、结果独立于所涉及的利益相关方，不受任何可能干扰其技术判断因素的影响，确保检验检测数据、结果的真实、客观、准确。

以上声明，本公司全体人员必须严格遵守。

成都奥创生物科技有限公司

目录

[声明 4](#_Toc169613704)

[一、样本信息 6](#_Toc169613705)

[二、实验仪器 6](#_Toc169613706)

[三、实验步骤 7](#_Toc169613707)

[1.总RNA抽提 7](#_Toc169613708)

[组织 7](#_Toc169613709)

[单层生长的细胞 7](#_Toc169613710)

[细胞悬液 8](#_Toc169613711)

[血液 8](#_Toc169613712)

[2.反转录 9](#_Toc169613713)

[3.qPCR 9](#_Toc169613714)

[四、数据分析 10](#_Toc169613715)

# 样本信息

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 样本编号 | 样本来源 | 样本类型 | 样本量 |
|  |  |  |  |

# 实验仪器

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **仪器名称** | **品牌** | **型号** |
| 高速冷冻离心机 | SciloEGX | CF1524R |
| 高速低温组织研磨仪 | Servicebio | KZ-IH-F |
| 微量离心机 | SciloEGX | S1010 |
| 实时荧光定量PCR分析仪 | BIOER | FQD-96C |
| 超微量分光光度计 | KAIAO | K5600 |
| 超净工作台 | 尚光 | IFD |
| 手动单通道移液器 | 赛默飞 | 4640110 |
| 手动单通道移液器 | 赛默飞 | 464000 |
| 手动单通道移液器 | 赛默飞 | 4640040 |
| 手动单通道移液器 | 赛默飞 | 4640050 |
| 手动单通道移液器 | 赛默飞 | 4640060 |
| 手动单通道移液器 | Eppendorf | M15465K |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **试剂名称** | **品牌** | **货号** |
| 裂解液RZ（Buffer RZ） | 天根 | RK145 |
| DEPC水 | Biosharp | BL510B |
| RNase清除液 | Servicebio | G3032 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **耗材名称** | **品牌** | **货号** |
| RNAsimple 总RNA提取试剂盒 | 天根 | DP419 |
| Blastaq TM 2× qPCR MasterMix试剂盒 | ABM | G891 |
| All-in-one 5× RT Mast Mix试剂盒 | ABM | G592 |
| 离心管 | LABSELECT | MCT-001-150 |
| 研磨管 | Servicebio | HT-200-M |
| 0.2ml平盖八连管（含盖） | LABSELECT | PST-0208-FT-C |
| 4mm研磨珠（氧化锆） | Servicebio | G0204 |
| 3mm研磨珠（氧化锆） | Servicebio | G0203 |
| 移液器吸头 | biosharp | BS-10-T |
| 移液器吸头 | LABSELECT | T-001-200 |
| 移液器吸头 | biosharp | BS-1000-T |
| 移液器吸头 | LABSELECT | T-001-1250 |

# 实验步骤

## 引物设计

（1）mRNA、lncRNA；

引物设计遵循以下原则：

①引物应在核酸序列保守区内设计并具有特异性；

②引物长度一般在 18-25 碱基之间；

③避免连续出现相同的核苷酸；

④CG含量在45%-55%之间；

⑤上下游引物Tm值差控制在5℃以内；

⑥扩增产物长度在 80-250bp。最长不要超过 300bp；

⑦引物内部或引物之间避免形成二级结构、发夹结构。

（2）miRNA：

采用茎环法设计引物，包括逆转录引物和用于qPCR检测的引物。

①逆转录引物：通用的茎环序列+5~8个与目的miRNA的3’端反向互补的碱基；

②qPCR检测正向引物：根据miRNA的序列设计，一般用除去3’端6个碱基的剩余部分。若GC含量较低，可在5’端增加G/C进行调增，使引物Tm值接近60℃；

③qPCR检测反向引物：为通用引物，一般选取茎环结构中的一部分。

（3）circRNA：

①对于外显子环化circRNA，引物跨剪切位点（backsplice）设计；

②对于内含子环化circRNA，可跨剪切位点设计，也可围绕内含子区域设计引物；

③扩增产物长度建议不超过100 bp。

## 总RNA抽提

（1）样本处理；

组织

每50-100 mg组织加1 ml裂解液RZ，用匀浆仪进行匀浆处理。样品体积不应超过裂解液RZ体积的十分之一。

单层生长的细胞

直接在培养板中加入裂解液RZ裂解细胞，每10cm2面积加1ml RZ。用移液枪抽打若干次至溶液透明。

细胞悬液

离心取细胞，弃上清。每5-10×106动物细胞和植物细胞加入1ml裂解液RZ。加裂解液RZ前不要洗涤细胞，以免降解mRNA。

血液

直接取新鲜血液，加入3倍体积RZ（推荐0.25 ml血液+0.75 ml RZ），充分振荡混匀。

（2）将匀浆样品在室温放置5min，使得核酸蛋白复合物完全分离

（3）4℃ 12000 rpm(~13400×g)离心5min，取上清，转入一个新的无RNase的离心管中。

（4）加入200 μl氯仿，盖好管盖，剧烈振荡15 sec，室温放置3min。

（5）4℃ 12000 rpm(~13400×g)离心10min，样品会分成三层：黄色的有机相，中间层和无色的水相，RNA主要在水相中，水相的体积约为所用裂解液RZ试剂的50%。把水相转移到新管中，进行下一步操作。

（6）缓慢加入0.5倍体积无水乙醇，混匀（此时可能会出现沉淀）。将得到溶液和沉淀一起转入吸附柱CR3中，4℃ 12000rpm（~13400×g)离心30sec，若一次不能将全部溶液和混合物加入吸附柱CR3，请分两次转入吸附柱CR3中，4℃ 12000rpm(~13400×g)离心30sec，弃掉收集管中的废液。

（7）向吸附柱CR3中加入500μl去蛋白液RD（使用前请先检查是否已加入无水乙醇）， 4℃ 12000rpm(~13400×g)离心30sec，弃废液，将CR3放入收集管中。

（8）向吸附柱CR3中加入500μl漂洗液RW（请先检查是否已加入无水乙醇），室温静置2 min，4℃ 12000rpm(~13,400×g)离心30sec，弃废液

（9）重复操作步骤8。

（10）将吸附柱放入新的2ml收集管中，4℃ 12000 rpm(~13,400×g)离心2min，去除残余液体。离心后将吸附柱CR3在室温放置片刻，或置于超净工作台上通风片刻，以充分晾干。

（11）将吸附柱CR3转入一个新的1.5ml离心管中，加30-100μl RNase-Free ddH2O，室温放置2min，4℃ 12000 rpm(~13,400×g)离心2min。洗脱缓冲液体积不应少于30μl，体积过小影响回收效率。且RNA应保存在-80℃，以防降解。（注意：如果想提高RNA得率，可重复上步操作一次，合并两次得到的溶液。）

## 反转录

取0.2ml PCR管，配制如下反应体系：

|  |  |
| --- | --- |
| **试剂** | **体积** |
| All-ln-One 5X RT-MasterMix | 4ul |
| Total RNA or poly(A)+mRNA | 200-1000ng |
| Nuclease-free H2O | Up to 20ul |

在PCR仪上进行如下程序：首先37℃维持15min，然后60℃维持10 min，最后95℃ 维持3min，结束后置于冰上冷却。

## qPCR

取0.2ml PCR管，配制如下反应体系：

|  |  |
| --- | --- |
| **试剂** | **体积** |
| 2× qPCR Mix | 10.0μL |
| 10 μM基因引物 | 1.0 μL（上下游引物各0.5 μL） |
| 反转录产物 | 2.0 μL |
| DEPC H2O | 7.0 μL |
| 总体积 | 20 μL |

在PCR仪上进行如下程序：预变性 95℃ 3min； 95℃ 15s→60℃ 20s（循环40次）；熔解曲线60℃→95℃，每15s升温0.3℃

# 数据分析

（1）求出mRNA三个重复孔的平均值；

（2）根据ΔΔCt法求出相对表达量。

ΔCt=Ct目的基因-Ct管家基因（内参）

ΔΔCt=ΔCt待测样本-ΔCt对照样本

相对表达量=2–∆∆Ct

**详细实验结果见附件一、附件二**