



Cat.NO. A2020A0027H/S

BioTNT[®] Transitor[®] gene qPCR Array

Tools for Pathway

<http://www.biotnt.com>

Introduction

PCR ARRAY of Human Cell Cycle

——人类细胞周期 PCR 阵列

Cat. No.A2020A0027H/S

2套起订。A2020A0027H/S包含84对不同基因的特异引物，包被于1块96孔板上。

一. 产品说明

Human Cell Cycle PCR阵列可分析84个细胞周期调控关键基因的表达谱。该阵列包含的基因涉及细胞周期正向与负向调控、各细胞周期时相转换、DNA复制、检查点调控及细胞周期停滞等生物学过程。通过实时荧光定量PCR技术，研究人员可利用本阵列简便、可靠地集中分析与细胞周期相关的基因表达。

二. 运输和储存条件

4℃运输

-20℃储存12个月；

三. 适用仪器

Biotnt可提供多种与以下qPCR仪器匹配的qPCR array类型。

重要提示：在订购前，请根据您的qPCR仪器型号选购合适的array类型；在收到产品后，请及时确认收到的array是否与您的qPCR仪器匹配。如果您的仪器类型不在下表所列类型中，请及时联系本公司技术支持咨询。

plate format	Instrument provider	qPCR instrument model
B(96 well)	lifetechnologies	7300,7500,7700,7900 (standard 96well) ,

		ViiA7 (standard 96well)
C(96 well)	lifetechnologies	7500(fast block) , 7900HT (fast block) , stepone plus , ViiA 7(Fast block)
D(96 well)	Biorad	iCycler , MyiQ,iQ5
E(96 well)	Biorad	CFX96 , DNA Engine opticon , opticon2 , Chromo4

四. 用户需要自备的材料和仪器

RNA 抽提：请使用去基因组的RNA抽提试剂盒；

cDNA 合成：请使用cDNA第一链合成/RNA逆转录试剂盒。BioTNT的相应货号是：
A2010A0602；

Realtime PCR PreMIX：请使用sybgreen 法的qPCR mix；BioTNT的相应货号是：
A2010A001；

DNase/RNase free枪头，PCR反应管，1.5mL离心管；请使用无菌无酶枪头；

10 μ L到1,000 μ L可调节单通道微量移液器以及适配的枪头

5 μ L到20 μ L可调节多通道微量移液器以及适配的一次性枪头

定量qPCR仪器

五. 基因（引物）排布

每一个样本区里的基因排列如下：

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	基因 1	基因 2	基因 3	基因 4	基因 5	基因 6	基因 7	基因 8	基因 9	基因 10	基因 11	基因 12
B	基因 13	基因 14	基因 15	基因 16	基因 17	基因 18	基因 19	基因 20	基因 21	基因 22	基因 23	基因 24
C	基因 25	基因 26	基因 27	基因 28	基因 29	基因 30	基因 31	基因 32	基因 33	基因 34	基因 35	基因 36
D	基因 37	基因 38	基因 39	基因 40	基因 41	基因 42	基因 43	基因 44	基因 45	基因 46	基因 47	基因 48

E	基因 49	基因 50	基因 51	基因 52	基因 53	基因 54	基因 55	基因 56	基因 57	基因 58	基因 59	基因 60
F	基因 61	基因 62	基因 63	基因 64	基因 65	基因 66	基因 67	基因 68	基因 69	基因 70	基因 71	基因 72
G	基因 73	基因 74	基因 75	基因 76	基因 77	基因 78	基因 79	基因 80	基因 81	基因 82	基因 83	基因 84
H	HK1	HK1	HK1	HK2	HK2	HK2	HGDC	HGDC	HGDC	PTC	PTC	PTC

•**基因引物**：84个反应孔（从A排到G排）已预先交联好特异基因引物（详见基因引物列表）。

•**HK1**：已交联的管家基因(内参)引物 β -actin，可作为array数据标准化过程中样品的阳性对照。

•**HK2**：已交联的管家基因(内参)引物GAPDH，可作为array数据标准化过程中样品的阳性对照。

•**HGDC**：基因组DNA对照，可用于qPCR反应体系中是否有基因组DNA污染。

•**PTC基因**：已经交联阳性模板和内参引物，可用作阳性对照。

六. 基因引物列表：

	Symbol	Gene ID	Catelog No. of Primer
基因 1	ABL1	25	tnt2217a
基因 2	ANAPC2	29882	tnt10030a
基因 3	ATM	472	tnt2988a
基因 4	ATR	545	tnt10031a
基因 5	AURKA	6790	tnt3597a
基因 6	AURKB	9212	tnt1904b
基因 7	BCCIP	56647	tnt3574a
基因 8	BCL2	596	tnt5211c
基因 9	BIRC5	332	tnt1963b
基因 10	BRCA1	672	tnt2233a
基因 11	BRCA2	675	tnt2234b

基因 12	CASP3	836	tnt5212b
基因 13	CCNA2	890	tnt5479a
基因 14	CCNB1	891	tnt6601b
基因 15	CCNB2	9133	tnt3585a
基因 16	CCNC	892	tnt3598a
基因 17	CCND1	595	tnt5368b
基因 18	CCND2	894	tnt3365a
基因 19	CCND3	896	tnt10008a
基因 20	CCNE1	898	tnt5325a
基因 21	CCNF	899	tnt3586b
基因 22	CCNG1	900	tnt3468b
基因 23	CCNG2	901	tnt3589a
基因 24	CCNH	902	tnt7268b
基因 25	CCNT1	904	tnt3577b
基因 26	CDC16	8881	tnt3587a
基因 27	CDC20	991	tnt3588a
基因 28	CDC25A	993	tnt3065b
基因 29	CDC25C	995	tnt3079a
基因 30	CDC34	997	tnt3565b
基因 31	CDC6	990	tnt3568a
基因 32	CDK1	983	tnt3288a
基因 33	CDK2	1017	tnt5324c

基因 34	CDK4	1019	tnt3287a
基因 35	CDK5R1	8851	tnt2228b
基因 36	CDK5RAP1	51654	tnt3578a
基因 37	CDK6	1021	tnt1093b
基因 38	CDK7	1022	tnt7266b
基因 39	CDK8	1024	tnt3600b
基因 40	CDKN1A	1026	tnt5323b
基因 41	CDKN1B	1027	tnt2227a
基因 42	CDKN2A	1029	tnt2225a
基因 43	CDKN2B	1030	tnt5475b
基因 44	CDKN3	1033	tnt3566b
基因 45	CHEK1	1111	tnt3066a
基因 46	CHEK2	11200	tnt3067a
基因 47	CKS1B	1163	tnt3579a
基因 48	CKS2	1164	tnt3580b
基因 49	CUL1	8454	tnt2218b
基因 50	CUL2	8453	tnt2219b
基因 51	CUL3	8452	tnt2220b
基因 52	E2F1	1869	tnt2221b
基因 53	E2F4	1874	tnt3601b
基因 54	GADD45A	1647	tnt3076b
基因 55	GTSE1	51512	tnt3581b

基因 56	HUS1	3364	tnt3590a
基因 57	KNTC1	9735	tnt3591a
基因 58	KPNA2	3838	tnt3582b
基因 59	MAD2L1	4085	tnt3592a
基因 60	MAD2L2	10459	tnt3593a
基因 61	MCM2	4171	tnt3569b
基因 62	MCM3	4172	tnt3570b
基因 63	MCM4	4173	tnt3571b
基因 64	MCM5	4174	tnt3572b
基因 65	MDM2	4193	tnt5351a
基因 66	MKI67	4288	tnt3602b
基因 67	MNAT1	4331	tnt3583a
基因 68	MRE11	4361	tnt3014a
基因 69	NBN	4683	tnt3594a
基因 70	RAD1	5810	tnt5477b
基因 71	RAD17	5884	tnt3595a
基因 72	RAD51	5888	tnt2231a
基因 73	RAD9A	5883	tnt3596b
基因 74	RB1	5925	tnt2246a
基因 75	RBBP8	5932	tnt3070b
基因 76	RBL1	5933	tnt3605a
基因 77	RBL2	5934	tnt3606b

基因 78	SERTAD1	29950	tnt3584a
基因 79	SKP2	6502	tnt3567b
基因 80	STMN1	3925	tnt6602a
基因 81	TFDP1	7027	tnt3603a
基因 82	TFDP2	7029	tnt3604a
基因 83	TP53	7157	tnt5980b
基因 84	WEE1	7465	tnt3573b

七. 实验步骤:

7.1 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。注意：请确认 qPCR array 与您的 qPCR 仪器匹配；
2. 严格按照 qPCR 标准步骤操作，抽提 mRNA，注意去除基因组污染；避免核酸污染和非特异性扩增。

RNA 定量与质量控制:

- A. 使用 DEPC 水稀释 RNA 样本，检测 260nm 和 280nm 吸光值，A260/280 应大于 1.8。
- B. 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。
- C. 使用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。

D. 建议：RNA 质量测定后，逆转录得到 cDNA，建议用多个内参基因自行验证 cDNA 质量；

3. 基因组 DNA 污染控制和 RNA

每个 Array 板块上的 HGDC (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 值与 HK1 的 CT 差值小于 8，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。建议采用柱式抽提过程中加入 DNase 去除基

基因组污染。

4. RNA 含量调平：实验样本的 RNA 尽量调到同一水平；加入 DEPC 水，调整 RNA 浓度；预计每个样本需要的 RNA 量和 RT-PCR 反应数(逆转录 cDNA；采用逆转录试剂盒进行，每个样本准备 135 μ L 的 cDNA)；

7.2 PCR Array 实验步骤

1. 从-20℃冰箱拿出PCR Array，平衡到室温后拆开自封袋，取出PCR Array的96孔板；
2. 融解并充分混匀BioTNT qPCR 染料法premix，短暂离心使管中试剂处于底部，冰上保存。（一块96孔板需要使用1.35mL premix）；
3. 把96孔板放入板式离心机，2000rpm 离心1分钟。
4. 去除积存在封闭反应板表面的冷凝物，小心撕去板上的密封膜。
5. 样本加样，进行qPCR实验；配制过程在冰上操作。

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%。

充分混匀qPCR反应液，短暂离心。每个反应孔精确加入20 μ L反应液。每次加样都需要换用新的枪头以避免交叉污染。

准备PCR混合物：样本准备135 μ L cDNA，加入675 μ L DEPC水和1.35mL premix（采用BioTNT premix，货号：A2010A001），混合得2160 μ L 液体。每孔加入20 μ L混合液；

6. 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。把96孔板放入板式离心机，2000rpm 离心2分钟；去除气泡。
7. 开始qPCR反应，推荐使用下表中两步法qPCR反应程序。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。

【扩增条件】

推荐使用的反应条件及软件程序设定为：

95℃ 5 分钟→95℃ 5 秒→60℃ 30 秒（读板）→溶解曲线分析
└──────────┘
40 个循环

7.3 数据导出后进行分析;

● 7.3.1 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。

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 (Threshold) 时所经过的扩增循环次数 (cycle)，被称为 CT 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 $\Delta\Delta CT$ 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。计算时按照 CT 值为 35 进行计算。

● 7.3.2 质量控制

1. biotnt gene qPCR array 中检测的基因引物，经实验验证结果分析，融解曲线均呈单一锐峰，电泳条带均呈单一条带，说明这些引物均是特异扩增引物，验证合格。

2. HK1 和 HK2 为两种内参基因，CT 值应低于 25，建议在上样之前先检测样本浓度和进行内参基因的含量检测；HK1 的三重复 CT 差值在 0.5 以内；

3. PTC 的 CT 值应小于 25，说明样本和体系可以正常工作。

4. HGDC 的 CT 值：每个 Array 板块上的 HGDC (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 值与 HK1 的 CT 差值小于 8，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。
5. 板与板之间（批内）重复性达 0.99 以上，具有高度重复性。

● 7.3.3 数据分析

下载数据分析系统 (<http://www.biotnt.com>) 进行数据分析。此数据分析系统采用 $\Delta\Delta$ Ct 法来实现 fold-change 分析或基因的表达量水平 (CT 值) 统计学分析。

1. 在开始分析前请下载并阅读“Biotnt Array 数据分析操作指南”。
2. 将 CT 值输入相应的数据分析模板 (Sample Data.xls 和 Control Data.xls)，选择合适的参照和分析参数。

注意：被选作采用 $\Delta\Delta$ Ct 法对 qPCR Primer Array 标准化的参数必须不受实验设计影响。

因此需采用一个或多个已经过实验确证的参数。参数的单个 CT 值或平均值可用于标准化实验。

3. 完成指定分析。实验重复至少 3 次后会得到统计数值 (p 值)。通过分析数据结果即可简便快捷的筛选出您感兴趣的基因，便于以后的研究。

使用限制

以下条款适用于 BioTNT qPCR Array 产品。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，不得使用于人体或诊断、治疗。未经 BioTNT 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

BioTNT 保证产品与产品数据表中描述的规格保持一致。

若经 BioTNT 证实产品未达到规格要求，BioTNT 将为您替换此产品。若无法替换，BioTNT 将退款给购买者。此质量保证仅适用于最初产品购买者。

BioTNT 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和试剂产生的损耗，BioTNT 不承担责任。BioTNT 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。

BioTNT 致力于为消费者提供高质量的研究产品。如果您对 BioTNT 的产品有任何问题或疑虑，请拨打电话 **4008801880** 联系