



**Cat.NO.** A2020A0104H/S

## **BioTNT<sup>®</sup> Transitor<sup>®</sup> gene qPCR Array**

Tools for Pathway

<http://www.biotnt.com>

# Introduction

---

## PCR ARRAY of Human Mitochondrial Energy Metabolism

——人类线粒体能量代谢 PCR 阵列

Cat. No.A2020A0104H/S

2套起订。A2020A0104H/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 Mitochondrial Energy Metabolism PCR阵列可检测84个参与线粒体呼吸作用的关键基因表达谱，包括编码电子传递链和氧化磷酸化复合物的基因。NADH与FADH<sub>2</sub>（糖酵解和三羧酸循环的代谢产物）的氧化过程，通过嵌入线粒体内膜的四组蛋白复合物完成：NADH-辅酶Q还原酶、琥珀酸-辅酶Q还原酶、辅酶Q-细胞色素c还原酶以及细胞色素c氧化酶。这些过程产生的自由能通过第五蛋白复合物（ATP合酶）驱动氧化磷酸化及ATP合成。这些过程的失调是癌症进展中的重要病理后果——尽管具体抑制机制尚未明确，但多数肿瘤均呈现线粒体呼吸链组分含量下降的现象。最新研究表明，重要抑癌基因p53可诱导COX2（细胞色素c氧化酶功能必需组分）的表达。线粒体功能异常还会加剧代谢综合征与肥胖症，其中过量的 $\beta$ -氧化通过生成超载的NADH使氧化磷酸化系统超负荷运转。通过实时荧光定量PCR技术，研究人员可利用本阵列简便、可靠地集中分析与线粒体能量代谢相关的基因表达。

### 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  $\mu$  L到1,000  $\mu$  L可调节单通道微量移液器以及适配的枪头

5  $\mu$  L到20  $\mu$  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  $\beta$ -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	ATP12A	479	tnt6854b
基因 2	ATP4A	495	tnt6855b
基因 3	ATP4B	496	tnt6856b
基因 4	ATP5F1A	498	tnt10024a
基因 5	ATP5B	506	tnt3727a
基因 6	ATP5C1	509	tnt6857a

基因 7	ATP5F1	515	tnt6858b
基因 8	ATP5G1	516	tnt6859b
基因 9	ATP5G2	517	tnt6860b
基因 10	ATP5G3	518	tnt6861b
基因 11	ATP5H	10476	tnt6862a
基因 12	ATP5I	93974	tnth10615a
基因 13	ATP5J	522	tnt6864b
基因 14	ATP5J2	9551	tnt6865b
基因 15	ATP5L	10632	tnt6866b
基因 16	ATP5O	539	tnt6867a
基因 17	ATP6V0A2	23545	tnt6868a
基因 18	ATP6V0D2	245972	tnt6869b
基因 19	ATP6V1C2	245973	tnt6870b
基因 20	ATP6V1E2	90423	tnt6871b
基因 21	ATP6V1G3	127124	tnt6872b
基因 22	BCS1L	617	tnt6873b
基因 23	COX4I1	1327	tnt6033a
基因 24	COX4I2	84701	tnt6034b
基因 25	COX5A	9377	tnt4191a
基因 26	COX5B	1329	tnt6874a
基因 27	COX6A1	1337	tnt6875a
基因 28	COX6A2	1339	tnt6876b

基因 29	COX6B1	1340	tnt7473b
基因 30	COX6B2	125965	tnth10616a
基因 31	COX6C	1345	tnt6879a
基因 32	COX7A2	1347	tnt6880a
基因 33	COX7A2L	9167	tnt6881a
基因 34	COX7B	1349	tnt6882b
基因 35	COX8A	1351	tnt6883b
基因 36	COX8C	341947	tnt6884b
基因 37	CYC1	1537	tnt6885b
基因 38	LHPP	64077	tnt6886b
基因 39	NDUFA1	4694	tnt6887b
基因 40	NDUFA10	4705	tnt6888b
基因 41	NDUFA11	126328	tnt6889a
基因 42	NDUFA2	4695	tnt6890b
基因 43	NDUFA3	4696	tnt6891b
基因 44	NDUFA4	4697	tnt6892b
基因 45	NDUFA5	4698	tnt6893b
基因 46	NDUFA6	4700	tnt6894b
基因 47	NDUFA7	4701	tnt6895a
基因 48	NDUFA8	4702	tnt6896a
基因 49	NDUFAB1	4706	tnt6897a
基因 50	NDUFB10	4716	tnt6898b

基因 51	NDUFB2	4708	tnt6899b
基因 52	NDUFB3	4709	tnt6177a
基因 53	NDUFB4	4710	tnt6900b
基因 54	NDUFB5	4711	tnt6901a
基因 55	NDUFB6	4712	tnt6902b
基因 56	NDUFB7	4713	tnt6903b
基因 57	NDUFB8	4714	tnt6032a
基因 58	NDUFB9	4715	tnt6904b
基因 59	NDUFC1	4717	tnt6905b
基因 60	NDUFC2	4718	tnt6906b
基因 61	NDUFS1	4719	tnt6907b
基因 62	NDUFS2	4720	tnt6908b
基因 63	NDUFS3	4722	tnth10617a
基因 64	NDUFS4	4724	tnt6910a
基因 65	NDUFS5	4725	tnt6911b
基因 66	NDUFS6	4726	tnt6912b
基因 67	NDUFS7	374291	tnt6913a
基因 68	NDUFS8	4728	tnt6914b
基因 69	NDUFV1	4723	tnt6915b
基因 70	NDUFV2	4729	tnt6916b
基因 71	NDUFV3	4731	tnt6917b
基因 72	OXA1L	5018	tnt6918b

基因 73	PPA1	5464	tnt8023a
基因 74	PPA2	27068	tnt6920b
基因 75	SDHA	6389	tnt5751b
基因 76	SDHB	6390	tnt6031a
基因 77	SDHC	6391	tnt6921b
基因 78	SDHD	6392	tnt6922a
基因 79	UQCR11	10975	tnt6923a
基因 80	UQCRC1	7384	tnt6924a
基因 81	UQCRC2	7385	tnt6030a
基因 82	UQCRFS1	7386	tnt4214a
基因 83	UQCRH	7388	tnt6925b
基因 84	UQCRQ	27089	tnt6926a

## 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  $\mu$ L 的 cDNA);

## 7.2 PCR Array 实验步骤

1. 从 -20 $^{\circ}$ C 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 1.35 mL premix);
3. 把 96 孔板放入板式离心机, 2000 rpm 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  $\mu$ 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  $\mu$ L cDNA, 加入 675  $\mu$ L DEPC 水和 1.35 mL premix (采用 BioTNT premix, 货号: A2010A001), 混合得 2160  $\mu$ L 液体。每孔加入 20  $\mu$ 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, 2000 rpm 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