Realtime PCR

实时荧光定量 PCR 技术是在 PCR 反应体系中加入荧光基团，利用荧光信号累积实时监测整个 PCR 进程，最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。该技术不仅实现了对 DNA 模板的定量而且具有灵敏度高、特异性和可靠性更强、能实现多重反应、自动化程度高、无污染性、具实时性和准确性等特点。

实验步骤：

1. 样品获取、处理和制备

1.1 悬浮细胞：将悬浮细胞 1×10^6 个/mL 培养液倒入离心管中，离心沉淀细胞。PBS 冲洗 2 次，将细胞离心底部，向离心管中

加入 500-1000μl Trizol，然后置于-80 度冰箱保存。或者将离心底部的干细胞置于-80 度冰箱保存。

1.2 贴壁细胞：用胰酶消化细胞 1×10^6 个/mL，离心 PBS 冲洗 2 次，将细胞离心底部，向离心管中加入 500-1000μl Trizol，然

后置于-80 度冰箱保存。或者将离心底部的干细胞置于-80 度冰箱保存。

1.3 组织：采集新鲜组织 100mg，放入离心管中，做好标记，于液氮冷冻片刻后，置于-80 度冰箱保存。

1.4 血液：用抗凝管收集的全血 1mL，加入 RNA 保护剂，做好标记，置于-80 度冰箱保存。

2. RNA 或 DNA 质控

3. 反转录

4. 引物验证

5. qPCR 过程

6. 数据分析

我们提供：

1. 抽取的 RNA 和电泳图及逆转录的 cDNA 样本

2. 操作步骤及详细的试剂和耗材

3. 引物序列

4. 溶解曲线和扩增曲线

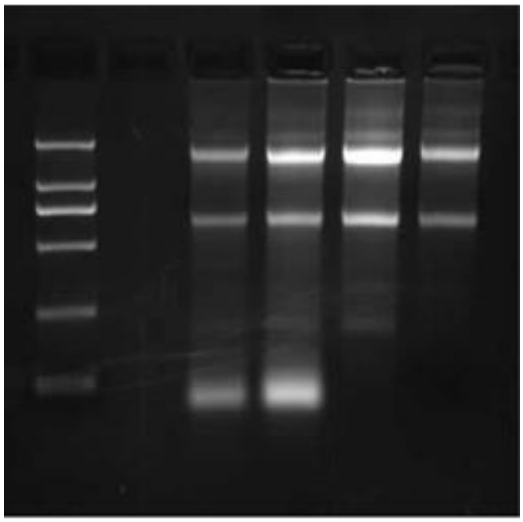
5. 原始数据及处理后的正式实验数据

实验器材：

组织研磨仪

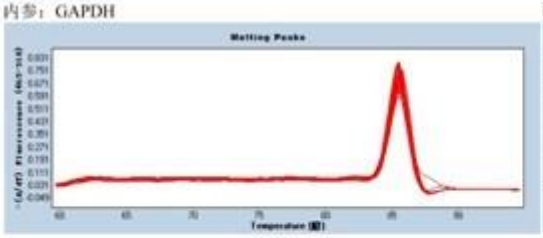
RNA 浓度测定仪　　罗氏 480II

结果示意图：

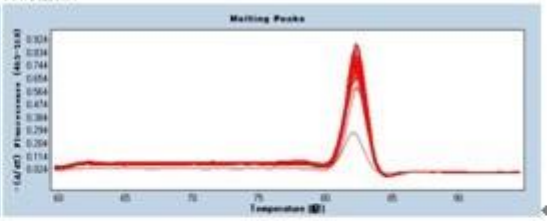


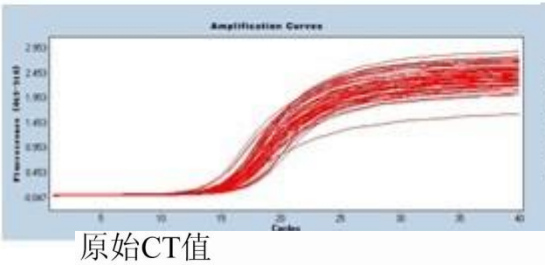
RNA 电泳图

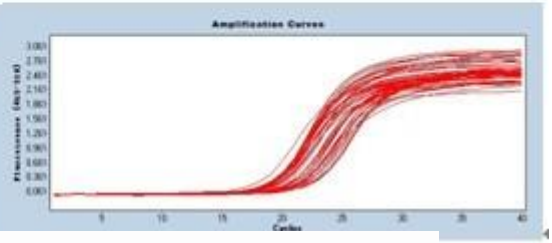
内参：GAPDH



目的基因：

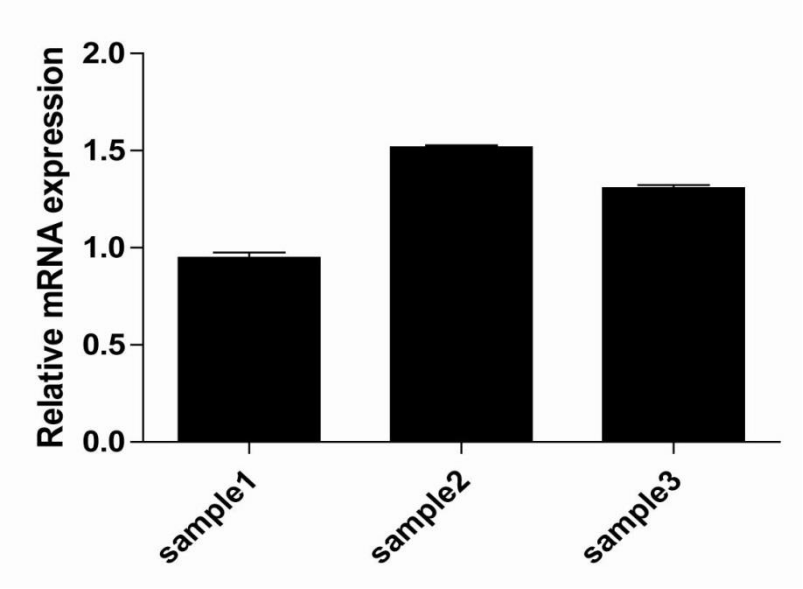






原始CT值

样本编号	基因	CT 值	ΔCT	ΔΔCT	$2^{-\Delta\Delta CT}$	平均值
sample1	pig-mir-125b	26.213	7.599	0	1	0.948836884
	pig-mir-125b	26.318	7.744	0.145	0.904379378	
	pig-mir-125b	26.242	7.685	0.086	0.942131274	
sample2	pig-mir-125b	25.414	7	-0.599	1.514666316	1.518234325
	pig-mir-125b	25.435	7.011	-0.588	1.503161478	
	pig-mir-125b	25.344	6.979	-0.62	1.536875181	
sample2	pig-mir-125b	25.371	7.244	-0.355	1.278985581	1.30725656
	pig-mir-125b	25.391	7.184	-0.415	1.333298677	
	pig-mir-125b	25.377	7.21	-0.389	1.309485423	
sample1	pig-U6	18.614				
	pig-U6	18.574				
	pig-U6	18.557				
sample2	pig-U6	18.414				
	pig-U6	18.424				
	pig-U6	18.365				
sample2	pig-U6	18.127				
	pig-U6	18.207				
	pig-U6	18.167				



服务周期：

服务内容	说明	价格	实验周期
RealtimePCR	相对定量-染料法	150 元/基因/样本	7 个工作日
	相对定量-探针法	180 元/基因/样本	7 个工作日
	绝对定量-染料法	200 元/基因/样本	7 个工作日
	绝对定量-探针法	200 元/基因/样本	7 个工作日
miRNA-RealtimePCR	提供试剂盒	260 元/基因/样本	10 个工作日

	不提供试剂盒	600 元/基因/样本	10 个工作日
探针合成		询价	

温馨提醒:

1. 细胞样本 10^6 以上，收集后-80 度保存；组织标本 100mg 标本；血清或血液 1mL 以上，干冰运输
2. 单基因 10 个样本以上
3. 试验周期不包括探针、标准品合成时间
4. 公司默认的抽提方式 TRIZOL，如果需要试剂盒抽提，则需要客户提供。