

组织样本染料法荧光定量检测小结(绝对定量)

A. 样本处理(原始图片见附件)

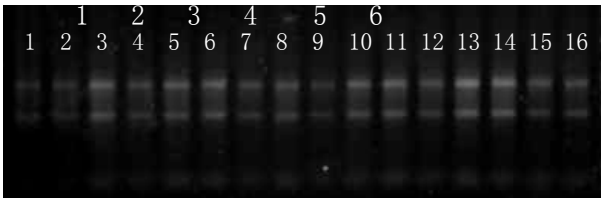
1. Trizol 法抽提 RNA(方法步骤按说明书进行)

样品质量检测

样本编号	ng/ul	A260	A280	A260/A280
1	448.6	11.215	5.301	2.12
2	639.86	15.996	11.736	1.36
3	287.48	7.187	3.438	2.09
4	397.29	9.932	4.693	2.12
5	326.69	8.167	4.109	1.99
6	387.86	9.697	4.581	2.12
7	323.17	8.079	3.816	2.12
8	390.11	9.753	4.634	2.1
9	628.02	15.7	7.521	2.09
10	330.52	8.263	3.914	2.11
11	442.82	11.07	5.21	2.12
12	396.94	9.923	4.671	2.12
13	259.32	6.483	3.133	2.07
14	360.46	9.012	4.723	1.91
15	227.63	5.691	2.704	2.1
16	357.04	8.926	4.191	2.13

2. RNA 电泳

电泳图(0.7% agarose, 400-500ng RNA)



3. 反转录

采用反转录试剂盒中步骤进行反应获得 cDNA。

B. 引物合成及调试(原始图片见附件)

说明:

1. PCR 扩增采用 PCR Mix.

每个基因先经过标准程序摸索条件, 优化反应条件, 保证单一条带, 然后再进行样品扩增检测, 对于难于优化的反应, 采用调整 Mg^{2+} 浓度的方法。

PCR 体系:

2X 热启动 PCR 核心试剂混合物

反应液配制:

反应体系: (总体积 30ul)

PCR Mix 2X 15ul
引物 F 0.5ul (10uM)
引物 R 0.5ul (10uM)
模板 1-5ul

余下体积用水补足到 30ul

PCR 反应条件: (标准程序, 各优化程序在此基础上进行调整)

预变性: 95°C 3min

循环体:

95°C 30s
55°C 30s
72°C 30s
72°C 15min

} 35-40 cycles

2. 电泳所用 Marker 为 100bp Marker, 条带大小由下到上依次为 100bp、200bp、300bp、400bp、500bp、600bp、700bp、800bp、900bp、1kb、1.5kb, 其中最亮的条带为 500bp。

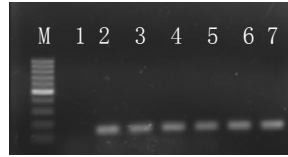
1. 18s

18s p5:-----

18s p3:-----

大小: 129bp

60°C 退火, 1.5% agarose 电泳结果:



M: 100bpMarker; 孔 1: 阴性对照; 孔 2-7: 501、601、701、801、904、1001。

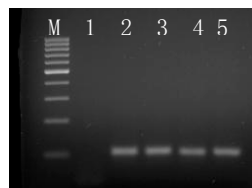
2. IL6

IL6 p5:-----

IL6 p3:-----

大小: 104bp

50/55°C退火, 2.5% agarose 电泳结果:



M: 100bpMarker; 孔 1: 阴性对照; 孔 2-3: 701-50, 55 度; 孔 4-5: 801-50, 55 度。

C. 标准品制备及调试(原始文件见附件)

1. 标准品制备

- 目的片段分别割胶回收并纯化, 采用胶回收 kit
- 取 10ul 纯化产物中加入到 90ul 标准品稀释液中, 振荡离心后, 标记为标准品 1
- 在 360ul 标准品稀释液中加入 40ul 标准品 1 (10 倍稀释), 振荡离心后, 标记为标准品 2
- 按上一步骤用标准品稀释液, 依次制备标准品 3-8。

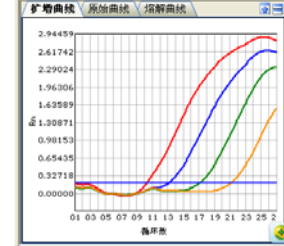
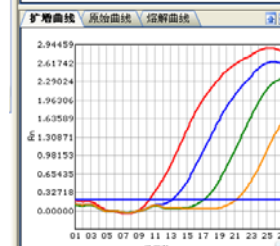
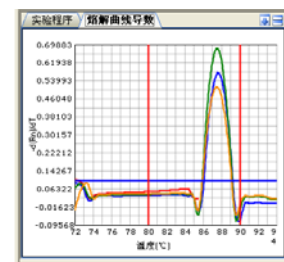
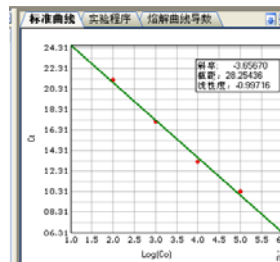
2. PCR 条件和体系

PCR 条件同上。

3. 18s

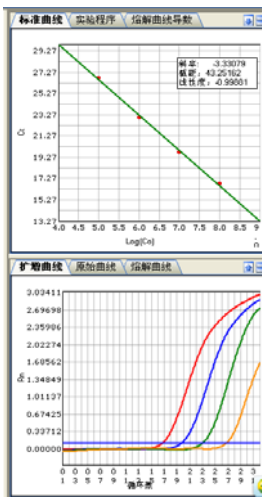
标准曲线

溶解曲线

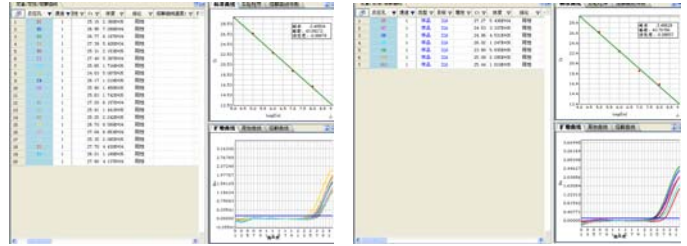
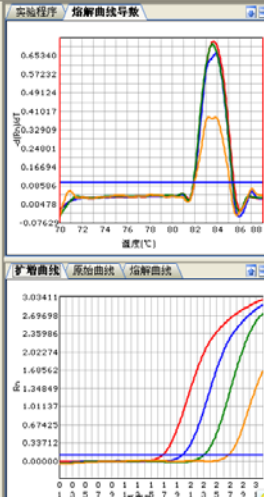


4. IL6

标准曲线



溶解曲线



2.6 结果汇总

2.6.1 原始数据

样本编号	18s	18s	IL6	IL6
1	2.69E+04	3.95E+04	8.36E+04	2.37E+05
2	2.18E+04	3.94E+04	2.79E+04	7.29E+04
3	2.44E+04	3.48E+04	4.36E+04	8.19E+04
4	2.00E+04	3.37E+04	2.83E+04	5.43E+04
5	8.01E+03	9.39E+03	1.12E+05	2.15E+05
6	1.89E+04	3.17E+04	4.32E+04	5.44E+04
7	2.16E+04	3.37E+04	4.08E+04	5.39E+04
8	2.46E+04	3.28E+04	4.53E+05	1.72E+05
9	1.76E+04	3.20E+04	5.84E+05	5.01E+05
10	1.53E+04	3.51E+04	2.30E+05	1.22E+05
11	1.58E+04	3.29E+04	2.46E+05	1.46E+05
12	1.71E+04	2.53E+04	7.88E+04	1.74E+05
13	2.05E+04	4.10E+04	1.05E+05	6.16E+04
14	1.95E+04	4.27E+04	1.82E+05	1.44E+05
15	1.61E+04	4.51E+04	1.39E+05	2.24E+05
16	9.01E+03	4.24E+04	4.54E+04	8.59E+04

2.6.2 平均值

样本编号	18s	IL6
1	3.32E+04	1.60E+05
2	3.06E+04	5.04E+04
3	2.96E+04	6.27E+04
4	2.69E+04	4.13E+04
5	8.70E+03	1.64E+05
6	2.53E+04	4.88E+04
7	2.77E+04	4.73E+04
8	2.87E+04	3.12E+05
9	2.48E+04	5.42E+05
10	2.52E+04	1.76E+05
11	2.43E+04	1.96E+05
12	2.12E+04	1.27E+05
13	3.07E+04	8.31E+04
14	3.11E+04	1.63E+05
15	3.06E+04	1.81E+05
16	2.57E+04	6.56E+04

2.6.3 检测结果(数据放大10倍后的结果)

样本编号	IL6/18s	BDNF/18s	GDNF/18s
1	48.26	0.37	0.04
2	16.49	0.28	3.53
3	21.20	0.25	0.07
4	15.36	0.34	0.26
5	188.28	0.61	2.39
6	19.25	0.19	0.08
7	17.12	0.29	0.11
8	108.72	0.22	0.10
9	218.50	0.34	0.10
10	69.61	0.22	0.06
11	80.61	0.24	0.03
12	59.68	0.29	0.15
13	27.03	0.37	0.15
14	52.50	0.18	0.35
15	59.32	0.20	0.40
16	25.55	0.13	0.07

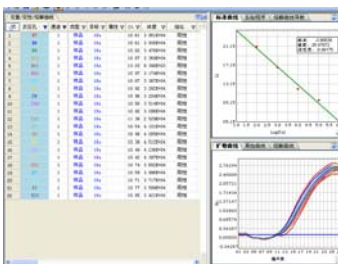
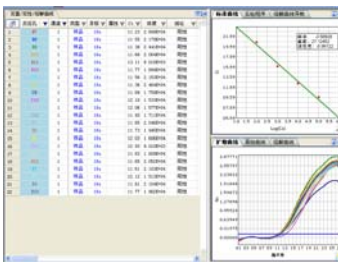
D 定量检测 (原始文件见附件)

1. PCR 体系和条件

PCR 条件和体系同标准品调试。

2. 实验结果

2.1 18s



2.2 IL6

