

## qPCR Array 在线数据分析系统使用说明

### 1. qPCR 数据分析原理

qPCR Array 在线数据分析系统采用  $\Delta\Delta Ct$  数据分析的方法, 可对不同测试样品间的各基因同时进行表达量差异分析及其简单的统计分析。

$\Delta\Delta Ct$  数据分析法是在进行基因表达量分析中最简单、最直接的分析方法, 属于相对定量数据分析范畴。在不同样品间进行基因表达量差异分析时, 由于存在着取样量、RNA 抽提效率、反转录效率等差异, 为此必须以一个表达量相对恒定的内参因子对这些差异进行校正。所以说进行表达量差异分析的第一步即为选择恒定表达的内参因子, 对于普通基因, 经常使用 GAPDH、ACTB、B2M 等持家基因, 而在 miRNA 表达量差异分析中, 一些恒定表达的 small RNAs 常作为内参因子, 例如 U6、SONRD44、SONRD48 等。

Real-Time PCR 是属于 PCR 的范畴, 必定符合 PCR 的扩增理论方程:  $N = N_0 \times (1+E)^{Ct}$  ( $N$ : 扩增产物数量;  $N_0$ : 起始模板数量;  $Ct$ : 循环数;  $E$ : 扩增效率)。当假定扩增效率  $E = 100\%$  时, 起始模板的量通过计算即为:  $N_0 = N \times 2^{-Ct}$ , 在比较不同样品间某基因的表达量差异时, 首先需在同一样品中, 先用内参因子对样品间差异进行均一化处理, 即在同一样品中, 求出检测基因与内参因子起始模板的相对含量比为  $N_{rel} = N_{01} / N_{02} = N \times 2^{-Ct1} / N \times 2^{-Ct2} = 2^{-(Ct1-Ct2)} = 2^{-\Delta Ct}$  ( $1$  为检测基因,  $2$  为内参因子), 其次再来比较不同样品间检测基因的相对表达量差异, 即  $N_{rel1} / N_{rel2} = 2^{-\Delta Ct1} / 2^{-\Delta Ct2} = 2^{-(\Delta Ct1-\Delta Ct2)} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$  ( $1$  为检测样品;  $2$  为对样品), 所得的比值即为检测基因在不同样品间的表达量差异。

### 2. qPCR 数据 (Ct 值或 Cp 值) 的获取

基线 (Baseline) 的设置一般都直接选择为仪器自动设置, 如研究人员认为需手动设置时, 其一般的设置原则为: 起始值设置为 2 或 3, 终止值的设置为整个 panel 中扩增最强基因的 Ct 值减去 2 或 3 所得的值即可, 如整个 panel 中扩增最强的基因其 Ct 值为 18, 则我们选择的基线终值可为 16 或 15。

阈值 (Threshold) 的设置, 一般情况下, 可选择仪器自动设置, 如需改动, 则在完成基线设置的基础上再设置, 其值的设置应为超过无规则噪音线的最高点, 并且把阈值线设置在 PCR 的指数扩增期。

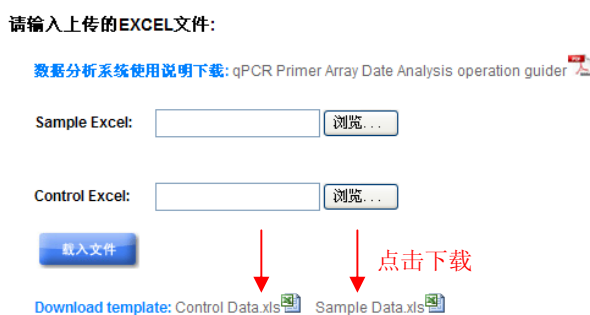
Ct 值或 Cp 值, 即为设置的阈值线和扩增曲线的交点对应的循环数, 可以通过仪器软件直接导出到 Excel 表中。

### 3. 利用软件进行表达量差异分析

a. 打开基于网页的软件程序: <http://www.fulengen.com/product/qpcr/analyse/index.php>, 显示为如下界面:



b. 下载用于上传分析数据的两份 Excel 表格模板(点击并保存 Sample Data.xls 和 Control Data.xls)



- ◆ 该软件单次可分析样品中所有基因的表达量差异, 其需要两份数据表单, 一份为测试样品的数据上传表 Sample Data.xls, 另一份为对照样品的数据上传表 Control Data.xls。
- ◆ 此两份模板表格是以 Human Wnt Signaling 96 qPCR Array (Cat No. HAQPA-102-01) 为蓝本制备, 如想体验此软件带来的快捷数据分析, 可以直接利用表中的数据按照操作流程进行处理。

c. 实验数据的处理和导入

打开下载的两份 Excel 表格, 使用时可对表格白色部分内容进行修改或删除, 为防止分析出错, 不建议对灰色部分进行修改或删除, 使用时可按照以下顺序进行数据输入。

- (1). 在第一行白色部分输入所使用产品的 Catalog Number。
- (2). 在第二行白色部分输入测试样品的名称。
- (3). 从 B4 何 C4 为开始按检测的基因顺序导入检测基因的 Accession Number 和 Symbol, 具体名称信息可参考所购产品的使用说明书附录部分。
- (4). 从 D 列开始导入 qPCR 测试文件中导出的 Ct 值, 注意 Accession Number 和导入的 Ct 值必须一一对应。

- (5). **注意!** 在 Sample Data.xls 和 Control Data.xls 两份表中, 其输入的产品 Catalog Number、Accession Number 和 Symbol 必须一一对应, 不然数据不能进行匹配分析; 同时必须注意各 Ct 值需导入到相应的表格中, 即测试样品的 Ct 值导入到 Sample Data.xls 表格中, 对照样品的 Ct 值导入到 Control Data.xls 表格中。

PCR Array Catalog#		HAQPA-102-01				
No.	Accession#	Symbol	Homo Placenta Assay Data(Sample)			
			Ct Value-1	Ct Value-2	Ct Value-3	
1	NM_000038	APC	32.30	32.74	32.31	
2	NM_001037954	DIXDC1	32.92	32.80	32.84	
3	NM_001429	EP300	25.99	25.61	25.72	
4	NM_001463	FRZB	24.36	24.17	24.18	
5	NM_001864	RHOA	22.85	22.63	22.77	
6	NM_001896	CSNK2A2	25.10	25.03	25.32	
7	NM_001904	CTNNB1	24.28	23.91	24.05	
8	NM_002093	GSK3B	27.80	27.90	27.89	
9	NM_002336	LRP6	27.64	27.04	27.21	

打开Sample Data.xls的内容

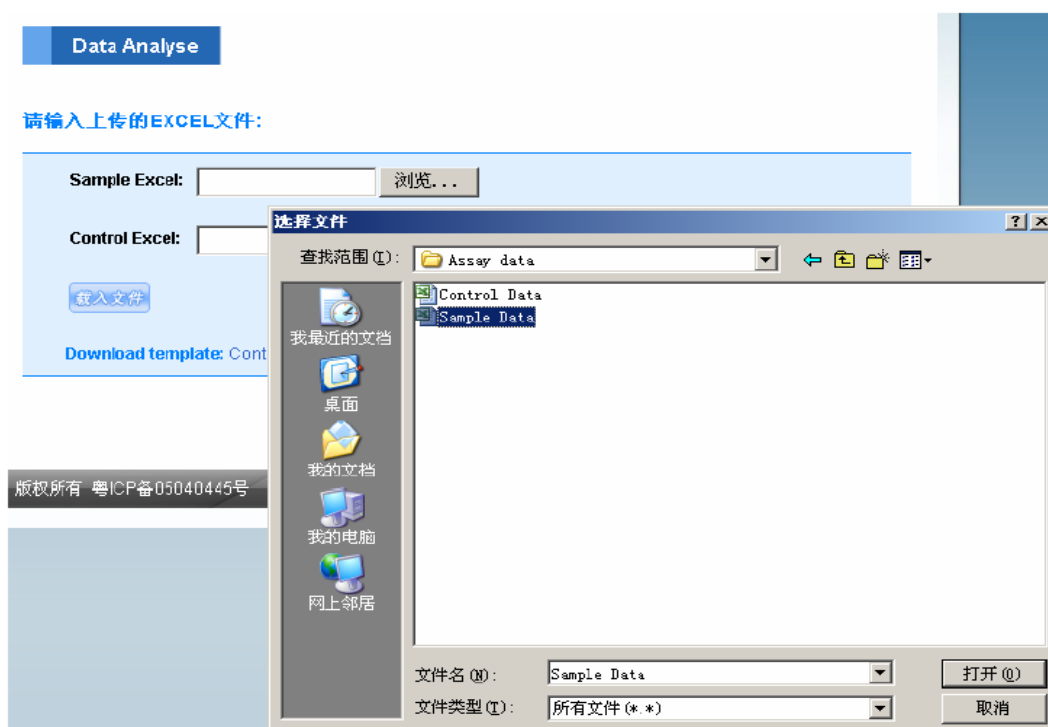
PCR Array Catalog#		HAQPA-102-01				
No.	Accession#	Symbol	Homo Placenta Assay Data(Control)			
			Ct Value-1	Ct Value-2	Ct Value-3	
1	NM_000038	APC	32.30	32.74	32.31	
2	NM_001037954	DIXDC1	32.92	32.80	32.84	
3	NM_001429	EP300	25.99	25.61	25.72	
4	NM_001463	FRZB	24.36	24.17	24.18	
5	NM_001864	RHOA	22.85	22.63	22.77	
6	NM_001896	CSNK2A2	25.10	25.03	25.32	
7	NM_001904	CTNNB1	24.28	23.91	24.05	
8	NM_002093	GSK3B	27.80	27.90	27.89	
9	NM_002336	LRP6	27.64	27.04	27.21	

打开Control Data.xls的内容

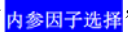
#### d. 实验数据表格的上传

点击“”导入已保存待分析的 Excel 数据库, 导入完成后点击“”, 即可进入分析界面。数据导入的界面如下所示。

**注意!** 测试样品的 Excel 数据表导入到“Sample Excel”栏中, 对照样品的 Excel 数据表导入到“Control Excel”表中。



#### e. 选择内参因子及提交分析

完成数据载入后, 即可进入如下内参因子选择页面, 根据实验的需要选择合适的基因作为内参 (一般都选择为测试样品中表达量恒定的基因作为内参)。点击“”列中的单选孔即可。

完成内参选择后，点击“[设置](#)”即可完成数据提交，如下图所示。

Data Analyse

提交的两份检测因子数据匹配！请选择内参因子

No.	Accession#	Symbol	内参因子选择	分析因子选择
1	NM_000038	APC	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
2	NM_001037954	DIXDC1	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
3	NM_001429	EP300	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
4	NM_001463	FRZB	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
88	NM_003502	AXIN1	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
89	NM_033120	NKD2	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
90	NM_001012614	CTBP1	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
91	NM_004421	DVL1	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
92	NM_001895	CSNK2A1	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
93	NM_002046	GAPDH	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>
94	NM_001101	ACTB	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>
95	NM_004048	B2M	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>
96	NM_012423	RPL13A	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>

Reference factor  
Click to update

设置

**注意！**内参因子可选择一个或多个，如选择多个内参，则在数据分析时是以所选多个内参 Ct 或 Cp 值的平均值来做为校正基数。

#### f. 数据分析结果显示

完成 e 步骤的“点击 [设置](#)”后，即显示如下所示界面，研究者可在此界面的“ $2^{-\Delta\Delta Ct}$  P\_Value”列中查看测试样品与对照样品分析结果，其各基因的表达量差异及差异显著性非分析结果，也可以点击左下角的“[下载](#)”按钮，保存分析所得的数据。

No.	Accession#	Symbol	Homo Placenta Assay Data(Sample)			Homo Liver Assay Data(Control)			Homo Placenta Assay Data(Sample) $\Delta Ct$			Homo Liver Assay Data(Control) $\Delta Ct$			Fold Change	T test			
			Ct Value-1	Ct Value-2	Ct Value-3	Ct Value-1	Ct Value-2	Ct Value-3	$\Delta Ct-1$	$\Delta Ct-2$	$\Delta Ct-3$	Ave $\Delta Ct$	$\Delta Ct-1$	$\Delta Ct-2$			$\Delta Ct-3$	Ave $\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$
1	NM_00003	APC	32.3026	32.7437	32.3129	33.9894	33.9464	33.7433	11.503	11.995	11.531	11.676	14.599	14.591	14.29	14.493	-2.817	7.046	0.0001187
2	NM_00103	DIXDC1	32.925	32.8024	32.8389	29.5358	29.7282	29.5889	12.125	12.054	12.057	12.079	10.145	10.372	10.136	10.218	1.861	0.275	2.10E-05
3	NM_00142	EP300	25.9943	25.6088	25.7176	25.7962	25.9133	25.8233	5.194	4.861	4.936	4.997	6.405	6.557	6.37	6.444	-1.447	2.727	0.000239
4	NM_00146	FRZB	24.3618	24.1736	24.1778	29.4482	29.4952	29.5123	3.562	3.425	3.396	3.461	10.057	10.139	10.059	10.085	-6.624	98.649	3.00E-08
5	NM_00166	RHOA	22.8497	22.6266	22.7707	21.9192	22.1095	22.0109	2.05	1.878	1.989	1.972	2.528	2.754	2.558	2.613	-0.541	1.559	0.0017828
6	NM_00189	CSNK2A	25.0981	25.0349	25.3215	25.0988	25.3772	25.172	4.298	4.287	4.54	4.375	5.708	6.021	5.719	5.816	-1.441	2.715	0.0003969
7	NM_00190	CTNIB1	24.2796	23.9112	24.0493	23.5267	23.614	23.3681	3.48	3.163	3.268	3.303	4.136	4.258	3.915	4.103	-0.8	1.741	0.0042668
8	NM_00209	GSK3B	27.8019	27.9039	27.888	26.9213	27.352	26.9574	7.002	7.156	7.106	7.088	7.531	7.996	7.504	7.677	-0.589	1.504	0.0238587
9	NM_00233	LRP6	27.6384	27.0367	27.2111	25.5266	25.8089	25.8117	6.838	6.288	6.43	6.519	6.136	6.453	6.359	6.316	0.203	0.869	0.345248
10	NM_00246	MYC	26.8867	26.9418	27.0945	28.0378	28.0948	28.198	6.087	6.194	6.313	6.198	8.647	8.739	8.745	8.71	-2.513	5.706	4.17E-06
11	NM_00301	SFRP1	27.4413	27.3211	27.6404	28.7343	28.4652	28.6388	6.641	6.573	6.859	6.691	9.344	9.109	9.186	9.213	-2.522	5.743	2.18E-05

- 以上界面显示的黄色部分内容为研究人员提交的数据，包括 Primer Array 产品 Catalog Number、检测基因 Accession Number、Symbol、测试样品和对照样品的编号和所提交的 Ct 值。为有效进行表达量差异分析，软

件在数据分析中，已对 Ct >36 或检测阴性基因的 Ct 值，统一定义为 Ct = 36，研究人员可以查看此显示界面中 Ct =36 的基因，对这些基因要稍加留意，其在所下载保存的结果分析表中已经标记为黄色。

- ◆ 显示界面中各个“ $\Delta Ct$ ”值为对应基因 Ct 值与内参基因 Ct 值间的差值，其意义为消除取样误差和样品处理的误差。
- ◆ 显示界面中“ $Ave \Delta Ct$ ”值表示同组实验样品测试的平均  $\Delta Ct$  值。
- ◆ 显示界面中“ $\Delta \Delta Ct$ ”值表示实验样品  $\Delta Ct$  与对照样品  $\Delta Ct$  间的差值。
- ◆ 显示界面“ $Fold Change$ ”值表示测试样品与对照样品比较后各基因的表达量差异倍数，其在下载保存的结果分析表中，对表达量上调的已标记为红色，表达量下调的已标记为鲜绿色。
- ◆ 显示界面中“ $P Value$ ”表示同组测试样品与对照样品比较后各基因表达量差异的显著性分析。其中，红色标记的差异显著，黑色标记的差异不显著。对于 T 检验，其仅分析测试样品和对照样品各有 3 次或 3 次以上重复测试的数据，对于是少于 3 次的重复数据不进行显著性分析。