












芯片定量验证引物设计概要

上海伯豪生物技术有限公司作为 Agilent 公司和 Affymetrix 公司在中国的首家认证技术服务商，为客户提供高品质的芯片检测和高质量的数据服务。当您拿到芯片结果数据时，为保证结果的可信度，对其进行验证是必不可少的，首当其冲的是利用 RT-qPCR 对同一样本进行定量验证。RT-qPCR 实验的影响因素众多，为确保您能够快速高效地完成芯片验证工作，我们总结出了 mRNA 芯片验证实验中需要注意的五个事项。

1. 选择信号值较高的探针

优先选择 Flag 为 P (若组间差异大，可选择一组为 P，另一组为 A)，信号值大于 7 (原始信号值 $2^7=128$) 的探针数据进行验证。上海伯豪生物技术有限公司为您提供信号值大于 7 的差异基因列表，您可以根据自己的需要进行验证基因的选择。

名称	修改日期	类型	大小
 g2_VS_g1.txt	2017/1/17 9:19	TXT 文件	21,605 KB
 g2_VS_g1_p001.txt	2017/1/17 9:19	TXT 文件	1,667 KB
 g2_VS_g1_p001.xls	2017/1/17 9:19	Microsoft Excel ...	1,667 KB
 g2_VS_g1_p001fc2.txt	2017/1/17 9:19	TXT 文件	138 KB
 g2_VS_g1_p001fc2.xls	2017/1/17 9:19	Microsoft Excel ...	138 KB
 g2_VS_g1_p005.txt	2017/1/17 9:19	TXT 文件	3,943 KB
 g2_VS_g1_p005.xls	2017/1/17 9:19	Microsoft Excel ...	3,943 KB
 g2_VS_g1_p005fc2.txt	2017/1/17 9:19	TXT 文件	157 KB
 g2_VS_g1_p005fc2.xls	2017/1/17 9:19	Microsoft Excel ...	157 KB
 g2_VS_g1_p005fc2mean7.txt	2017/1/17 9:19	TXT 文件	112 KB
 g2_VS_g1_p005fc2mean7.xls	2017/1/17 9:19	Microsoft Excel ...	112 KB

2. 靶序列的选择

mRNA 用 oligo d(T)进行反转录时，3' 端被优先反转录，5' 端反转录效率偏低，因此优先选择靶序列在基因 3' 端的探针。对于芯片上多个探针检测同一基因，且信号值均较高时，尽量选择靶序列在基因 3' 端的探针。

Agilent 芯片结果中提供了探针序列， 候选验证基因的序列通过 Accession 号在相应

的数据库中进行查找，并与探针序列进行 Blast 比对，确定探针序列在候选验证基因的位置信息。

BLAST® >> blastn suite

blastn blastp blastx tblastn tblastx

BLASTN program

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) ?

AGCAAAACAAAGTGCAATATTAATGTTTGCTTATAGATTATATTCTATGGCTGTTTGT

探针序列

Or, upload file 选择文件 未选择任何文件 ?

Job Title

Enter a descriptive title for your BLAST search ?

Align two or more sequences ?

Enter Subject Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) ?

NM_020801

基因 Accession 号

Affymetrix 芯片探针对应的基因靶序列信息可以在 Affymetrix 官网 (<http://www.affymetrix.com/estore/>) 上进行查找，如下图所示为人的 U133 Plus 2.0 芯片 227319_at 探针集对应的靶序列查找。

NetAffx™
NetAffx™ Analysis Center

Tailored Axiom™ Arrays
New myDesign™ Targeted Genotyping Arrays: 1,500 to 2.6M SNPs.
More >

Scientific Publications
Search our database of **32199** publications.

Home > Analysis Center

NetAffx™ Analysis Center

Get unprecedented access to array content.

The NetAffx™ Analysis Center enables researchers to correlate their GeneChip® array results with array design and annotation information.

- 3' IVT Expression**
- Exon/Gene
- Genotyping
- miRNA

- NetAffx Query** - Search probe sets for a term or identifier
- Batch Query** - Retrieve annotations for a probe list
- BLAST** - Find probe sets that BLAST align to your sequence(s) through BLAST
- Probe Match** - Find probes that identically match your sequence(s)
- UCSC Query** - Query the UCSC Browser including a custom track for your array of interest.

NetAffx™ Analysis Center

NetAffx

- Exon/Gene Expression
- 3' IVT Expression**
- NetAffx Query
- Batch Query
- BLAST
- Probe Match
- UCSC Query
- Custom
- Annotation Views

Genotyping
MiRNA

Expression Array
Comparison Tool

Manage Query Folders

Query History

Expression Queries

All Descriptions
(227319_at) (1)

Home > Analysis Center > NetAffx > **NetAffx Query**

NetAffx Query

Search on probe **探针集号** Affymetrix Gene Chip Catalog Arrays.

227319_at

Select a GeneChip Array:

(Use control-select to search up to three arrays simultaneously.)

- Human Genome U133 Plus 2.0 Array**
- Human Genome U219 Array
- Human Genome PrimeView Array
- Mouse Genome 430 2.0 Array
- Mouse Genome 430A 2.0 Array
- Human Genome U133 Set
- Human Genome U95 Set
- Mouse Expression Set 430
- Murine Genome U74v2 Set
- Rat Expression Array 230 2.0

Advanced Search


Submit

Show Results

- Refine Query
- Create a Custom View
- Export Results
- Show Orthologs

Current Query: All Descriptions (227319_at)
Array(s): HG-U133_Plus_2
Probe Sets returned:1

Resources for arrays selected in Current Query

 GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array

Displaying Results: 1-1 of 1.

* Annotation List * [Remove Checked](#) [Save Current List](#) [Expanded Mode +](#)

<input type="checkbox"/>	Probe Set ID	Array Name	Gene Title	Gene Symbol	go biological process term	go molecular function term	go cellular component term	Pathway
<input type="checkbox"/>	227319_at	HG-	kelch-like family	KLHL36	protein	ubiquitin-protein	Cul3-RING ubiquitin	

Sequence

Target Sequence

>HG-U133_PLUS_2:227319_AT

```
gtccttggtgccttagtaccagagttgaatgaatgtacacatttcggtagtggggg  
gcagagcggataacccttcctgtctgttctttgagaaaggacactccacctttca  
aaggtaactaaagccatcttacagattgcttgaatgaaggaaagagtcattgcttt  
ggattgattgaggttaaatacatcaaccactagcccccttcaaaatcagcgagatattg  
atgattaagtattcattgggtatgttctggctactgatgttactgaaatctgcaatcgt  
gtatgttttaattgttctttgtattgtaatttatgacatttcgaagttctgt  
gtcttaactcttttaattaatttctgcacgttc
```

[Cluster Members](#)

[Consensus/Exemplar](#)

[BLASTn GenBank NR](#)

3. qPCR 产物序列最好包含探针序列

mRNA 定量验证最好选择位于基因 3' 端的探针作为候选靶标，避免引物设计在 5' 端或中部出现的反转录效率低或差异剪接。引物设计在包含探针序列的 3' UTR 区，可保证扩增的高效性。

4. 对引物扩增效果进行验证

引物质量影响着定量检测的结果，如果引物的溶解曲线不好，说明有非特异性扩增，须重新设计引物。引物的扩增 Ct 值最好在 20-25 之间，如果 Ct 值过高，说明引物扩增效率不好或模板降解。

5. 定量实验与芯片实验用同一样本

定量验证所用的模板要与芯片实验是同一样本，如果是生物学重复或相似的样本，由于个体差异或制备动物模型条件不同等原因，验证结果可能与芯片结果不一致。

在对芯片结果进行 qPCR 验证过程中，严格遵循这五条注意事项，我们的验证工作就事半功倍了。