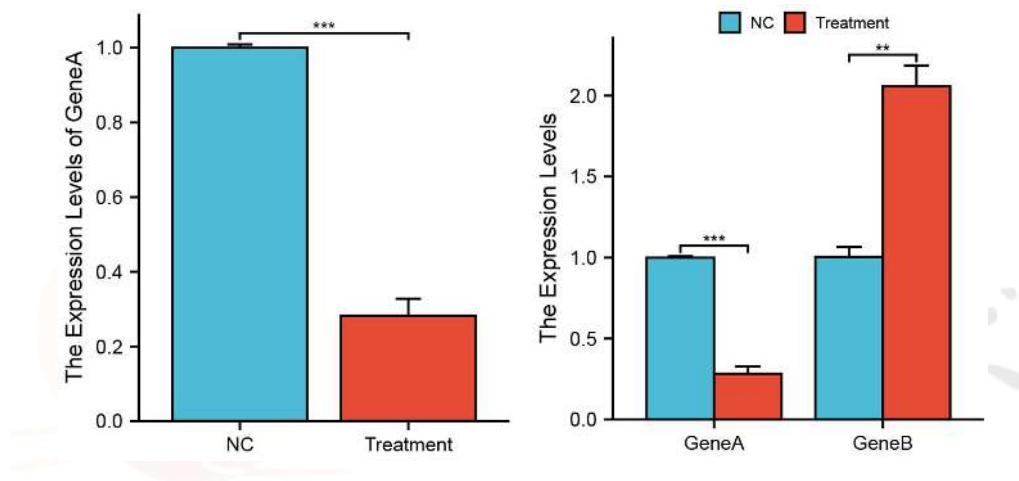


实验分析 - qPCR 分析



网址: <https://www.xiantao love>



更新时间: 2023.02.02

目录

基本概念	3
应用场景	7
主要结果/解读	8
数据格式/数据要求	9
参数说明	12
统计分析	12
间距设置	13
点	14
箱/柱	15
小提琴	16
误差线	17
标题文本	18
图注(Legend)	19
坐标轴	19
风格	21
图片	22
结果说明	23
主要结果	23
说明文本	24
方法学	26
如何引用	27
结果验证	27
常见问题	28

基本概念

➤ qPCR: 荧光定量 PCR, 在 DNA 扩增反应中, 通过加入荧光化学物质, 监测每次聚合酶链式反应循环后的总量, 通过内参法对目标分子进行表达定量的方法。

■ 一般在一次实验中, 会同时设置**对照组**和**实验组** (或者多个实验组), 每个组内分别检测内参分子和目标分子 (可多个目标分子), 每个组会设置多个样本 (生物学重复), 每个样本会设置多个复孔。上机完成后, 会得到每个复孔对应的 **Ct 值**。

■ 定量靶标分子的表达过程:

1. 计算每个样本每个基因对应的 Ct 均值 (每个组 每个样本 每个基因的复孔 Ct 均值)

2. (每个组 每个样本 靶标分子的 Ct 值) 减去 (同一个样本 内参分子的 Ct 值), 得到 每个组 每个样本 靶标分子的 ΔCt 值

3. 单独计算 (上一步) 对照组 所有样本中靶标分子的 ΔCt 算术均值

➤ 备注: 一般是计算算术均值 (求和然后求平均值) (工具计算的方法是用的这个), 但是也有文章推荐用 几何均数 (值相乘然后开平方) <https://toptipbio.com/qpcr-multiple-reference-genes>

4. (每个组 每个样本 靶标分子的 ΔCt 值) (第二步) 减去 (对照组 所有样本中靶标分子的 ΔCt 均值) (第三步), 得到 每个组 每个样本 靶标分子的 $\Delta\Delta Ct$ 值

5. 由第 4 步得到的 每个组 每个样本 靶标分子的 $\Delta\Delta Ct$ 值，经过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算，最终得到 靶标分子在每个组每个样本对应的相对表达量

上述这些步骤，均可以在分析后的 下载区找到 qPCR 整理.xlsx 文件中得到：



原始上传数据：

	A	B	C	D	E	F
1	分组	样本编号	复孔	Actin	GeneA	GeneB
2	NC	sample1	1	20.843369	20.402515	20.114036
3	NC	sample1	2	20.353529	20.533958	20.309642
4	NC	sample1	3	20.640206	20.929073	20.29992
5	NC	sample2	1	20.032797	20.019878	20.199124
6	NC	sample2	2	20.362166	20.822268	20.319346
7	NC	sample2	3	20.542366	20.217257	20.025703
8	NC	sample3	1	20.817405	20.164662	20.410097
9	NC	sample3	2	20.049079	20.751281	20.200269
10	NC	sample3	3	20.235488	20.173205	20.210378
11	Treatment	sample1	1	20.13009	22.37976	19.178161
12	Treatment	sample1	2	20.973557	22.536705	19.432849
13	Treatment	sample1	3	20.835609	22.11375	19.232988
14	Treatment	sample2	1	20.057557	22.626794	19.211414
15	Treatment	sample2	2	20.518127	22.956894	19.159921
16	Treatment	sample2	3	20.37446	22.556368	19.400276
17	Treatment	sample3	1	20.726418	22.171757	19.391893
18	Treatment	sample3	2	20.638525	22.174746	19.385115
19	Treatment	sample3	3	20.476703	22.187622	19.224623

每个组 每个样本 各个分子对应的 Ct（复孔）均值（**第一步**）

	A	B	C	D	E
1	group	sample	Actin	GeneA	GeneB
2	NC	sample1	20.612368	20.621849	20.2412
3	NC	sample2	20.312443	20.353134	20.181391
4	NC	sample3	20.367324	20.363049	20.273582
5	Treatment	sample1	20.646419	22.343405	19.281333
6	Treatment	sample2	20.316714	22.713352	19.257204
7	Treatment	sample3	20.613882	22.178042	19.333877
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					

每个组 每个样本 各个靶标分子的 ΔCt 值 (第二步)

(每个组 每个样本 靶标分子的 Ct 值) 减去 (同一个样本 内参分子的 Ct 值)

	A	B	C	D	E
1	group	sample	GeneA	GeneB	
2	NC	sample1	0.0094812	-0.371168	
3	NC	sample2	0.0406911	-0.131052	
4	NC	sample3	-0.004275	-0.093742	
5	Treatment	sample1	1.6969864	-1.365086	
6	Treatment	sample2	2.3966378	-1.059511	
7	Treatment	sample3	1.5641595	-1.280005	
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					

各组样本分子 ΔCt
对照组分子 ΔCt 均值 ...

对照组 所有样本中各个靶标分子的 ΔCt 算术均值 (第三步)

	A	B	C	D	
1	group	GeneA	GeneB		
2	NC	0.0152992	-0.198654		
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					

对照组分子 ΔCt 均值
组样本分子 ΔCt

每个组 每个样本 各个靶标分子的 $\Delta\Delta Ct$ 值（第四步）：

（每个组 每个样本 靶标分子的 ΔCt 值）（第二步） 减去 （对照组 所有样本中靶标分子的 ΔCt 均值）（第三步） 注意：因为这一步是计算相对值（要减去对照组的均值情况），对照组的均值会校正成均值为 1。对照组默认是是上传数据第 1 列中第 1 个出现的分组。

	A	B	C	D
1	group	sample	GeneA	GeneB
2	NC	sample1	-0.005818	-0.172514
3	NC	sample2	0.0253919	0.067602
4	NC	sample3	-0.019574	0.1049118
5	Treatment	sample1	1.6816872	-1.166432
6	Treatment	sample2	2.3813387	-0.860857
7	Treatment	sample3	1.5488604	-1.081351
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				

K < > >I 各组样本分子 $\Delta\Delta Ct$ 样本分子 $2^{\Delta\Delta Ct}$

各个靶标分子 在每个组每个样本对应的相对表达量 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) （第五步）：

	A	B	C	D
1	group	sample	GeneA	GeneB
2	NC	sample1	1.0040409	1.1270205
3	NC	sample2	0.9825537	0.9542228
4	NC	sample3	1.01366	0.9298618
5	Treatment	sample1	0.3117179	2.2445589
6	Treatment	sample2	0.1919312	1.8161162
7	Treatment	sample3	0.3417799	2.1160163
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				

K < > >I 各组样本分子 $2^{\Delta\Delta Ct}$...

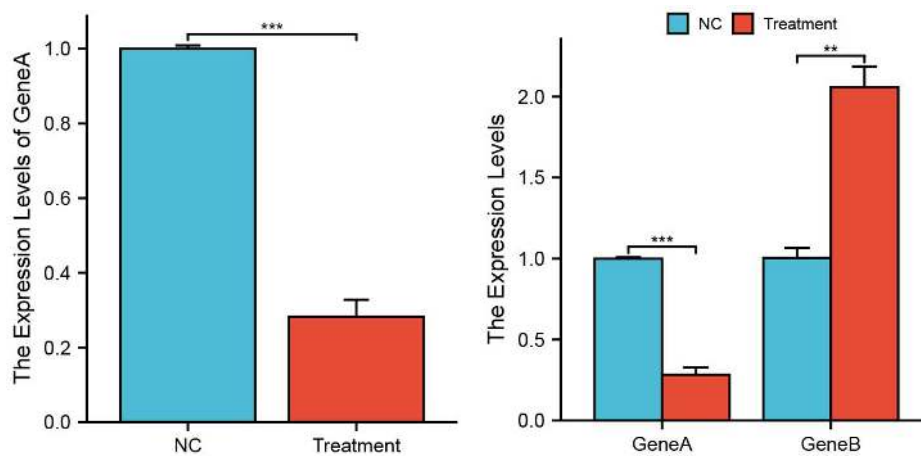
应用场景

- qPCR 上机后得到 Ct 值，对分子进行定量分析

（如果是已经计算好每个组每个样本靶标分子的相对表达量，可直接到基础绘图的分组比较图模块 或者 豆荚图模块 进行可视化）



主要结果/解读



- 每个柱子代表一个分组
- 左图为单个分子在对照组和实验组中的相对表达均值情况 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
 - 可以看到 GeneA 分子在实验组中相对低表达, 差异具有统计学意义 ($p < 0.001$)
- 右图为两个分子分别在对照组和实验组中的相对表达均值情况 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
 - 可以看到 GeneA 分子在实验组中相对低表达, 差异具有统计学意义 ($p < 0.001$) ; GeneB 分子在实验组中相对高表达, 差异具有统计学意义 ($p < 0.01$)

还有多种可视化类型 (同分组比较图)



下载区中的 **qPCR 整理表** 的结果解读, 可以见“基本概念”部分的内容。

数据格式/数据要求

	A	B	C	D	E	F
1	分组	样本编号	复孔	Actin	GeneA	GeneB
2	NC	sample1	1	20.84336858	20.4025154	20.1140361
3	NC	sample1	2	20.35352879	20.533958	20.3096425
4	NC	sample1	3	20.64020556	20.929073	20.2999204
5	NC	sample2	1	20.03279669	20.0198775	20.1991238
6	NC	sample2	2	20.36216626	20.8222681	20.3193459
7	NC	sample2	3	20.54236647	20.217257	20.025703
8	NC	sample3	1	20.81740464	20.1646616	20.4100972
9	NC	sample3	2	20.04907874	20.7512815	20.2002694
10	NC	sample3	3	20.23548838	20.1732046	20.210378
11	Treatment	sample1	1	20.13009021	22.3797603	19.1781608
12	Treatment	sample1	2	20.97355723	22.5367053	19.4328488
13	Treatment	sample1	3	20.83560876	22.1137497	19.2329882

宽型数据类型（推荐）

一共至少需要提供 5 列数据：

- 第 1 列（命名为“分组”或者“group”）：这一列定义分组信息，每个分组有多少个样本就会对应有多少行（如果每个样本还有复孔重复，则为每组样本数 × 复孔重复数），至少需要提供两组（对照组和实验组），其中对照组需要放前面（第 2 行），实验组放后面（如果顺序错误，则有可能对照组会识别错误）。
- 第 2 列（命名为“样本编号”或者“sample”）：这一列定义样本编号，样本编号不需要在对照组和实验组中都一样（对照组和实验组的样本编号一样说明是配对样本，该模块不会用配对的属性）
 - 如果每组样本（样本编号不满足 3 个以上）不满足 3 个以上的重复，则结果中不会进行统计推断的内容，没有统计学检验部分的内容。只有满足 3 个以上的样本，才会有统计检验的内容。

- 第3列（命名为“复孔”或者“well”）：这一列定义复孔编号，代表同一个样本对分子进行了多个复孔的检测，可提供每个复孔对应的 Ct 值，也可以手动计算复孔均值后，只提供复孔的均值，此处可以填入任意的编号
- 第4列以及后面的列（命名为对应的分子名）：这几列依次填入内参分子、靶标分子的 Ct 值，注意，**内参分子要放在第4列，后面再放靶标分子**，否则有可能会识别内参分子错误！

	A	B	C	D	E
1	分组	样本编号	复孔	gene	ct
2	NC	sample1	1	Actin	20.843369
3	NC	sample1	2	Actin	20.353529
4	NC	sample1	3	Actin	20.640206
5	NC	sample2	1	Actin	20.032797
6	NC	sample2	2	Actin	20.362166
7	NC	sample2	3	Actin	20.542366
8	NC	sample3	1	Actin	20.817405
9	NC	sample3	2	Actin	20.049079
10	NC	sample3	3	Actin	20.235488
11	Treatment	sample1	1	Actin	20.13009
12	Treatment	sample1	2	Actin	20.973557
13	Treatment	sample1	3	Actin	20.835609
14	Treatment	sample2	1	Actin	20.057557
15	Treatment	sample2	2	Actin	20.518127
16	Treatment	sample2	3	Actin	20.37446
17	Treatment	sample3	1	Actin	20.726418
18	Treatment	sample3	2	Actin	20.638525
19	Treatment	sample3	3	Actin	20.476703
20	NC	sample1	1	GeneA	20.402515
21	NC	sample1	2	GeneA	20.533958
22	NC	sample1	3	GeneA	20.929073
23	NC	sample2	1	GeneA	20.019878
24	NC	sample2	2	GeneA	20.822268
25	NC	sample2	3	GeneA	20.217257
26	NC	sample3	1	GeneA	20.164662
27	NC	sample3	2	GeneA	20.751281
28	NC	sample3	3	GeneA	20.173205

长型数据类型（不推荐，有可能样本编号对应不上导致计算错误）

一共至少需要提供 5 列数据：

- 第1列（命名为“分组”或者“group”）：这一列**定义分组信息**，每个分组有多少个样本就会对应有多少行（如果每个样本还有复孔重复，则为每组样本数×复孔重复数），至少需要提供两组（对照组和实验组），其中**对照组需要**

放前面（第 2 行），实验组放后面（如果顺序错误，则有可能对照组会识别错误）。

- 第 2 列（命名为“样本编号”或者“sample”）：这一列定义样本编号，样本编号不需要在对照组和实验组中都一样（对照组和实验组的样本编号一样说明是配对样本，该模块不会用配对的属性）
- 第 3 列（命名为“复孔”或者“well”）：这一列定义复孔编号，代表同一个样本对分子进行了多个复孔的检测，可提供每个复孔对应的 Ct 值，也可以手动计算复孔均值后，只提供复孔的均值，此处可以填入任意的编号
- 第 4 列（分子名）：这几列依次填入内参分子、靶标分子名字，注意，内参分子要放在前面，后面再放靶标分子，否则有可能会识别内参分子错误！
- 第 5 列（Ct 值）：每个组 每个样本 每个复孔 每个分子 对应的 Ct 值

参数说明

(说明：标注了颜色的为常用参数。)

统计分析

- **统计方法**：统计方法默认为 auto（自动选择），当上传数据验证成功并点击确认后，会自动替换成适合于上传数据的统计方法，之后可以自行选择和修改别的统计方法。统计方法的选择依据可以参考“基本概念”中统计方法的说明。
- **分组比较**：统计学差异标注的分组，默认为 all（全部都标注）。当上传数据验证成功并点击确认后，会自动替换成对应上传数据的分组。之后可以自行选择想要保留和去掉的比较。（如果分组不满足>3 个观测以及标准差>0 的情况，则可能不会出现在此处。）允许都去掉不标注分组比较的内容。
- **显著性显示的类型**：可选择星号或者 p 值以及其他，影响分组比较中显著性标注，默认为星号。可以根据需要进行修改。



- **显著性大小**：可以修改显著性标注的大小

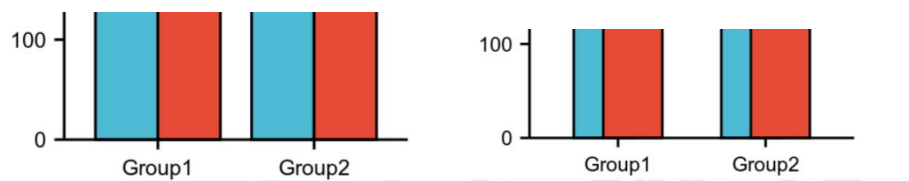
间距设置

间距设置

(二维)组内总宽度

0.8

- 组内总宽度：只有在二维分组比较的时候才会有作用，用于控制整个组的大小，影响大组和大组的间距



点

点

▼

展示

☐

填充色

▼

▼

▼

▼

▼

▼

▼

▼

描边色

▼

▼

▼

▼

▼

▼

▼

▼

样式

圆形 ×

▼

大小

不透明度

分布宽度

- 显示：可选择是否展示。
- 填充色：点的填充色颜色选项，有多少个分组会提取多少个颜色，最多支持修改 8 个颜色。受配色方案全局性修改
- 描边色：点的描边色颜色选项，有多少个分组会提取多少个颜色，最多支持修改 8 个颜色。受配色方案全局性修改。
- 样式：点的样式类型，可选择 圆形、正方形、菱形、三角形、倒三角。可以多选，多选后不同的分组中点的类型也会有不同。
- 大小：点的大小。
- 透明度：点的透明度。0 为完全透明，1 为完全不透明。
- 分布宽度：图中的点会在一个水平线上随机分布，此处影响点能随机水平移动的范围。

箱/柱

箱/柱

展示

类型

柱状图

填充色

描边颜色

描边粗细

0.75pt

不透明度

1

箱/柱宽度

0.8

- 显示：可选是否展示。
- 类型：可选择柱状图 或者 箱式图
- **填充色**：箱/柱的填充色颜色选项，有多少个分组会提取多少个颜色，最多支持修改 8 个颜色。受配色方案全局性修改
- **描边色**：箱/柱的描边色颜色选项，有多少个分组会提取多少个颜色，最多支持修改 8 个颜色。受配色方案全局性修改。
- 描边粗细：箱/柱描边的粗细，默认为 0.75pt
- 透明度：箱/柱的透明度。0 为完全透明，1 为完全不透明。
- 宽度：箱/柱的宽度。

小提琴

小提琴

展示

填充色

描边颜色

描边粗细 0.75pt

不透明度 0.5

宽度 0.8

宽度校正 1

- 显示：可选是否展示。影响图中可视化的类型。
- 填充色：小提琴的填充色颜色选项，有多少个分组会提取多少个颜色，最多支持修改 8 个颜色。受配色方案全局性修改
- 描边色：小提琴的描边色颜色选项，有多少个分组会提取多少个颜色，最多支持修改 8 个颜色。受配色方案全局性修改。
- 描边粗细：小提琴描边的粗细，默认为 0.75pt
- 透明度：小提琴的透明度。0 为完全透明，1 为完全不透明。
- 宽度：小提琴的宽度。
- 宽度校正：用于提高小提琴中较窄位置的宽度和整体宽度

误差线

误差线

展示

上

均值±标准误

描边粗细

0.75pt

宽度

0.2

误差线只有在**在没有箱式图时才会显示**（箱式图本身自带类似误差线）。

- 展示：可选是否展示。
- 样式：可选上、上下。
- 类型：可选均值±标准差、均值±标准误、中位数~上下四分位，建议选择均值±标准差。
- 颜色：误差线颜色，默认为纯黑，不受配色方案全局性影响。
- 粗细：误差线粗细，默认为 0.75pt
- 宽度：误差线的宽度。

标题文本

标题	
大标题	大标题内容
x轴标题	x轴标题内容
y轴标题	y轴标题内容

- 大标题：大标题文本
- x 轴标题：x 轴标题文本
- y 轴标题：y 轴标题文本
- 补充：在要换行的中间插入\n。如果需要上标，可以用两个英文输入法下的大括号括住，比如 $\{2\}$ ；如果需要下标，可以用两个英文输入法下的中括号括住，比如 $[2]$

图注(Legend)

图注

是否展示
☒

图注标题
图注标题内容

图注位置
默认

- 展示：是否展示图注
- 图注位置：可选右、上，默认为右。
- 图注标题：可以添加图注标题

坐标轴

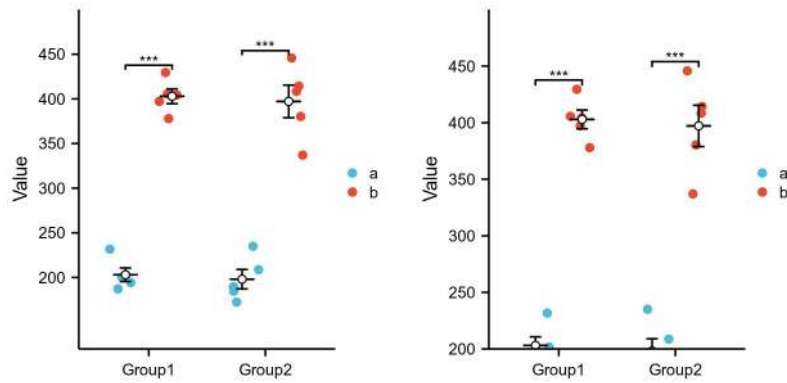
坐标轴

x轴分组名
, +空格隔开

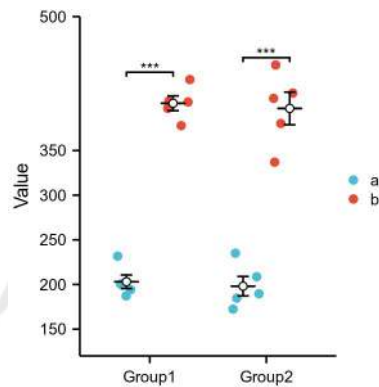
x轴标注旋
转
0

y轴范围+刻度
()包裹,内容用','+

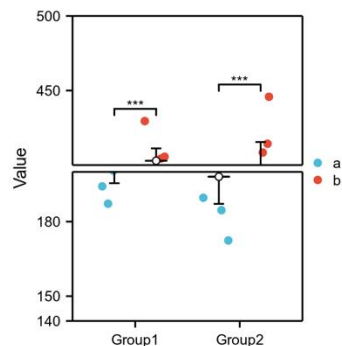
- X 轴分组名：支持直接修改 x 轴各个分组的名字，每个名字之间需要用英文输入法的逗号隔开，比如 group1, group2。这里支持换行，需要换行的位置可以插入\n
- X 轴标注旋转：支持对 x 轴文字进行旋转。适合于 x 轴文字过长的時候
- Y 轴范围+刻度：（注意：范围的修改如果超过原本值范围的 30%会失效）
 - 如果只是想要修改范围，可以只输入两个范围值，比如 120, 500



- 如果同时想要修改范围+刻度，可以输入比如：120, 150, 200, 250, 300, 350, 500, 500 。注意，此时最大和最小值会被当做范围值，不会作为刻度，如果需要刻度，需要类似于 500 那样同时写两次



- 如果需要进行截断的功能，需要用小括号分别括住对应的两个坐标（最多支持同时分割成 2 个），具体写法类似：(140, 140, 150, 180, 200)(400, 450, 500, 450, 500)



风格



- 外框：是否添加外框
- 网格：是否添加网格
- 是否颠倒 XY 轴：可以颠倒 xy 轴
- 文字大小：针对图中所有文字整体的大小控制

图片

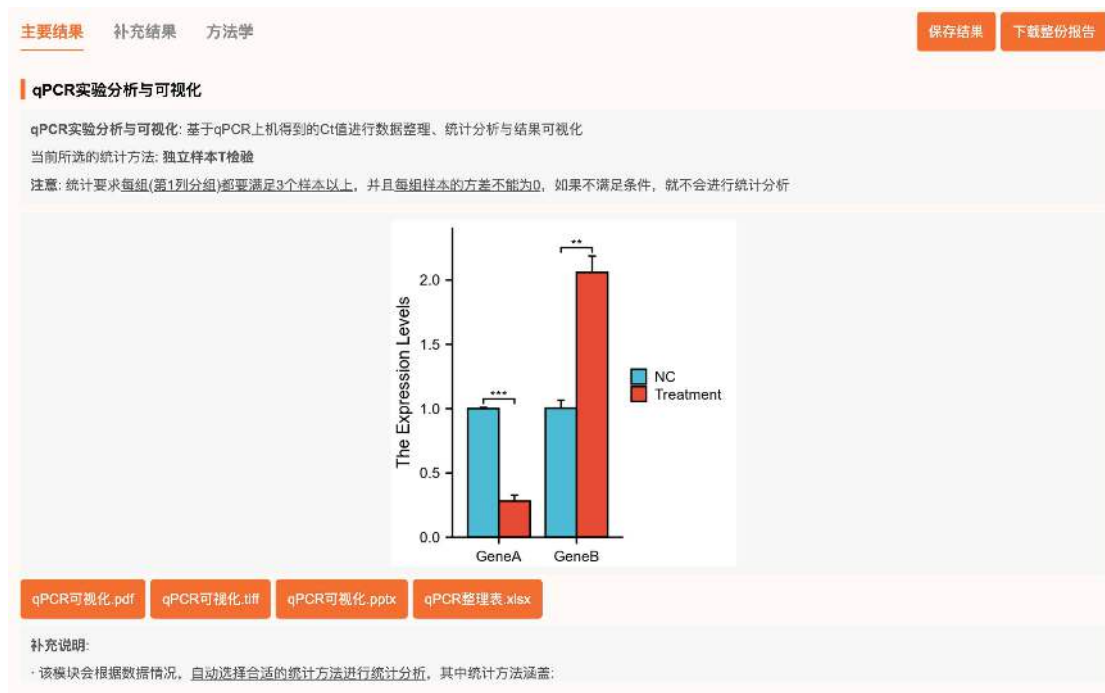
图片	▼
宽度 (cm)	5
高度 (cm)	5
字体	Arial ▼

- 宽度：图片横向长度，单位为 cm
- 高度：图片纵向长度，单位为 cm
- 字体：可以选择图片中文字的字体



结果说明

主要结果



- 如果数据可以进行统计分析, 将会进行统计分析。统计分析默认是根据数据情况选择合适的统计方法, 涵盖:
 - 两组: T test(满足正态+方差齐) | Welch t' test(满足正态+不满足方差齐性) | Wilcoxon rank sum test(不满足正态, 非参数检验)
 - 多组整体: One-way ANOVA(满足正态+方差齐) | Welch one-way ANOVA(满足正态+不满足方差齐性) | Kruskal-Wallis test(不满足正态, 非参数检验)
- 同如果数据可以进行统计分析, 将会进行统计分析。统计分析默认是根据数据情况选择合适的统计方法, 涵盖:
 - 两组: T test(满足正态+方差齐) | Welch t' test(满足正态+不满足方差齐性) | Wilcoxon rank sum test(不满足正态, 非参数检验)

- 多组整体: One-way ANOVA(满足正态+方差齐) | Welch one-way ANOVA(满足正态+不满足方差齐性) | Kruskal-Wallis test(不满足正态, 非参数检验)

说明文本

统计描述

各个组常见「统计描述指标」

组别1	组别2	数目	最小值	最大值	中位数(Median)	四分位距(IQR)	下四分位	上四分位	均值(Mean)	标准差(SD)
GeneA	NC	3	0.98255	1.0137	1.004	0.015553	0.9933	1.0089	1.0001	0.015926
GeneA	Treatment	3	0.19193	0.34178	0.31172	0.074924	0.25162	0.32675	0.28181	0.079275
GeneB	NC	3	0.92986	1.127	0.95422	0.098579	0.94204	1.0406	1.0037	0.10749
GeneB	Treatment	3	1.8161	2.2446	2.116	0.21422	1.9661	2.1803	2.0589	0.21986

统计描述.xlsx

此表格提供统计描述的结果，可以自行提取所需要的。

异常值分析

离群值 = $Q1(\text{下四分位}) - 1.5 \times IQR(\text{四分位间距})$ 或者 $Q3(\text{上四分位}) + 1.5 \times IQR(\text{四分位间距})$

异常值 = $Q1(\text{下四分位}) - 3.0 \times IQR(\text{四分位间距})$ 或者 $Q3(\text{上四分位}) + 3.0 \times IQR(\text{四分位间距})$

组别1	组别2	离群值	异常值
各组不存在 离群值和异常值			

此表格异常值情况表，可以判断数据是否存在异常值。

正态性检验

检验方法: Shapiro-Wilk normality test

组别1	组别2	自由度(df)	统计量	p值
GeneA	NC	3	0.95372	0.5859
GeneA	Treatment	3	0.89325	0.3643
GeneB	NC	3	0.84108	0.2169
GeneB	Treatment	3	0.94938	0.5866

正态性检验结果显示，观测变量在各组内接近正态分布($P > 0.05$)，建议选择用 参数检验的方法

此表格为正态性检验的结果

方差齐性检验

检验方法: Levene's test
· Base on Mean

组别	自由度1(df1)	自由度2(df2)	统计量	p值
GeneA	1	4	7.3628	0.0533
GeneB	1	4	1.8194	0.2487

方差齐性检验显示, 各组观测变量的方差相等($P > 0.05$)

此表格为方差齐性检验的表格

独立样本T检验

应用条件: 两组独立数据, 满足正态性检验和方差齐性检验

组别	组别I	组别J	自由度(df)	统计量t	差值(J-I)	置信区间(95%CI)	p值
GeneA	NC	Treatment	4	-15.386	-0.71828	-0.84789 - -0.58866	0.0001
GeneB	NC	Treatment	4	7.4681	1.0552	0.6629 - 1.4475	0.0017

p值满足<0.05时, 可认为两组存在统计学上差异

此表格为独立样本 t 检验的结果

(不同的分组数量、不同的分子数 对应的统计部分的说明文本都有可能不同, 多组统计学比较还会有两两多重比较的结果。)

方法学

统计分析和可视化均在 R 4.2.1 中进行，具体可根据返回的方法学中的内容进行查看。

涉及的 R 包：ggplot2 进行可视化。



如何引用

生信工具分析和可视化用的是 R 语言，可以直接写自己用 R 来进行分析和可视化即可，可以无需引用仙桃，如果想要引用仙桃，可以在致谢部分 (Acknowledge) 致谢仙桃学术 (www.xiantao love)。

方法学部分可以参考对应说明文本中的内容以及一些文献中的描述。

结果验证

具体可以查看 分组比较图模块教程文档 中结果验证的内容

常见问题

1. 工具计算的结果和自己手动计算的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 结果不同?

答:

请先下载“qPCR 整理表.xlsx”，按照本文档“基本概念”部分提供的计算过程 逐步核对 自己计算的过程 和 qPCR 整理表 中 各个步骤对应的值。

如果自己的计算过程不同于“基本概念”中的计算过程，（或者因为粗心纳入数据错误导致的计算有问题），则有可能出现结果不同的情况。

另外还要注意第 1 列分组的顺序（参考组需要放在前面），以及分子的顺序（内参基因需要放前面）

2. 如何修改 y 轴或者 x 轴标题?

答:

可以在右边找到“标题文本”参数进行输入，如果想要换行，可以中间加入\n



标题	
大标题	大标题内容
x轴标题	x轴标题内容
y轴标题	y轴标题内容

3. 为什么没有统计检验的结果?

答:

当上传的数据各组的样本数不满足 3 个以上，或者存在各组样本对应的 Ct 值方差为 0，则工具不会进行统计检验部分的内容。

4. 能否各组只提供 1 例样本（样本不足，不能一次性提供 3 个以上的样本）？

答：

每组可以只提供 1 列样本或者不足 3 例样本，但是如果提供的样本数不足 3 个，则不会进行统计检验部分的内容。

5. 部分样本没有进行 3 次复孔的检测，是否可以计算？

答：

复孔只会用在第一步计算复孔的均值的时候会用到，一般 qPCR 是会做多个复孔的，如果提供少于 3 次复孔的数据，工具也是会先计算复孔的均值，然后再往下计算的，最终也是可以拿到分析的结果。