

反转录-两步法

实验准备

1、RNA 样本；2、移液器及配套枪头（RNase-free）；3、1.5 ml 离心管（RNase-free），200 μ l PCR 管（RNase-free）；4、涡旋振荡器，台式离心机，金属浴/PCR 仪

Step 1 将模板 RNA 在冰上解冻；FastKing RT Enzyme Mix 置于冰上，其它组分置于室温解冻，解冻后迅速置于冰上。使用前将每种溶液涡旋振荡混匀，简短离心以收集残留在管壁的液体。

Step 2 按照表 1 的基因组 DNA（gDNA）的去除体系在冰浴条件下配制反应液配制去除混合液，彻底混匀。简短离心，并置于 42℃，孵育 3 min。然后置于冰上放置。

表 1 gDNA 去除反应体系

组成成分	使用量
5×gDNA Buffer	2 μ l
Total RNA	50ng-2ug
RNase-Free ddH2O	补足到 10 μ l

Step 3 按照表 2 的反转录反应体系在冰浴条件下配制反应液配制反转录混合液。

表 2 反转录反应体系

试剂	使用量
10×King RT Buffer	2 μ l
FastKing RT Enzyme Mix	1 μ l
FQ-RT Primer Mix	2 μ l
RNase-Free ddH2O	5 μ l
总体积	10 μ l

Tips

- 1.按照表 2 的反转录反应体系配制反转录混合液时，应首先确定所需的反应数量，然后在反应数量的基础上增加 10%-20%，计算体系配制数量。
- 2.按配制数量计算每个组分所需的用量，在冰上将所有组分共同配制到同一管中，彻底混匀，短暂离心。

试剂	1 个体系	6 个体系	11 个体系	22 个体系
10×King RT Buffer	2 μ l	12 μ l	22 μ l	44 μ l
FastKing RT Enzyme Mix	1 μ l	6 μ l	11 μ l	22 μ l
FQ-RT Primer Mix	2 μ l	12 μ l	22 μ l	44 μ l
RNase-Free ddH2O	5 μ l	30 μ l	55 μ l	110 μ l
总体积	10 μ l	60 μ l	110 μ l	220 μ l

Step 4 在每一个 gDNA 去除混合液（10 μ l）中，加入 10 μ l 反转录混合液，加入后充分混匀，形成 20 μ l 的反应体系。

Step 5 42℃，孵育 15 min。

Step 6 95℃，孵育 3 min 之后放于冰上。完成实验。

得到的 cDNA 可用于后续实验，或低温保存。保存前应分装，避免反复冻融。cDNA 不建议检测浓度。

sample	con	20ug	500ng/ul	补水	使用体积
ssi1	2013.40	9.93	40ul	30.07	4ul
si2	1613.10	12.40	40ul	27.60	4ul
si3	2097.30	9.54	40ul	30.46	4ul
nc	1222.00	16.37	40ul	23.63	4ul
gapdh	1965.30	10.18	40ul	29.82	4ul
ctrl	1888.90	10.59	40ul	29.41	4ul