**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 μl 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 | 2μl |
| Total RNA | 50ng-2ug |
| RNase-Free ddH2O | 补足到10μl |

**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 μl |
| FastKing RT Enzyme Mix | 1 μl |
| FQ-RT Primer Mix | 2 μl |
| RNase-Free ddH2O | 5 μl |
| 总体积 | 10 μl |

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 | 2μl | 12μl | 22μl | 44μl |
| FastKing RT Enzyme Mix | 1μl | 6μl | 11μl | 22μl |
| FQ-RT Primer Mix | 2μl | 12μl | 22μl | 44μl |
| RNase-Free ddH2O | 5μl | 30μl | 55μl | 110μl |
| 总体积 | 10μl | 60μl | 110μl | 220μl |

**Step 4** 在每一个gDNA去除混合液（10 µl）中，加入10 µl 反转录混合液，加入后充分混匀，形成20 µl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 |