

逆转录

一. 实验目的

对前期提取的人膀胱移行细胞癌株(T24), 即正、低、中、高耐药株 T24-RC48的RNA进行逆转录, 获得cDNA, 为后期qPCR实验奠定基础。

二. 实验内容

2.1 实验设计 本实验旨在将人膀胱移行细胞癌株(T24)及其耐药亚型(T24-RC48)的总RNA逆转录cDNA, 为后续qPCR做准备。

首先, 据RNA定量结果, 按特定比例计算各样试剂用量, 配置20 μ l反应体系。接着, 将-80 $^{\circ}$ C RNA样本与逆转录试剂于冰上解冻。按分组将试剂加入对应RNA EP管, 轻混。然后将EP管置于金属浴中, 先50 $^{\circ}$ C反应15 min, 再85 $^{\circ}$ C反应5s。最后, 待温度稍降, 用封口膜封口, 将EP管冻存于-80 $^{\circ}$ C冰箱。

2.2 样本类型 T24野生型细胞株、低/中/高度耐药T24-RC48细胞株

2.3 测定原理 逆转录酶以RNA为模板, 通过引物引导, 合成互补的cDNA链。该步骤将不稳定的RNA转化为稳定的双链cDNA, 为后续qPCR扩增和定量提供DNA模板, 是RT-qPCR检测RNA(如基因表达分析)的关键预处理过程。

三. 材料与试剂

3.1 材料 移液器: 均购自 Eppendorf 公司

无酶枪头: Axygen公司

EP管: Axygen公司

封口膜, 擦镜纸

3-2试剂 前期提取耐苜蓿株的RNA; 逆转录试剂: Vazyme公司

四. 实验仪器 恒温金属浴加热仪; 微量分光光度计; -80度冰箱

五. 实验步骤 本实验遵循无核酸酶, 全程冰浴条件下进行。

5.1 根据上一次RNA提取结果, 参考配比, 计算出各逆转录试剂的量。

表1 各组逆转录体系中各试剂的加入量^{μl}

#	样品名称	ng/μl	A260/A280	表 1 各组逆转录体系中各试剂的加入量 ^{μl}				
				RNA 量 (ng/μl)	Enzyme Mix(μl)	5 × All-in-one qRT SuperMix(μl)	RNase-free ddH ₂ O(μl)	
1	样品 1	719.7	1.91	野生型	1302.8	23.4504	117.252	333.756
2	样品 2	1302.8	1.93	低度耐药	1015.1	18.2718	91.359	256.077
3	样品 3	1015.1	1.91	中度耐药	1115.4	20.0772	100.386	283.158
4	样品 4	1115.4	1.92	高度耐药	967.1	17.4078	87.039	243.117
5	样品 5	967.1	1.93					

5.2 样本预处理: 从-80℃冰箱取出冻存样本(4管), 冰上解冻(逆转录试剂可是);

5.3 根据之前计算, 缓慢吸取相应体, 分别加至正、低、中、高四个浓度RNA EP管中。

5.4 适当混匀, 轻擦管外水珠, 于金属浴加热仪上50℃15min, 然后85℃, 5s。

5.5 待温度微微降低, 撕取适量封口膜对EP管封口, 冻存于-80℃冰箱中。

六. 实验结果

提示本次逆转录所用样本RNA的A260/A280均为1.8~2.0, 实验成功获得高质量cDNA, RNA完整性、cDNA产量及特异性均符合预期。

七. 结果分析

本次实验步骤严谨合理, A260/A280比值均为1.8~2.0, 提示RNA纯度较高无蛋白质污染, 逆转录完成质量高。