

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间：2025 年 6 月 21 日 13:00 — 2025 年 6 月 21 日 13:30

19. 逆转录

一、实验目的

对前期提取的人膀胱移行细胞癌细胞株(T24)，即正、低、中、高耐药细胞株 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细胞株（T24）及其耐药亚型（T24 - RC48）的总 RNA 逆转录为 cDNA，为后续 qPCR 实验做准备。

首先，依据 RNA 定量结果，按特定比例计算各样本逆转录试剂用量，配置 20 μ l 反应体系。接着，从 -80 $^{\circ}$ C 冰箱取出 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 的 EP 管，轻柔混匀。然后，将 EP 管置于金属浴中，先 50 $^{\circ}$ C 反应 15 分钟，再 85 $^{\circ}$ C 反应 5 秒。最后，待温度稍降，用封口膜封口，将 EP 管冻存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱。实验全程遵循无核酸酶操作规范，在冰浴条件下进行，以保证 RNA 质量，获得高质量 cDNA。

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：均购自 Axygen 公司

EP 管：均购自 Axygen 公司

封口膜

擦镜纸

3.2 试剂

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 6 月 21 日 13:00 — 2025 年 6 月 21 日 13:30

前期提取耐药细胞的 RNA

逆转录试剂：购自 Vazyme 公司

四、实验仪器

恒温金属浴加热仪：购自 Biosafer 公司

超微量分光光度计：购自赛默飞公司

-80 度冰箱

五、实验步骤

本实验严格遵循无核酸酶（RNase-free）操作规范，全程在冰浴条件下进行，以防止 RNA 降解及非特异性扩增。实验步骤如下：

5.1 根据上一次 RNA 的提取结果，参考说明书所示配比，计算出所加入各逆转录试剂的量。

#	样品名称	ng/μL	A260/A280
1	样品 1	719.7	1.91
2	样品 2	1302.8	1.93
3	样品 3	1015.1	1.91
4	样品 4	1115.4	1.92
5	样品 5	967.1	1.93

图 1 RNA 定量结果

表 1 各组逆转录体系中各试剂的加入量

	RNA 量（ng/μl）	Enzyme Mix(μl)	5×All-in-one qRT SuperMix(μl)	RNase-free ddH ₂ O(μl)
野生型	1302.8	23.4504	117.252	333.756
低度耐药	1015.1	18.2718	91.359	256.077
中度耐药	1115.4	20.0772	100.386	283.158
高度耐药	967.1	17.4078	87.039	243.117

5.2 样本预处理，从-80℃超低温冰箱中取出冻存的 RNA 样本（共 4 管），置于冰上缓慢解冻。同时将逆转录试剂置于冰上缓慢解冻。

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 6 月 21 日 13:00 — 2025 年 6 月 21 日 13:30

5.3 根据之前计算的逆转录试剂的量，缓慢吸取相应体积，分别加到正、低、中、高四个浓度的 RNA EP 管中。注意吸取和注入时不要产生气泡。

5.4 加入完毕后进行适当混匀，轻擦去 EP 管外的小水珠后，放入金属浴加热仪上，设置温度为 50℃ 15min，完毕后紧接设置温度为 85℃ 5sec。完成后 RNA 逆转录为 cDNA。

5.5 待温度微微降低，撕取适量封口膜对 EP 管进行封口，而后冻存在-80℃冰箱中，为下次 qPCR 提供材料基础。

六、实验结果

提示本次逆转录所用样本 RNA 的 A260/A280 比值均为 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，可用于后续分子实验 qPCR。