

♥ RT-PCR

RT-PCR 是通过 RNA 反转录获得 DNA 的过程, 从而构建 cDNA 文库, 用以定量 PCR 或基因克隆。本 Protocol 使用 Thermo 的 cDNA 文库构建试剂盒, 实验步骤参照说明书加以取舍 Thermo Scientific Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit with dsDNase (K1682)

1. 提前打开 37°C 水浴锅、55°C 金属浴、PCR 仪, 取出 1 M DDT

! 提示: 本实验需要操作 RNA, 需要戴口罩、外层 PE 手套, 实验过程中保持 RNase-Free 状态, 直至反转录完成得到 DNA

2. 在 RNase-free 的 PCR 管中搭建体如下反应系, 除去 DNA 污染, 后用枪轻柔吸打混匀, 短离

试剂	用量
10×dsDNase Buffer	1 μL
dsDNase	1 μL
Total RNA	5 μg
RNase-free Water	To 10 μL

3. 37°C 水浴 2 分钟, PCR 管在漂中不用插入太深, 避免管口污染
4. 加入 1M DTT(100×)到终浓度为 10 mM (10 μL 体系中加入 0.1μL), 55°C 金属浴孵育 5 分钟使 DNase 灭活
5. 在冰上冷却后短离, 放在冰上, 按如下顺序搭建 **RT-PCR 反应体系**, 后用枪轻柔吸打混匀, 短离

试剂	用量
oligo(dT)18 primer	1 μL
10 mM dNTP Mix	1 μL
nuclease-free Water	to 15 μL
5× RT Buffer	4 μL
Maxima H Minus Enzyme Mix	1 μL

6. 于 PCR 仪中设置如下反应条件
 - 50°C 孵育 30 分钟
 - 85°C 孵育 5 分钟, 终止反应
 - 4°C 孵育降温, 取出后立即放冰上
7. 以 2 μL 分装到普通的 PCR 管中, -80°C 保存