

## 两步法RT-PCR

### 1.cDNA合成

- 1.1 配制gDNA去除体系
- 1.2 配置逆转录体系
- 1.3 逆转录反应：37°C, 15 min → 85°C, 5 s (酶失活) → 4°C

### 2.样品准备

- 2.1 根据实验目的准备目的基因的引物及内参
- 2.2 稀释cDNA原液，一般稀释20倍

### 3.预混液配置

- 3.1 体系组成（单样本2.2×体系）：H<sub>2</sub>O：5.72 μL；Primer mix：0.88 μL；SYBR Green：11 μL，总计17.6 μL（不含cDNA）
- 3.2 混匀、离心

### 4.加样

- 4.1 每管加入稀释后的cDNA 4.4 μL
- 4.2 混匀离心

### 5.分装

- 5.1 戴一次性手套或用镊子拿取八连管并放于黄色试管架上，注意方向（A朝上；H朝下）
- 5.2 将配好的mix加入八连管，10 μL/孔

### 6.上机

- 6.1 将样本转移至CFX96 Touch™仪器中
- 6.2 打开程序file→open→protocol→PCR→q-PCR

## 常见问题解析

### 1. 无扩增条带或条带很弱?

①检查RNA质量是否降解；②逆转录反应失败，检查逆转录酶活性及反应体系；③PCR引物设计不当或失效，重新设计或合成引物；④PCR反应条件（特别是退火温度）不优化，需进行温度梯度PCR优化；⑤cDNA模板量不足或含有PCR抑制剂，可尝试加大模板量或对cDNA产物进行稀释。

### 2. 出现非特异性条带或引物二聚体?

①提高PCR退火温度；②降低引物浓度；③减少PCR循环次数；④优化Mg<sup>2+</sup>浓度；⑤使用热启动Taq酶抑制低温下的非特异性扩增。

### 3. 阴性对照出现扩增条带?

①反应体系被cDNA或质粒DNA污染，需更换所有试剂、耗材，并彻底清洁工作区域；②引物设计不当，具有非特异性结合位点。

### 4. 定量结果重复性差?

①RNA提取和逆转录步骤的操作需严格一致；②用于定量的cDNA模板最好在PCR反应的指数扩增期内进行检测；③确保所有样品在逆转录前RNA上样量一致，通常可用看家基因（如GAPDH,  $\beta$ -actin）进行内参校正。

## 参考文献

[1] Figueroa S, Freire-Paspuel B, Vega-Mariño P, et al. High sensitivity-low-cost detection of SARS-CoV-2 by two steps end point RT-PCR with agarose gel electrophoresis visualization [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 21658.