

逆转录 PCR

逆转录是指以 RNA 为模板,合成与其互补的 cDNA 的过程。逆转录 PCR 是将 RNA 的逆转录(reverse transcription) 和 cDNA 的聚合酶链式反应 (PCR) 相结合的技术,故逆转录称为 RT-PCR 或反转录 PCR。逆转录 PCR 实验原理为:提取组织或细胞中的总 RNA,以 RNA 为模板,首先在利用逆转录酶反转录成 cDNA,再以 cDNA 链为模板进行 PCR 扩增,从而获得大量拷贝。逆转录 PCR 的出现使 RNA 检测的灵敏性提高了几个数量级,使一些极为微量 RNA 样品分析成为可能。

逆转录 PCR 应用

逆转录 PCR 的用途广泛,可用于分析基因的转录产物、检测细胞中 RNA 病毒的含量、合成 cDNA 探针、直接克隆特定基因的 cDNA 序列等。如在临床上 RT-PCR 可以用于遗传病诊断、癌症检测、检测病人标本中的 RNA 病毒,如 HAV、HCR、HIV 等。在植物方面 RT-PCR 常用于研究环境胁迫对植物基因表达的影响,以及在特定的环境或生长阶段中植物体不同部位基因表达的差异性。使用 RT-PCR 检测分析 RNA 转录产物具有以下突出的优点:

- 理论上可以检测几乎任何基因的转录产物;
- 可以实现极为微量 RNA 样品 (ng 级别) 的检测;
- 样品耐受性好,未经纯化的粗制生物样品也可以用于检测;

模板

逆转录 PCR 的模板是 RNA,可以是总 RNA、mRNA 或体外转录的 RNA 产物。无论使用何种 RNA,都需确保 RNA 中无 RNA 酶和基因组 DNA 的污染。

RNA 提取

可以利用试剂盒从细胞 (或组织) 中提取得到 RNA。模板 RNA 的纯度和完整性对于扩增的结果有很大影响,从细胞中分离 RNA 应注意尽量减少 RNA 酶的污染 (RNA 酶分布广泛,除细胞内源性 RNA 酶外环境中也存在大量 RNA 酶),在提取 RNA 时,应尽量创造一个无 RNA 酶的环境:避免 RNA 酶污染包括去除外源性 RNA 酶污染和抑制内源性 RNA 酶活性,主要是采用焦碳酸二乙酯 (DEPC) 去除外源性 RNA 酶,通过 RNA 酶的阻抑蛋白 Rnasin 和强力的蛋白质变性剂抑制内源性 RNA 酶。

引物

用于反转录的引物有随机引物、通用引物 (Oligo-dT) 及基因特异性引物三种，下表为三种引物的介绍：

引物	适用范围
随机引物	适用于长的或具有发卡结构的 RNA。适用于 rRNA、mRNA、tRNA 等所有 RNA 的反转录反应。主要用于单一模板的 RT-PCR 反应
Oligo-dT	适用于具有 PolyA 尾巴的 RNA (原核生物的 RNA、真核生物的 rRNA 和 tRNA 不具有 PolyA 尾巴)
基因特异性引物	与模板序列互补的引物，适用于目的序列已知的情况

引物最好选择 Oligo-dT 或基因特异性引物，随机引物会从 RNA 的多个位点(包括核糖体 RNA)开始转录，特异性低。Oligo-dT 引物同大多数真核细胞 mRNA3'端的 poly(A)尾杂交，与使用随机引物相比特异性高。但是 Oligo-dT 引物对 RNA 样品的质量要求较高，对于从福尔马林固定的组织中提取的劣质 RNA 不适合用 Oligo-dT 引物。

逆转录酶

逆转录酶是存在于 RNA 病毒体内的依赖 RNA 的 DNA 聚合酶。RT-PCR 实验中的逆转录酶需要具有以下三种活性

1. 依赖 RNA 的 DNA 聚合酶活性：以 RNA 为模板合成 cDNA 的第一条链；
2. Rnase 水解活性：水解 Rnase 杂合体中的 RNA;
3. 依赖 DNA 的 DNA 聚合酶活性：以一条 DNA 链为模板合成互补的双链 DNA

在选择逆转录酶时，建议选择无 RNaseH[®]活性(RNaseH-)的逆转录酶。具有 RNaseH 活性的逆转录酶的 RNaseH 活性会与聚合酶活性竞争 RNA 模板与 DNA 引物 (或 cDNA 延伸链) 形成的杂合链，并降解杂合链中的 RNA 链。被 RNaseH 活性所降解的 RNA 模板不能再作为合成 cDNA 的有效底物，降低了 cDNA 合成的产量与长度。

实验流程

从细胞材料中提取 RNA→RNA 加入到含有逆转录酶、引物、dNTPs 的反应体系中→退火，引物与 RNA 链配对→延伸，逆转录酶合成互补 cDNA 链变性→[常规 PCR 反应流程](#) (变性、退火、延伸，如此多次循环)。

RT-PCR “两步法” 与 “一步法”

RT-PCR 的实验操作分为 “一步法” 与 “两步法” 两种。一步法 RT-PCR 能克隆微量 mRNA 而不需构建 cDNA 文库（即 cDNA 合成与 PCR 反应在同一 Buffer 及酶中进行，一步法完成），省略了 cDNA 与 PCR 之间的过程。两步法 RT-PCR 首先用反转录酶合成 cDNA，然后以 cDNA 为模板进行 PCR，即 RNA 反转录与 PCR 扩增分两步进行。一步法 RT-PCR 与两步法相比快速、简便、减少了污染机会、减少了 RNA 二级结构、减少了 PCR 反应的错配率。RT-PCR 两步法的优势在于存在中间产物 cDNA，便于保存；且第二步 PCR 只取反转录反应产物的 1/10 进行反应，有利于 PCR 条件的调整，实验重现性强；两步法可以在第二步 PCR 反应体系中加入特异性引物，其灵敏度比一步法高；两步法的实验预算要低于一步法。但是由于两步法包括第一链 cDNA 合成和随后的 PCR 反应，容易产生污染问题。

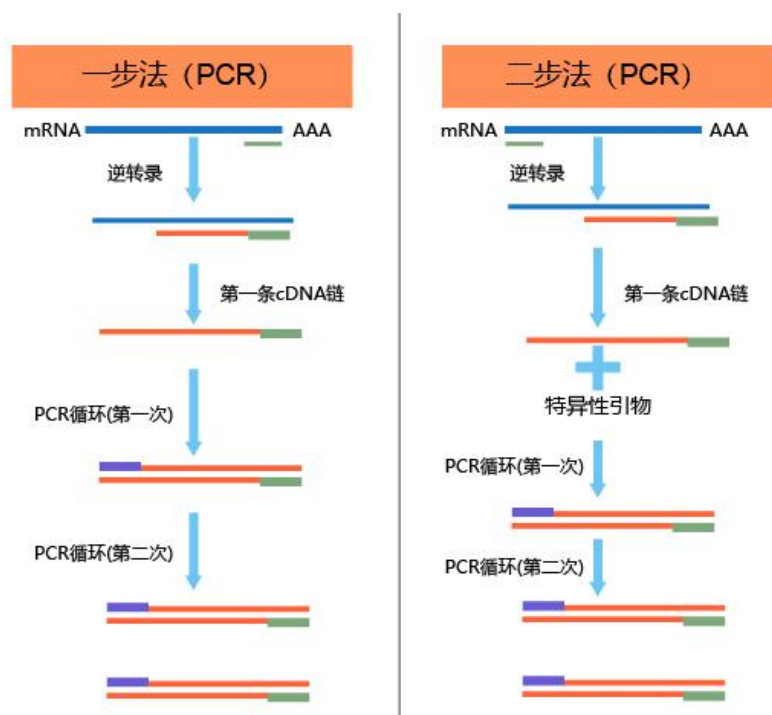


图 2：“一步法” 与 “两步法” 比较

实验操作注意事项

- RNA 提取一定要迅速，样本要新鲜，组织尽量在液氮中研磨；
- RNA 提取完马上进行反转录不要拖延，新提的 RNA 很容易降解；
- 反转录反应过程，需建立无 RNAase 环境，以避免模板 RNA 降解；

逆转录 qPCR 技术

real-time RT-PCR 中间的“RT”是 reverse transcription (逆转录) , 利用 mRNA 为模板的实时逆转录 PCR 技术 (quantitative Real-time RT-PCR) 。 real time RT-PCR 指的是 qPCR+RT-PCR 的组合, 是说将 mRNA 逆转录为 cDNA 后再作为模板进行实时荧光 PCR 分析, 因为 RT-PCR 是可以定性的, 但不能进行定量检测的。

注:

① RNase 是 RNA 水解酶的统称, 包含 RNase A, RNase H 等, RNase A 可以水解单双链 RNA, RNase H 主要水解 RNA 与 DNA 杂交双链中的 RNA

更多阅读

[RACE-PCR 技术](#)

[巢式 PCR 技术](#)

参考文献

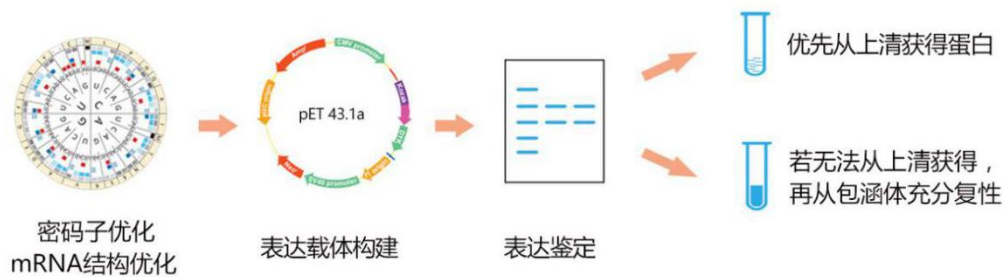
- [1] 孙晓东, 王燕桑明. 逆转录 PCR (RT-PCR) 实验操作要点[J]. 现代医药卫生, 2009, 25, 13:2049-2049;
- [2] 陈余朋, 张声, 陈林莺. RT-PCR 一步法与 RT-PCR 两步法比较[J]. 福建医科大学学报, 2003, 10, 37:100-102;
- [3] Stephen A. Bustin. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): Trends and problems[J]. Biomarkers, 2005, 10(6):429-438;
- [4] 郭若霖, 郭善一, 鲍秋野等. 竞争性 RT-PCR 测定法及 BMP-2 mRNA 的定量检测[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2000, 16, 5:680-683;
- [5] 赵晓, 马会勤. 葡萄果实发育后期半定量 RT-PCR 内参基因的优选[J], 中国农业大学学报, 2010, 15, 3:7-14;

南京德泰生物 -- 专注蛋白与抗体

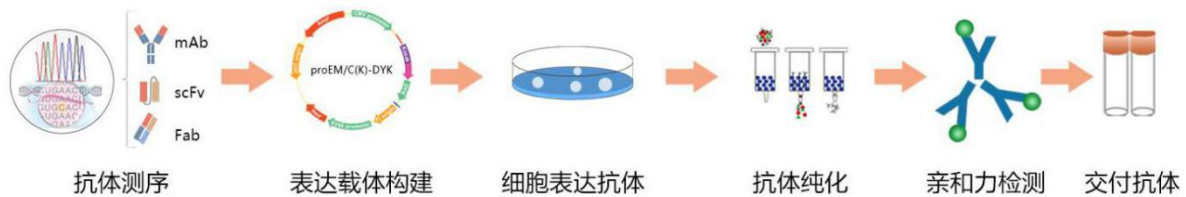
一、蛋白表达（哺乳动物细胞表达）蛋白被细胞充分修饰，活性有保障



二、蛋白表达（大肠杆菌表达）成功率>95%，不成功不收费，成功有保障



三、重组抗体表达 若想改造一个抗体，可以试试重组表达



四、稳定细胞系构建 研究级细胞系构建 & 高表达细胞株开发

