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[①]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 只取逆转录反应产物的 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。

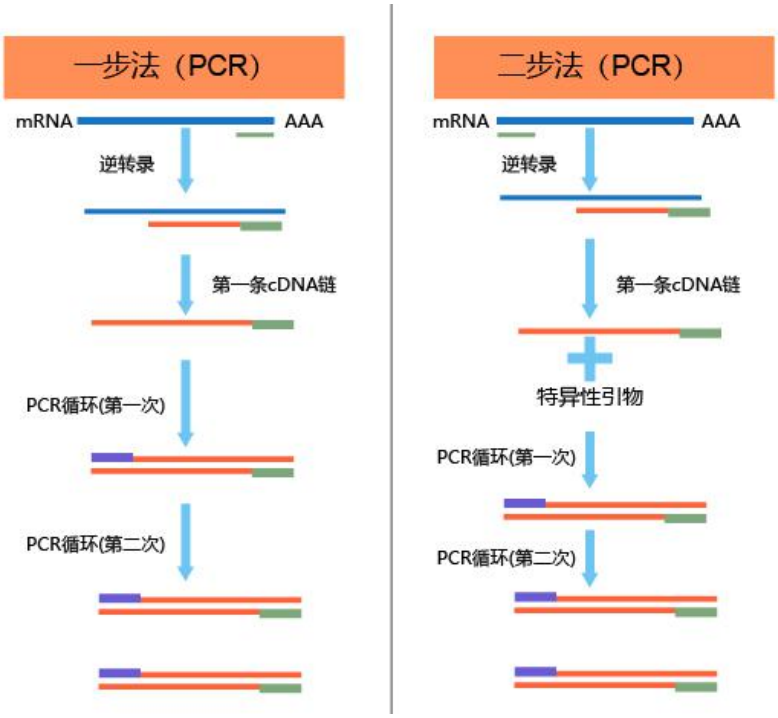


图 2：“一步法”与“两步法”比较

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 提取完马上进行逆转录不要拖延，新提的 RNA 很容易降解；
- 逆转录反应过程，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] StephenA.Bustin.QuantificationofmRNAusingreal-timereversetranscriptionPCR(RT-PCR):Trendsandproblems[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-2mRNA 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;

更多优质服务推荐

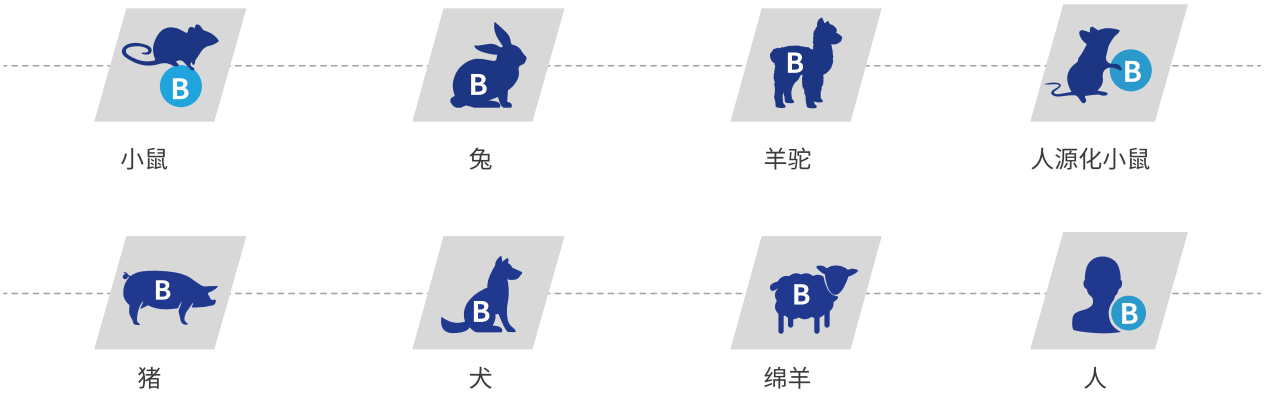
① SingleB® mAb Discovery Service
SingleB®单B细胞快速单抗发现

德泰生物提供SingleB®单B细胞快速单抗发现服务，利用SmartFlow® FACS记忆B细胞筛选平台与DeepLight®浆细胞筛选平台，实现记忆B细胞与浆细胞的双筛选。平台适用于小鼠、兔、羊驼、人源化小鼠、绵羊等多种免疫对象，从动物免疫到获得单抗，快至29天，比传统杂交瘤技术至少节省120天。

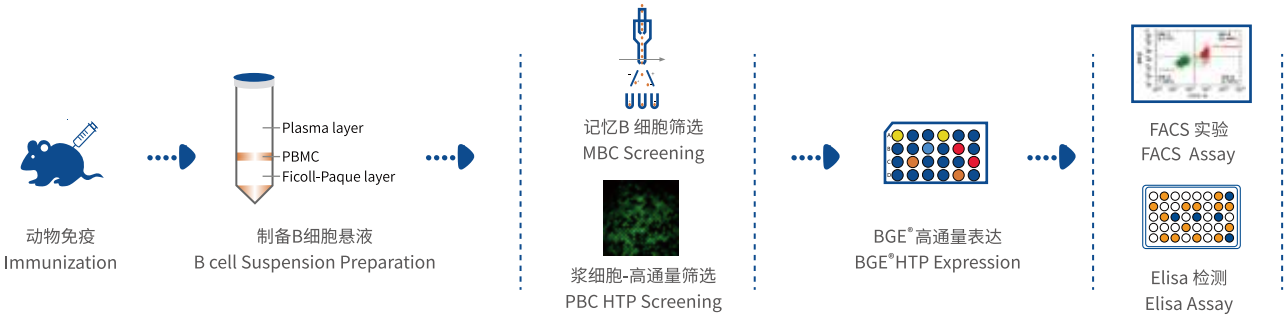
平台优势

- 支持蛋白、多肽、细胞、病毒等多种类型抗原免疫
- 记忆B细胞 & 浆细胞双筛选，保证B细胞多样性
- 单细胞扩增阳性率高，无需刺激培养，减少多样性损失
- 重轻链天然配对，亲和力更优
- 高通量，周期短，单抗发现快至29天
- ELISA、FACS、WB、IHC等多平台验证

可开发单抗物种



服务流程



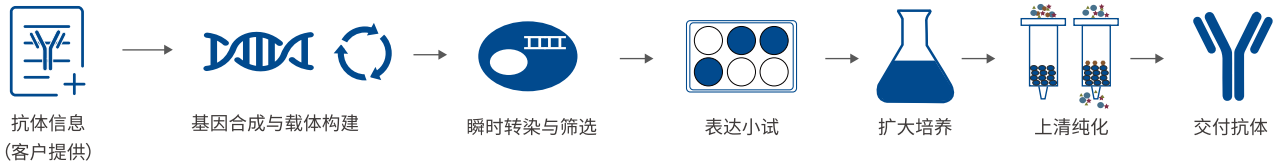
Recombinant Antibody Expression Service

重组抗体表达

德泰生物拥有完善的重组抗体表达与纯化体系、抗体多工艺质量验证体系。已交付的重组抗体项目种类包括scFv、Fab、(Fab')$_2$、VHH、嵌合抗体、双特异性抗体、Fc融合蛋白、全长IgG、IgM。cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器用于HEK293/CHO细胞的小试及大量培养。HPLC纯度、内毒素、浓度等要求均可以根据您的下游应用进行定制。

服务优势

服务流程

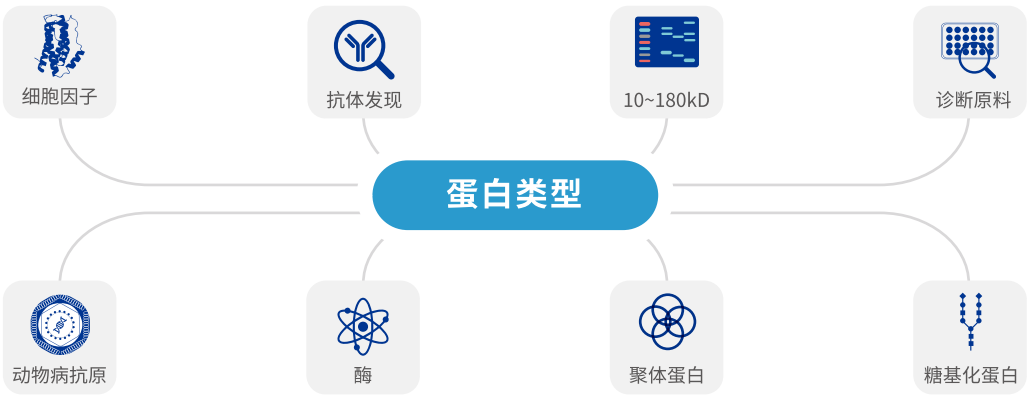


Recombinant Protein Expression Service

重组蛋白表达

原核蛋白表达系统、哺乳动物细胞蛋白表达系统

德泰生物拥有完善的原核蛋白表达与纯化体系和哺乳动物细胞蛋白表达与纯化体系。基于细胞因子、酶、诊断原料蛋白的工业化需求，我们配备了发酵设备并推出了大规模发酵制备服务；我们还配备了cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器，用于HEK293/CHO等真核细胞的小试及大量培养。



4 Hybridoma Antibody Gene Sequencing Service
杂交瘤抗体基因测序

德泰生物拥有mRNA全长测序平台和Failsafe®假基因排除技术，能够提供快速、可靠的杂交瘤抗体基因测序服务。

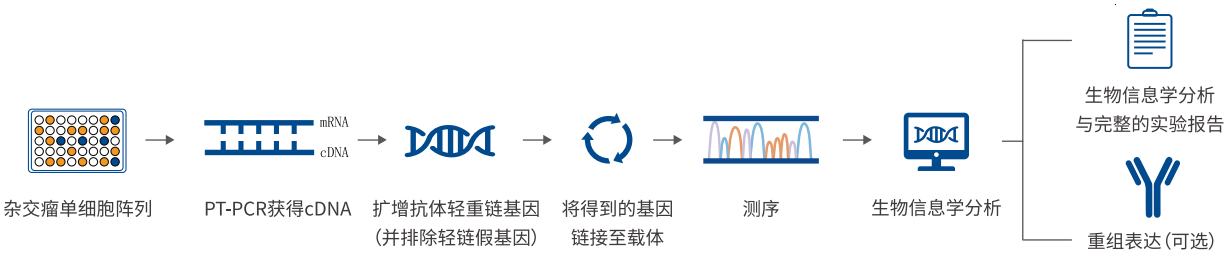
应用场景

- 抗体序列保护：获取抗体基因序列后可通过专利对CDR区进行保护。
- 生产方式备份：杂交瘤存在退化转阴风险，抗体序列可通过基因工程方式轻松转化为抗体样品。
- 抗体工程改造：获得的抗体序列可用于抗体人源化、双特异性抗体等抗体工程改造。

服务优势

- 极速体验：测序5天，表达5天，全程高通量
- 细胞需求少：只需1~5个细胞，可以接收孔板样品
- 保证测序结果准确：采用Failsafe®假基因排除技术，可排除κ轻链假基因
- 测序范围广：可测小鼠、大鼠、兔、羊等物种的IgM和IgG的所有亚型
- 一站式服务：德泰生物拥有丰富经验，可提供表达验证服务

服务流程



5 Biomolecular Interaction Analysis Service
分子间相互作用检测

德泰生物提供的分子间相互作用检测服务基于表面等离子共振（SPR）平台及生物膜干涉技术（BLI）平台，能够实现对分子间亲和力的定量和定性分析。与传统的GST pull down，免疫共沉淀，酵母双杂交等相比，具有更高的灵敏度、检测通量及较低的样品要求等优点。

检测范围

蛋白和蛋白　蛋白和小分子　蛋白和抗体　蛋白和抗体Fab片段

检测范围包括蛋白-蛋白、抗体-抗原、抗体片段-抗原、蛋白-抗体、蛋白-小分子、抗体-多肽、蛋白-DNA、DNA-DNA间的相互作用。

6 Antibody Humanization Service
抗体人源化

德泰生物人源化改造服务基于人工智能之深度学习算法，通过构建抗体结构模型、CDR移植与回复突变、识别关键氨基酸及人源化运算，获得人源化程度高且突变能低的抗体序列。

服务优势

- 重链和轻链同时参与优化
- 改造后的抗体人源化程度>90%
- 人源化抗体的亲和力与初始抗体相当
- 可进行多物种的抗体人源化

服务流程

1. Antibody sequence confirmation
2. Human germline acceptor selection
3. CDR grafting
4. Back mutation
5. Mutation energy ranking
6. Antibody expression
7. Affinity ranking

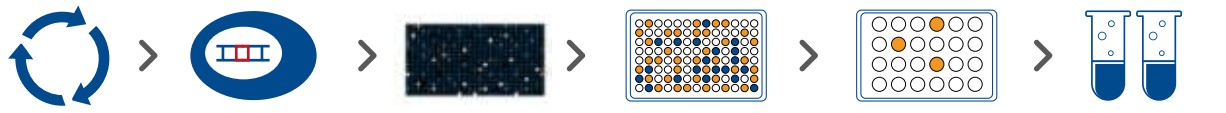
7 Stable Cell Line Development Service
生产型稳转细胞株构建

德泰生物提供高表达哺乳动物稳定细胞株构建服务，筛选过程使用先进的可视化DeepLight®单克隆细胞筛选平台，较传统筛选流程快近100天，大大缩短了稳定细胞株的开发周期。

DeepLight®细胞筛选平台的优势

	有限稀释法筛选	DeepLight® On-chip筛选
筛选时间	8周	1天
细胞分离效率	低	高
筛选通量	低	高
单细胞水平筛选	否	是

服务流程



基因合成&质粒抽提 › 稳定转染 › On-chip筛选 › 压力筛选 › 扩大培养 › 交付单克隆细胞株

服务优势

更快的筛选速度	百k级筛选通量	可视化筛选结果	稳定高产
从DNA到细胞株 较传统方法快近100天	一次筛选640k细胞 优选高表达细胞株	先进DeepLight®平台 高表达细胞株实时成像	可稳定转代50代 重组单抗可达5 g/L