

逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)

逆转录-聚合酶链反应 (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

的原理是：提取组织或细胞中的总 RNA，以其中的 mRNA 作为模板，采用 Oligo (dT) 或随机引物利用逆转录酶反转录成 cDNA。再以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增，而获得目的基因或检测基因表达。RT-PCR 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。该技术主要用于：分析基因的转录产物、获取目的基因、合成 cDNA 探针、构建 RNA 高效转录系统。

详细

实验方法

- 逆转录-聚合酶链反应实验方法

实验材料

- 组织或细胞样品

试剂、试剂盒

- RNA 提取试剂
- dNTP 混合物
- Taq DNA 聚合酶
- 第一链 cDNA 合成试剂盒

仪器、耗材

- 离心管
- 离心机
- 水浴锅
- PCR 管

- 电泳仪
- 凝胶图像分析系统

逆转录-聚合酶链反应 (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) 的原理是: 提取组织或细胞中的总 RNA, 以其中的 mRNA 作为模板, 采用 Oligo (dT) 或随机引物利用逆转录酶反转录成 cDNA。再以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 而获得目的基因或检测基因表达。RT-PCR 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。该技术主要用于: 分析基因的转录产物、获取目的基因、合成 cDNA 探针、构建 RNA 高效转录系统。

一、反转录酶的选择

1. Money 鼠白血病病毒 (MMLV) 反转录酶: 有强的聚合酶活性, RNA 酶 H 活性相对较弱。最适作用温度为 37°C。
2. 禽成髓细胞瘤病毒 (AMV) 反转录酶: 有强的聚合酶活性和 RNA 酶 H 活性。最适作用温度为 42°C。
3. *Thermus thermophilus*、*Thermus flavus* 等嗜热微生物的热稳定性反转录酶: 在 Mn^{2+} 存在下, 允许高温反转录 RNA, 以消除 RNA 模板的二级结构。
4. MMLV 反转录酶的 RNase H-突变体: 商品名为 Superscript 和 SuperScript II。此种酶较其它酶能多将更大部分的 RNA 转换成 cDNA, 这一特性允许从含二级结构的、低温反转录很困难的 mRNA 模板合成较长 cDNA。

二、合成 cDNA 引物的选择

1. 随机六聚体引物：当特定 mRNA 由于含有使反转录酶终止的序列而难于拷贝其全长序列时，可采用随机六聚体引物这一不特异的引物来拷贝全长 mRNA。用此种方法时，体系中所有 RNA 分子全部充当了 cDNA 第一链模板，PCR 引物在扩增过程中赋予所需要的特异性。通常用此引物合成的 cDNA 中 96% 来源于 rRNA。
2. Oligo(dT)：是一种对 mRNA 特异的方法。因绝大多数真核细胞 mRNA 具有 3' 端 Poly(A+) 尾，此引物与其配对，仅 mRNA 可被转录。由于 Poly(A+)RNA 仅占总 RNA 的 1-4%，故此引物合成的 cDNA 比随机六聚体作为引物得到的 cDNA 在数量和复杂性方面均要小。
3. 特异性引物：最特异的引发方法是用含目标 RNA 的互补序列的寡核苷酸作为引物，若 PCR 反应用二种特异性引物，第一条链的合成可由与 mRNA 3' 端最靠近的配对引物起始。用此类引物仅产生所需要的 cDNA，导致更为特异的 PCR 扩增。

三、试剂准备

1. RNA 提取试剂
2. 第一链 cDNA 合成试剂盒
3. dNTPmix：含 dATP、dCTP、dGTP、dTTP 各 2mM
4. Taq DNA 聚合酶

四、操作步骤

1. 总 RNA 的提取：见相关内容。
2. cDNA 第一链的合成：目前试剂公司有多种 cDNA 第一链试剂盒出售，其原理基本相同，但操作步骤不一。现以 GIBICOL 公司提供的 SuperScript™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis 试剂盒为例。

① 在 0.5ml 微量离心管中,加入总 RNA 1-5 μ g,补充适量的 DEPC H₂O 使总体积达 11 μ l。

在管中加 10 μ M Oligo (dT) 12-18 1 μ l, 轻轻混匀、离心。

② 70°C加热 10min, 立即将微量离心管插入冰浴中至少 1min。

然后加入下列试剂的混合物: 10 \times PCR buffer 2 μ l; 25mM MgCl₂ 2 μ l; 10mM dNTPmix 1 μ l; 0.1M DTT 2 μ l

轻轻混匀, 离心。42°C孵育 2-5min。

③ 加入 Superscript II 1 μ l , 在 42°C水浴中孵育 50min。

④ 于 70°C加热 15min 以终止反应。

⑤ 将管插入冰中, 加入 RNase H 1 μ l , 37°C孵育 20min, 降解残留的 RNA。 -20°C保存备用。

3. PCR:

① 取 0.5ml PCR 管, 依次加入下列试剂: 第一链 cDNA 2 μ l; 上游引物 (10pM) 2 μ l; 下游引物 (10pM) 2 μ l; dNTP(2mM) 4 μ l; 10 \times PCR buffer 5 μ l; Taq 酶 (2u/ μ l) 1 μ l。

② 加入适量的 ddH₂O, 使总体积达 50 μ l。轻轻混匀, 离心。

③ 设定 PCR 程序。在适当的温度参数下扩增 28-32 个循环。为了保证实验结果的可靠与准确, 可在 PCR 扩增目的基因时, 加入一对内参 (如 G3PD) 的特异性引物, 同时扩增内参 DNA, 作为对照。

④ 电泳鉴定: 行琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察结果。

⑤ 密度扫描、结果分析: 采用凝胶图像分析系统, 对电泳条带进行密度扫描。

五、注意事项

1. 在实验过程中要防止 RNA 的降解, 保持 RNA 的完整性。在总 RNA 的提取过程中, 注意避免 mRNA 的断裂。

2. 为了防止非特异性扩增，必须设阴性对照。
3. 内参的设定：主要为了用于靶 RNA 的定量。常用的内参有 G3PD（甘油醛-3-磷酸脱氢酶）、 β -Actin（ β -肌动蛋白）等。其目的在于避免 RNA 定量误差、加样误差以及各 PCR 反应体系中扩增效率不均—各孔间的温度差等所造成的误差。
4. PCR 不能进入平台期，出现平台效应与所扩增的目的基因的长度、序列、二级结构以及目标 DNA 起始的数量有关。故对于每一个目标序列出现平台效应的循环数，均应通过单独实验来确定。
5. 防止 DNA 的污染：① 采用 DNA 酶处理 RNA 样品；② 在可能的情况下，将 PCR 引物置于基因的不同外显子，以消除基因和 mRNA 的共线性。