

采用 cMaster RT_{plus}PCR 系统 提高 RT-PCR 的灵敏度和产物长度

摘要

RT-PCR 已经成为研究者确定感兴趣的器官、组织或细胞中 mRNA 转录本出现、结构和表达水平的基本方法。RT-PCR 的基本步骤包括：首先对样品中出现的所有 mRNA 合成一个 cDNA 拷贝，接着扩增感兴趣的基因。因为两个步骤中使用的反应缓冲液不能兼容，所以这两个步骤（RT 和 PCR）通常分别进行。即使有些试剂盒能将两个步骤合而为一，但是同样因为上述的缓冲液不兼容性，极大地限制了检测灵敏度。Eppendorf 设计了一个含有全新化学物质的新试剂盒，使一步法 RT-PCR 更加有效，在两步法实验中可以获得更高的灵敏度。本文将对新试剂盒的表现进行检验。

材料和方法

- Eppendorf cMaster RT_{plus}PCR 系统
- Eppendorf Perfect RNA Eukaryotic 试剂盒

所有的 PCR 反应均在 Eppendorf Mastercycler[®] gradient 梯度 PCR 仪上进行。

实验 1：一步法灵敏度检测

RT-PCR 扩增目标：500 bp 的人 α 微管蛋白 mRNA 片段。模板 RNA：从人 HELA 细胞中纯化的总 RNA。反应中应用的模板浓度从 1 μ g 递增至 10 pg。

方案：Eppendorf cMaster RT_{plus}PCR 系统，标准一步法 RT-PCR 方案。1:10 稀释 RT_{plus}PCR 缓冲液，镁离子终浓度 2.5 mM，反应总体积 50 μ l。

简介

逆转录（RT）以及随后进行的 PCR（RT-PCR）是 RNA 分析中使用得最广泛的技术之一。如果需要平行分析多个 RNA 样品，首选方法为一步法 RT-PCR。如果要扩增困难目标片段或从单一 cDNA 池中扩增多重目标片段则会选择两步法。

Eppendorf 推出的全新的 cMaster RT_{plus}PCR 系统适用于各种 RT-PCR 应用。它含有一种全新的重组逆转录酶和一种具有高保真性的 PCR 酶混合物。另外，RT_{plus}PCR 反应缓冲液能够自动调节镁离子浓度，因此这一重要成分的浓度无需优化。这种自我调节的效果是通过镁离子的弱螯合作用来实现的。如果镁离子浓度过高，螯合剂会与过剩的镁离子结合，如果反应（Taq 或 DNA）需要镁离子，镁离子就会被释放出来。这种创新技术提高了 cMaster RT_{plus}PCR 的灵敏度和特异性。使 cMaster RT_{plus}PCR 试剂盒既能进行一步法，又能进行两步法 RT-PCR，而且具有很大的动力学检测范围，能扩增得到的 PCR 产物长度范围也很大（一步法反应最长可扩增 5.3 kb 片段；两步法方案最长能扩增 12.3 kb 片段）。

下面的实验可以展示该试剂盒在不同应用中的表现。

实验 1 关注新试剂盒在一步法 RT-PCR 中卓越的灵敏度。而在一步法应用中，最重要的因素就是能够采用尽可能少的目标材料进行有效工作。

实验 2 显示应用一步法方案进行长距离 RT-PCR 不再是个难题。试剂盒中创新的缓冲液能同时保证逆转录酶和高保真酶混合物都具有最佳延伸性。

本系统提供的两步法 RT-PCR 备选程序适用的模板范围很广。实验 3 描述了对不同模板的扩增情况。这个新的系统能为所有的 RT 目标提供全面解决方案，不论需要扩增的片段是中等长度还是极长，不同来源的总 RNA 中转录本是低丰度还是高丰度。

设置一步法 RT-PCR 反应

成分	50 μ l RT-PCR 反应体积	反应成分的终浓度
不含 RNA 酶的水	15.1 μ l	
dNTP 混合物 (每种 dNTP 浓度均为 10 mM)	1.5 μ l	300 μ M
微管蛋白正向引物	0.2 μ l	200 nM
微管蛋白反向引物	0.2 μ l	200 nM
总 HELA RNA	3.0 μ l	50 μ l 中含 1 μ g - 10 pg
MasterMix 1	20.0 μ l	
不含 RNA 酶的水	24.0 μ l	
含镁离子的 RT _{plus} PCR 反应缓冲液	5.0 μ l	1 \times ; 2.5 mM 镁离子
cMaster RT 酶	0.5 μ l	0.15U / μ l
cMaster PCR 酶混合物	0.5 μ l	0.05U / μ l
MasterMix 2	30.0 μ l	

循环程序参数

循环	步骤	温度	时间	描述
1 ×	1	50°C	30 分钟	逆转录
1 ×	2	94°C	3 分钟	初始变性
40 ×	3	94°C	15 秒	模板变性
	4	68°C	45 秒	引物退火 / 延伸

实验 2：一步法扩增长片段

RT-PCR 扩增目标：5.3 kb 的人结节性脑硬化因子 (hTSE) mRNA 片段。模板 RNA：从人 HELA 细胞中纯化的总 RNA。反应中应用的模板浓度为 100 ng 和 10 ng。

方案：Eppendorf cMaster RT_{plus}PCR 试剂盒，针对长模板的特殊 RT-PCR 方案。

设置一步法 RT-PCR 反应

成分	50 μl RT-PCR 反应体积	反应成分的终浓度
不含 RNA 酶的水	2.5 μl	
dNTP 混合物 (每种 dNTP 浓度均为 10 mM)	2.5 μl	500 μM
hTSE 正向引物	1.0 μl	200 nM
hTSE 反向引物	1.0 μl	200 nM
总 HELA RNA	3.0 μl	每个反应中 10 ng 和 100 ng
MasterMix 1	10.0 μl	
不含 RNA 酶的水	34.0 μl	
含 25 mM 镁离子的 RT _{plus} PCR 反应缓冲液	5.0 μl	1 × ; 2.5 mM 镁离子
cMaster RT 酶	0.5 μl	0.15 U / μl
cMaster PCR 酶混合物	0.5 μl	0.05 U / μl
MasterMix 2	40.0 μl	

循环程序参数

循环	步骤	温度	时间	描述
1 ×	1	65°C	5 分钟	初始 RNA 变性
1 ×	2	42°C	60 分钟	逆转录
1 ×	3	93°C	3 分钟	初始变性
35 ×	4	93°C	15 秒	模板变性
	5	59°C	30 秒	引物退火
	6	68°C	5.5 分钟	引物延伸

实验 3：两步法 RT-PCR

两步法 RT-PCR 的扩增目标：

- 500 bp 的 (鼠和人) α 微管蛋白 mRNA 片段
- 1.3 kb 的 (鼠和人) 肿瘤坏死因子受体 (TNFR1) mRNA 片段
- 5.3 kb 的人结节性脑硬化因子 (hTSE) mRNA 片段
- 12.3 kb 的鼠动力蛋白 mRNA 片段

方案：Eppendorf cMaster RT_{plus}PCR 试剂盒，采用产品说明书中的针对普通长度模板和较长模板的两步法 RT-PCR 程序。所有的逆转录反应均采用 0.5 μg 的 Oligo (dT) 20 引物为引物。

设置第一步 RT 反应

成分	以 Oligo (dT) 20 为引物进行逆转录	反应成分的终浓度
不含 RNA 酶的水	加至 MasterMix 1 总体积为 10 μl	
dNTP 混合物 (每种 dNTP 浓度均为 10 mM)	2.0 μl	1 mM
Oligo (dT) 20 引物 (0.5 μg / μl)	1.0 μl	25 ng / μl
模板 RNA:		
HELA (350 ng / μl)	3.0 μl	1 μg 总 RNA
A 细胞 (1 μg / μl)	1.0 μl	
L 细胞 (220 ng / μl)	4.5 μl	
McCoy 细胞 (135 ng / μl)	7.0 μl	
MasterMix 1	10.0 μl	
不含 RNA 酶的水	5.0 μl	
含 25 mM 镁离子的 RT _{plus} PCR 反应缓冲液	4.0 μl	2 × ; 5mM 镁离子
cMaster RT 酶	1.0 μl	0.75 U / μl
MasterMix 2	10.0 μl	

设置第二步 PCR 反应

成分	普通 PCR (微管蛋白 TNFR1)	长片段 (动力蛋白, hTSF)	反应成分终浓度
不含 RNA 酶的水	7.0 μ l	6.0 μ l	
正向引物	1.0 μ l	1.0 μ l	0.2 μ M
反向引物	1.0 μ l	1.0 μ l	0.2 μ M
第一步逆转录反应产物	1.0 μ l	2.0 μ l	N/A
MasterMix 3	10.0 μl	10.0 μl	
不含 RNA 酶的水	33.6 μ l	32.0 μ l	
含 25 mM 镁离子的 RT _{plus} PCR 反应缓冲液	5.0 μ l	-	1 \times ; 2.5 mM 镁离子
含 25 mM 镁离子的 10 \times Tuning 反应缓冲液	-	5.0 μ l	1 \times ; 2.5 mM 镁离子
dNTP 混合物 (每种 dNTP 浓度均为 10 mM)	1.0 μ l	2.5 μ l	200 μ M (500 μ M)
cMaster PCR 酶混合物	0.4 μ l (2U)	0.5 μ l (2.5U)	0.04 - 0.05 U / μ l
MasterMix 4	40.0 μl	40.0 μl	

RT 反应条件

步骤	温度	时间	描述
1	65°C	5 分钟	初始模板变性
2	0°C	5 分钟	冷却变性的模板 RNA
3	42°C	60 分钟	第一链 cDNA 合成
4	-20°C	直到进行 PCR 反应	PCR 前样品储存

注: 动力蛋白的逆转录孵育时间延长至 90 分钟。

微管蛋白和 TNFR1 的两步循环方案

循环	步骤	温度	时间	描述
1 \times	1	94°C	3 分钟	初始变性
35 \times	2	94°C	15 秒	模板变性
	3	68°C	40 秒* / 60 秒**	引物退火 / 延伸

* —— 微管蛋白

** —— TNFR1

hTSF 和动力蛋白的三步循环方案

循环	步骤	温度	时间	描述
1 \times	1	93°C	3 分钟	初始模板变性
35 \times	2	93°C	15 秒	模板变性
	3	56°C - 59°C	30 秒	引物退火
	4	68°C	5.5 - 12 分钟	引物延伸

不同大小目的片段所采用的延伸时间和退火温度

目的片段	微管蛋白	TNFR1	hTSF	动力蛋白
延伸时间 (PCR)	40 秒	1 分钟	5.5 分钟	12 分钟
退火温度	68°C	68°C	59°C	56°C
退火时间	-	-	30 秒	30 秒
每循环增加时间	-	-	-	20 秒

使用的引物

微管蛋白正向引物: CACCCGTCTTCAGGGCTTCTTGGTTT

微管蛋白反向引物: CATTTCACCATCTGGTTGGCTGGCTC

TNFR 正向引物: CCACCATCTCGGTCATCAGGATTGCCT

TNFR 反向引物: TTCTCATGGAAGCTATGGGTATCACAT

hTSF 正向引物:

GGAGTTTATCATCACCCGCGGAAATACTGAGAG

hTSF 反向引物:

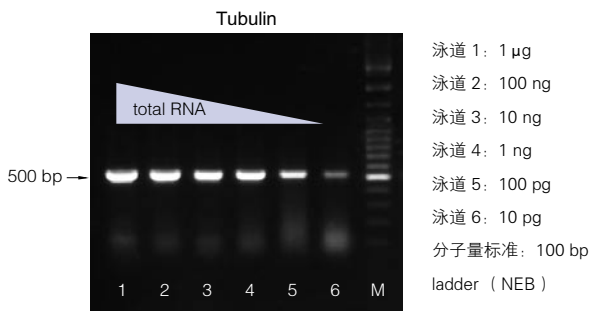
TATTTACTGACAGGCAATACCGTCCAAGG

动力蛋白正向引物: CGGCGCTGGAGGAGAA

动力蛋白反向引物: AGGTGGTGGCTCAAACACAAAG

结果

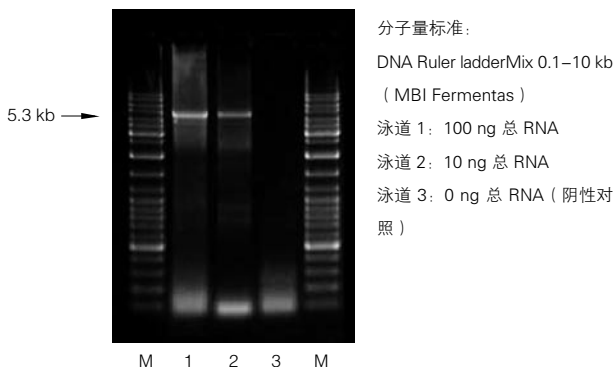
实验 1: 一步法 RT-PCR 的灵敏度



● 图1: 从不同数量的总 RNA 中扩增 α 微管蛋白 cDNA 片段结果

cMaster RT_{plus}PCR 系统显示出一种依赖于模板 RNA 量的宽广的产物产量动力学范围。能从低至 10 pg 的 HELA 总 RNA 中检测到 α 微管蛋白 mRNA。

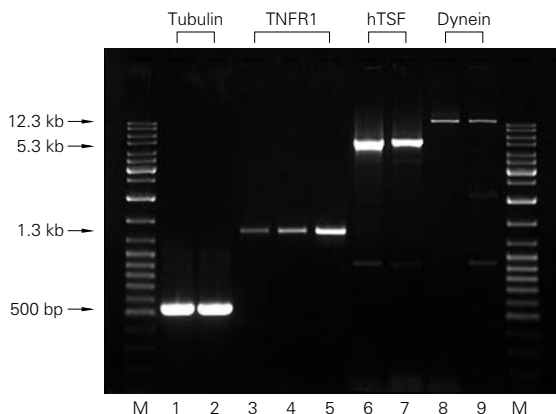
实验 2: 用一步法 RT-PCR 从不同量的总 RNA 中扩增长片段



● 图2: 一步法 RT-PCR 法检测长片段人结节性脑硬化因子 mRNA

如图 2 所示, 应用一步法 RT-PCR 方法, 可以从 100 ng 和 10 ng 总 RNA 中检测到 5.3 kb 的 hTSF PCR 产物。这个 PCR 反应非常困难, 大多数 RT-PCR 试剂盒生产厂家从未发布过应用一步法方案, 有效扩增类似长度模板的结果。相反, Eppendorf 试剂盒能稳定可靠地从 10 ng HELA 细胞 RNA 中扩增该产物。

实验 3: 对不同来源的总 RNA 中不同长度、不同丰度的转录本进行两步法 RT-PCR 扩增



● 图3: 不同来源(鼠和人的细胞)的总 RNA 中扩增不同靶序列的两步法 RT-PCR

对 5 种不同表达水平的基因进行 RT-PCR。为了得到最高的灵敏度, RT 和 PCR 反应分开进行。如图 3 所示, 对于 α 微管蛋白和 TNFR1, 我们可以应用两步法 RT-PCR 方法并将退火和延伸步骤合并为进行一次 68°C 孵育。如图 3 所示, 无论片段长度大小和拷贝数高低, 所有反应都可以顺利进行。即使对于动力蛋白这种特别长(达 12.3 kb)的极端稀有转

录本, 用 cMaster RT_{plus}PCR 系统也能够进行有效扩增, 而且结果具有极佳的重复性, 表明即使对于困难的 RT-PCR 反应, Eppendorf 试剂盒也能获得可靠结果。

图3 的补充细节

泳道	目的基因	产物长度	模板 RNA 量	来源	丰度
1	α 微管蛋白	500 bp	50 ng 总 RNA	HELA 细胞	高 (管家基因)
2	α 微管蛋白	500 bp	50 ng 总 RNA	McCoy 细胞*	高 (管家基因)
3	TNFR1	1.3 kb	50 ng 总 RNA	HELA 细胞	稀有转录本
4	TNFR1	1.3 kb	50 ng 总 RNA	A 549 细胞	稀有转录本
5	TNFR1	1.3 kb	50 ng 总 RNA	McCoy 细胞*	未知
6	hTSF	5.3 kb	100 ng 总 RNA	HELA 细胞	未知
7	hTSF	5.3 kb	100 ng 总 RNA	HELA 细胞	未知
8	鼠动力蛋白	12.3 kb	100 ng 总 RNA	L929 细胞*	稀有转录本
9	鼠动力蛋白	12.3 kb	100 ng 总 RNA	McCoy 细胞*	稀有转录本

* —— 鼠源细胞系

讨论

cMaster RT 系统是为了给所有的 RT 和 RT-PCR 应用提供最大的灵活性而设计的。该试剂盒结合了重组的同二聚体病毒逆转录酶和独特的 RT_{plus}PCR 反应缓冲液系统, 可以在较宽的温度范围 (37°C – 60°C) 和 0.2 kb – 12.5 kb 产物大小范围内进行有效的 cDNA 合成。

cMaster RT_{plus}PCR 酶混合物兼具热稳定性 DNA 聚合酶活性, 校正功能辅助的保真性和高延伸效率。应用于一步法中, 可以灵敏地检测到极少量的总 RNA 并扩增出长达 5.3 kb 的 cDNA (参见图1 和图2)

两步法方案可以从 RT 反应中扩增多个目的 cDNA, PCR 产物的片段长度可增加至 12.3 kb (参见图3)

其他的扩展应用: 系统的逆转录部分即 cMaster RT 可以与任何 PCR 系统合用或者为其他下游应用如杂交实验合成 cDNA 探针。