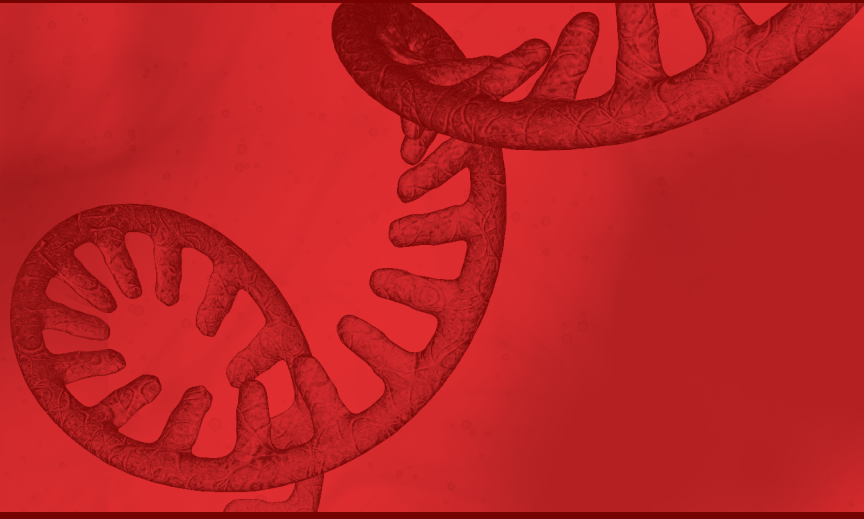


# 逆转录技术手册





本文档中的信息如有更改, 恕不另行通知。

#### 免责声明

Thermo Fisher Scientific及其附属公司不对本文档提供任何明示或暗示的保证, 包括但不限于适销性、特定用途适用性或非侵权性的保证。在任何情况下, 无论是否以合同、侵权、担保、抑或任何法规为依据, 或以任何其他特殊依据为基础, 对与本文档或因本文档引起的(包括但不限于对本文件的使用)特殊、偶然、间接、惩罚性、多重或后果性的损害。在法律允许范围内, Thermo Fisher Scientific及其附属公司均不承担责任。

# 目录

<b>1 逆转录</b>	<b>1</b>
<b>1.1 发现</b>	<b>1</b>
<b>1.2 发展</b>	<b>1</b>
<b>1.3 应用</b>	<b>2</b>
<b>2 建立逆转录反应</b>	<b>3</b>
<b>2.1 步骤</b>	<b>3</b>
2.1.1 RNA模板制备	3
2.1.2 基因组DNA去除	6
2.1.3 选择引物	6
2.1.4 进行逆转录	8
2.1.5 基因组DNA去除	9
<b>2.2 常见逆转录酶及性质</b>	<b>9</b>
2.2.1 DNA聚合酶活性	9
2.2.2 RNase H活性	10
2.2.3 热稳定性	11
2.2.4 持续合成能力	12
2.2.5 保真度	14
2.2.6 末端转移酶 (TdT) 活性	14
<b>2.3 常见问题及解决建议</b>	<b>15</b>
2.3.1 RT-(q)PCR扩增量低或未扩增	15
2.3.2 RT-(q)PCR非特异性扩增	16
2.3.3 cDNA截短	17
2.3.4 cDNA pool覆盖率低	18
2.3.5 cDNA测序错误	19
<b>3 应用</b>	<b>20</b>
<b>3.1 逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR)</b>	<b>20</b>
3.1.1 RT-PCR	20
3.1.2 定量RT-PCR	27
3.1.3 直接RT-qPCR	28

3.2 cDNA克隆和文库构建 .....	29
3.3 cDNA末端快速扩增 .....	32
3.4 基因表达芯片 .....	34
3.5 RNA测序 .....	36
3.6 逆转录环介导等温扩增 (RT-LAMP) .....	38

# 1 逆转录

本章内容涵盖逆转录基础、cDNA合成、酶选择、常见问题处理技巧以及cDNA在分子生物学研究中的应用,是适用于各种层级研究人员的学习资源。逆转录反应需要使用一系列在遗传信息传递过程中发挥独特作用的酶,被称之为逆转录酶。自从这些酶被发现以来,研究人员便开始在一系列分子生物学应用中将这一类酶用作基本工具。

## 1.1 发现

分子生物学最初的中心法则认为, DNA转录成RNA, 然后再由RNA翻译成蛋白质。但在20世纪70年代, 随着两支科研团队(分别为威斯康星大学Howard Temin领导的团队和麻省理工大学David Baltimore领导的团队)各自独立发现了与RNA病毒(逆转录病毒)复制相关的新酶, 使这一理论遇到了挑战。这些酶可以将病毒RNA基因组转换成互补DNA(cDNA)分子, 随后cDNA即可整合到宿主的基因组中。这些酶为RNA依赖性DNA聚合酶, 又称逆转录酶。它们与中心法则的DNA到RNA流程不同, 而是由RNA模板转录成cDNA分子(图1.1.1)。1975年, Temin 和 Baltimore凭借逆转录酶这一发现, 获得诺贝尔生理学或医学奖。

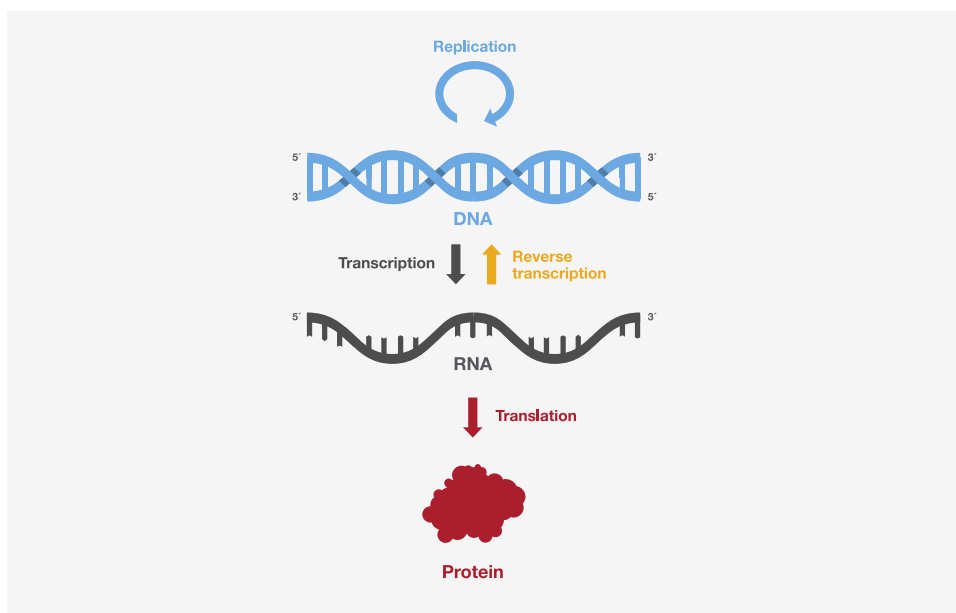
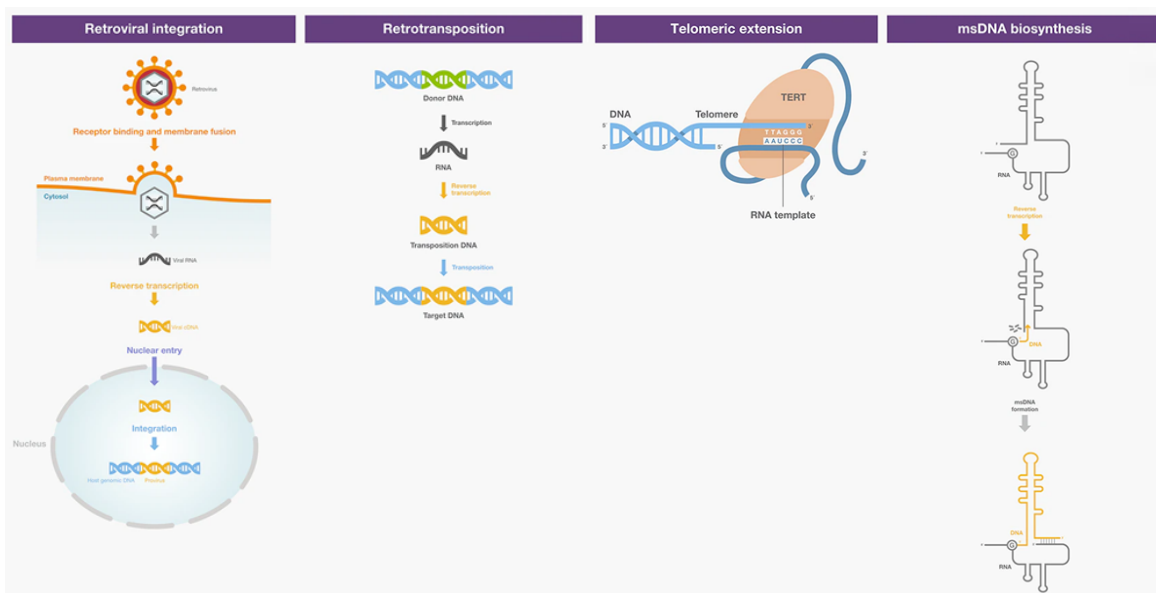


图1.1.1 遗传信息流

## 1.2 发展

如今人们已经在很多生物体内发现了逆转录酶, 包括病毒、细菌和动植物。在这些生物体内, 逆转录的一般作用是将RNA序列转换成可以插入到基因组不同区域的cDNA序列。通过这种方式, 逆转录可以(图1.2.1):

- 影响逆转录病毒的传播—例如，人免疫缺陷病毒 (HIV)、莫洛尼鼠白血病病毒 (M-MuLV) 和禽成髓细胞瘤病毒 (AMV)
- 影响移动的转座因子 (又称逆转录转座子)，从而保持真核生物的遗传多样性
- 影响染色体末端 (端粒) 的复制
- 影响细菌内染色体外的DNA/RNA嵌合子 (又称多拷贝单链DNA (msDNA)) 的合成



**图1.2.1 逆转录酶在生物学系统中的作用:** (A) 病毒RNA被逆转录, 以便整合到宿主基因组中; (B) 在逆转录转座过程中, RNA中间体逆转录, 以便将DNA拷贝插入到基因组其他区域; (C) 端粒酶逆转录酶 (TERT) 以RNA为模板, 延伸和维持真核染色体末端; (D) 逆转录是细菌多拷贝单链DNA (msDNA) 形成的中间步骤。

### 1.3 应用

逆转录酶不仅在生物系统之中发挥功能作用, 还是研究RNA的重要工具。首先利用逆转录酶进行的分子生物学实验方案之一是制备cDNA, 用以构建含有来自于细胞和组织的mRNA的DNA拷贝文库。这些cDNA文库可帮助理解在某个时间点活跃表达的基因及其功能。

尽管创建cDNA文库是实现表达基因鉴定的重要步骤, 进行低丰度RNA研究时仍存在诸多难题。这些问题随着聚合酶链式反应 (PCR) 技术的出现而迎刃而解。逆转录结合PCR (又称逆转录PCR或RT-PCR), 甚至可以检测出基因表达水平超低的RNA, 从而为分子诊断应用中的游离RNA、RNA病毒及癌变基因融合检测开辟了新道路。

此外, cDNA还可作为一系列下游应用的模板, 如微阵列和RNA测序, 可以高通量方式鉴定未知RNA。

## 2 建立逆转录反应

对于分子生物学实验，逆转录主要用于生成代表组织或细胞特异性RNA群体的互补DNA (cDNA)。为使实验成功，需要考虑一些与模板、试剂和反应条件相关的关键注意事项。

### 2.1 步骤

**2.1.1 RNA模板制备** RNA是逆转录的模板。总RNA通常用于RT-(q)PCR等下游应用的cDNA合成，而特定类型的RNA (例如信使RNA (mRNA)、microRNA (miRNA) 等小RNA) 可经过富集而用于某些应用，如cDNA文库构建和miRNA图谱分析。

保持RNA完整性至关重要，在提取、处理、储存和实验使用过程中需要采取特殊的保护措施。防止RNA降解的最佳方法包括佩戴手套、使用具有气溶胶屏障的移液管移液、使用无核酸酶的实验室器具和试剂以及对工作区域进行去污处理。

根据样本来源 (如血液、组织、细胞、植物) 和实验目标，有多种RNA分离和纯化方法可供选择。分离工作流程的主要目标是稳定RNA分子、抑制RNA酶，并通过适当的储存和提取方法最大程度提高产量。理想的纯化方法可以去除干扰酶活性的内源性化合物，如植物组织中的复合多糖和腐殖酸，以及逆转录酶的常见抑制剂，如盐、金属离子、乙醇和苯酚。纯化的RNA应保存在-80°C，尽量减少反复冻融。

纯化后评估RNA质量和数量的方法有许多种。常用的方法是利用紫外光谱法检测特定波长的吸光度。RNA质量可通过利用Beer-Lambert定律测定260 nm处的吸光度而确定；不同波长的吸光度比值可以确定是否存在特定污染物 (表2.1.1)。请注意，紫外吸光度不是RNA特有的，所有核酸都可以吸收相近波长的紫外线。

对于需要更高RNA特异和更灵敏分析的RNA，可以考虑使用含染料的荧光试剂，这种试剂只在与目标分子特异性结合时才会释放荧光信号。如三种具有不同检测范围的Qubit RNA定量试剂盒 (HS-高灵敏，BR-宽检测范围，XR-扩展范围) 和一种microRNA 检测试剂盒，可搭配Qubit荧光计使用，3秒即可获得准确定量的RNA检测结果。RNA检测试剂可准确测定初始浓度为250pg/μL至10,000ng/μL的样品。相比dsDNA，这些试剂盒对于RNA有高度选择性，即便样品中存在DNA，也无需依赖DNase来进行准确检测。

表2.1.1 RNA分析的紫外检测指南

吸光度	表明存在:	目标比值
230 nm	有机化合物, 糖, 尿素, 盐	$A_{260}/A_{230} > 1.8$
260 nm	所有核酸	$A_{260} \approx 0.1-1.0$
270 nm	苯酚	$A_{260}/A_{270} > 1.0$
280 nm	蛋白质	RNA: $A_{260}/A_{280} \approx 2.0$ DNA: $A_{260}/A_{280} \approx 1.8$
330 nm	光散射	$A_{330} = 0$

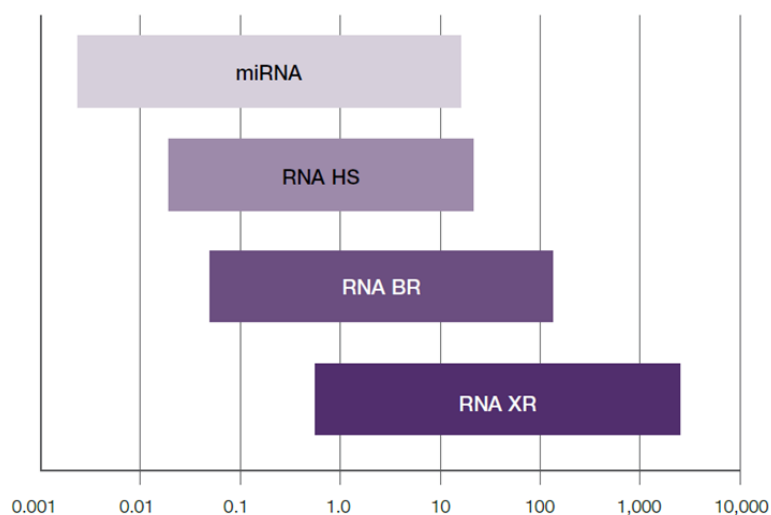


图2.1.1 Qubit RNA检测试剂盒的定量范围。样品浓度 (ng/μL)，样品体积范围 (1–20μL)

仪器	包装	货号
Qubit 4荧光计 (带Wi-Fi)	1台	Q33238
Qubit Flex 荧光计	1台	Q33327

名称	初始样品浓度	定量范围	反应次数	货号
Qubit RNA HS检测试剂盒	250 pg/μL and 100 ng/μL	5–100 ng	100	Q32852
			500	Q32855
Qubit RNA BR检测试剂盒	1 ng/μL to 1 μg/μL	20–1,000 ng	100	Q10210
			500	Q10211
Qubit RNA XR检测试剂盒	10 ng/μL and 10,000 ng/μL	200–10,000 ng	100	Q33223
			500	Q33224
Qubit microRNA检测试剂盒	50 ng/mL to 100 μg/mL	1–1,000 ng	100	Q32880
			500	Q32881

以28S和18S核糖体RNA (rRNA) 的比值代表总RNA，可评估RNA的完整性。总RNA经过变性，并利用凝胶电泳按照分子量大小进行分离，可对其进行定性评估，评估28S rRNA与18S rRNA的强度比，比值为2:1代表完整的RNA (图2.1.2A)。Agilent Technologies开发了一种结合微流体学和专利算法的方法，可定量评估RNA的完整性。该方法可产生称为RNA完整性分数 (RIN) 的读数，数值介于8至10之间代表高质量的RNA (图2.1.2B)。

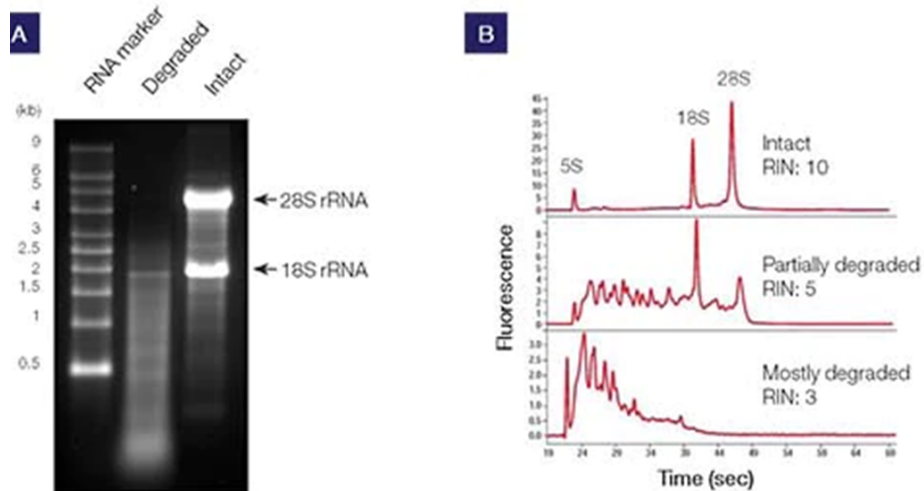


图2.1.2 利用 (A) 凝胶电泳和 (B) 微流体力学方法进行RNA完整性分析

Qubit RNA IQ检测试剂盒可快速评估RNA样品的质量和完整性。此试剂盒利用两种独特的染料：一种染料可与大的、完整的和结构化的RNA结合，另一种染料可选择性地与小的、降解的RNA结合。结合使用两种染料，便可对RNA样品的质量和完整性进行快速评估。使用过程中，仅需将样品加入到Qubit RNA IQ工作溶液中，即可在Qubit 4或Qubit Flex 荧光计上完成检测。

检测结果将以RNA样本完整性和质量的总值或RNA IQ数值表示，并计算样品中大分子RNA和小分子RNA的百分比。RNA IQ数值为1至10，其中数值越大表示样品主要由大分子RNA或结构化RNA组成，而数值小则表明样品主要由小分子RNA组成，或可能含有少量结构化RNA。



图2.1.3 Qubit 检测RNA质量和完整性

**2.1.2 基因组DNA去除** 有些情况下,痕量基因组DNA (gDNA) 可能与RNA共同被纯化。gDNA污染可能会干扰逆转录,并导致RT-qPCR等灵敏性应用出现假阳性、高背景或检测率降低等问题。

为去除gDNA,通常在RNA分离过程中加入DNase I。在进行RT-PCR之前,必须完全去除DNase I,因为任何残留的酶都会使单链DNA (如引物和合成的cDNA) 降解,传统的DNase I失活或去除步骤 (如经EDTA处理或加热处理),由于孵育时间长、灭活温度高,可能会导致RNA降解或损失。

作为DNase I的替代品,可使用双链特异性DNase,如Invitrogen™ ezDNase™ (货号: 11766051) 去除gDNA污染,而不影响RNA或单链DNA。其热分解性质使其在相对温和的温度 (如55°C) 下即可失活,同时没有负面影响。在逆转录反应之前,只需将这种双链特异性热分解DNase与RNA在37°C下孵育2分钟,从而极大简化实验流程 (图2.1.4)。

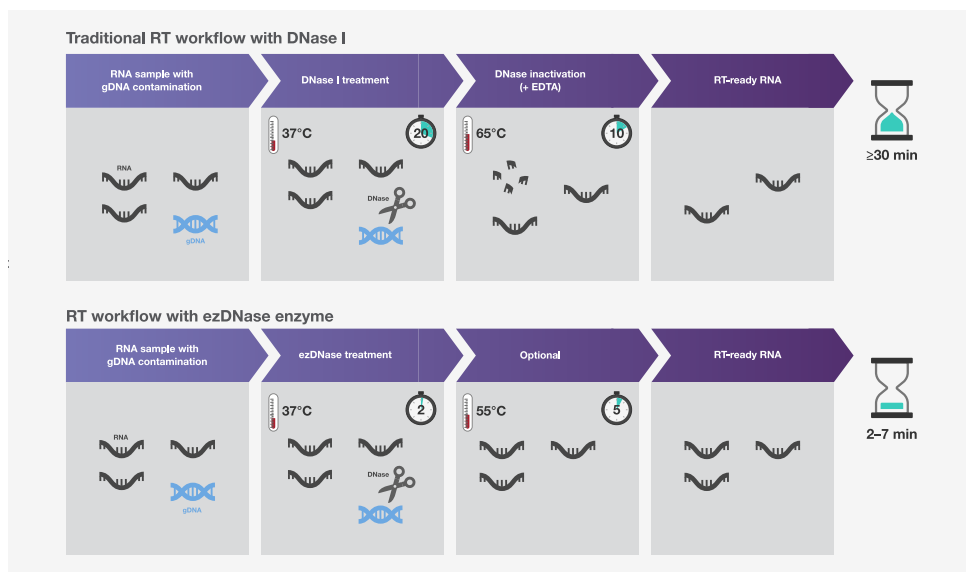


图2.1.4 gDNA去除步骤: DNase I与Invitrogen ezDNase 酶

**2.1.3 选择引物** 为了启动逆转录,逆转录酶需要一种短DNA寡核苷酸 (即引物),在RNA模板上与其互补序列结合,并作为新链合成的起点。根据RNA模板和下游应用,有三种基本类型的引物可供选用: oligo(dT)引物、随机引物和基因特异性引物 (图2.1.5)。



图2.1.5 逆转录中的常用引物

- Oligo(dT)引物由12-18个脱氧胸腺嘧啶核苷酸组成，与仅占总RNA中1-5%的mRNA poly(A)尾部退火。这些引物是从真核mRNA构建cDNA文库、全长cDNA克隆和cDNA 3'末端快速扩增(3' RACE)的最佳选择。由于oligo(dT)引物对poly(A)尾部的特异性，它们不适用于降解的RNA，如来自福尔马林固定石蜡包埋 (FFPE) 样品的RNA，也不适用于缺少poly(A)尾部的RNA，如原核RNA和miRNA。
- 由于cDNA合成开始于3' poly(A)尾部，oligo(dT)引物可能引起3'末端偏差。具有明显二级结构的RNA也可能影响全长cDNA合成，导致5'末端的丰度降低。通过修饰oligo(dT)引物，可以提高逆转录效率。例如，oligo(dT)引物的长度可以延伸到20个核苷酸或更长，使其可在较高温度的逆转录反应中退火。在一些情况下，oligo(dT)引物可能包括3'末端的多义碱基，如dN (dA, dT, dG或dC) 和dV (dG, dA或dC)。该修饰可防止poly(A)滑移，并且将起始位点锁定在poly(A)尾部的上游位置。这些引物被称为锚定oligo(dT)。
- 随机引物是具有随机碱基序列的寡核苷酸。它们通常由6个核苷酸组成，被称为随机六聚体、N6或dN6。由于随机引物的随机结合（即没有模板特异性），其可以退火到样品中的任何RNA种类。因此，这些引物被认为可以用于无poly(A)尾部结构的RNA（如rRNA、tRNA、非编码RNA、miRNA、原核mRNA）、或者降解的RNA（如，来自FFPE组织的RNA）和具有已知二级结构的RNA（如，病毒基因组）的逆转录。虽然随机引物有助于改善cDNA合成，但它们不适用于长RNA的全长逆转录。增加逆转录反应中的随机六聚体浓度，可提高cDNA产量，但同时也会增加相同模板上多个位点的结合，从而导致cDNA片段较短。

此外，仅使用随机引物可能不适用于某些RT-PCR应用，比如可能引起对mRNA拷贝

数的过高估计。两步法RT-PCR经常使用oligo(dT)和随机引物的混合物，从而保障所有引物类型的效果。在miRNA表达测定中，随机六聚体并不适用，必须为miRNA的逆转录设计特殊引物。

- 基因特异性引物可提供特异性最强的逆转录引物配对。这些引物是根据目标RNA的已知序列进行设计的。由于引物与特异性RNA序列结合，每个目标RNA都需要一套新的基因特异性引物。因此，对多种目标RNA的分析需要使用更多的引物。基因特异性引物通常可用于一步RT-PCR应用。

表2.1.2 常用逆转录引物的对比

	oligo(dT)	随机六聚体	oligo(dT)+ 随机六聚体	基因特异性引物
<b>标准终浓度</b>	2-5 $\mu\text{M}$	2-5 $\mu\text{M}$	每个1-2 $\mu\text{M}$	0.5-1 $\mu\text{M}$
<b>在25°C预先引物延伸</b>	-	√	√	-
<b>主要优势</b>	具有poly(A)尾部的RNA的全长逆转录	大多数RNA种类的逆转录，包括降解RNA	oligo(dT)和随机引物的综合优势	目标基因的特异性逆转录

**2.1.4 进行逆转录** 逆转录反应包含三个主要步骤：引物退火、DNA聚合和酶失活（图2.1.6）。这些步骤的温度和持续时间因所选择的引物、目标RNA和使用的逆转录酶不同而异。

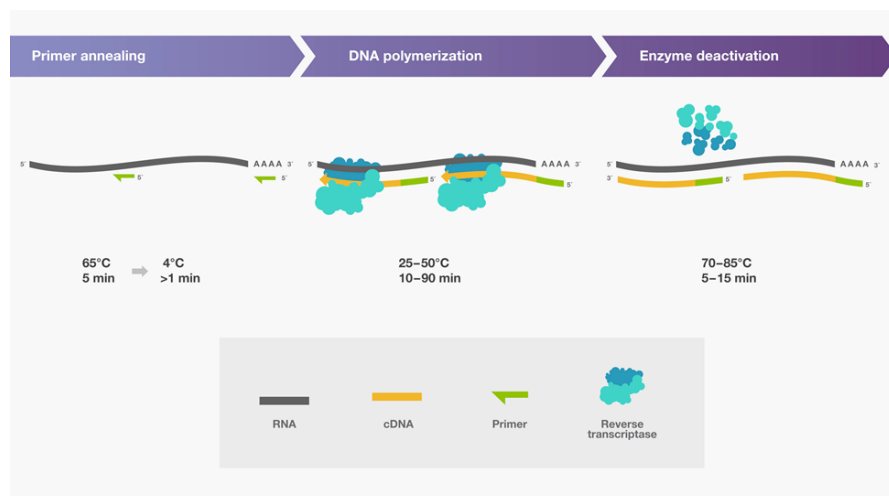


图2.1.6 cDNA合成的三个主要步骤。

- 2.1.5 基因组DNA去除**
- **引物退火:** 将引物与RNA模板混合, 加热至65°C并维持5分钟, 然后冰浴至少1分钟。这有助于确保RNA保持单链以及引物与靶标有效退火。退火后, 加入逆转录酶和必需组分(如缓冲液、dNTPs、RNA酶抑制剂)。
  - **DNA聚合:** 在此步骤中, 反应温度和持续时间可能会根据引物选择和所用的逆转录酶而变化。使用oligo(dT)引物( $T_m$  35-50°C), 可以在逆转录酶的最佳反应温度(37-50°C)下直接孵育反应。随机六聚体因其较短的长度, 通常具有较低的 $T_m$ (10-15°C)。因此, 当使用随机六聚体(单独或与oligo(dT)组合)时, 我们建议在加入酶后, 在室温(25°C)孵育逆转录反应10分钟以延伸引物。

逆转录酶的热稳定性各不相同, 而热稳定性决定了每种酶的最佳聚合温度。使用热稳定的逆转录酶, 可达到更高的反应温度(如50°C), 有助于富含GC或具有二级结构的RNA变性, 同时不影响酶活性。使用这种酶, 可通过高温孵育提高cDNA的产量、长度和丰度。聚合时间取决于逆转录酶的持续合成能力, 即单次聚合过程中掺入的核苷酸数量。例如, 持续合成能力较低的野生型MMLV逆转录酶通常需要60多分钟才能完成cDNA合成, 持续合成能力较高的改良型逆转录酶可能只需要10分钟, 就可以合成长达12 kb的cDNA。例如, Invitrogen SuperScript™ IV 逆转录酶(货号: 18090050), 是一种专有 MMLV 突变体, 在抑制剂耐受性、持续合成能力和反应速度等方面均得到了大幅提高, 同时保留了上一代酶的所有优点, 包括较高的热稳定性、高效全长cDNA合成能力及较低的RNase H活性, 孵育时间从 >50 分钟缩短至 10 分钟。

- **酶失活:** 逆转录反应的最后一步是使逆转录酶失活。失活温度范围为70-85°C, 具体取决于酶的热稳定性。失活通常需要5-15分钟, 温度越高, 所需时间越短。

## 2.2 常见逆转录酶及性质

---

逆转录酶是从RNA模板合成互补DNA(cDNA)链过程中的关键试剂。因此, 深入地了解这些酶的性质及其对逆转录的影响, 对分子生物学实验的成功至关重要。

- 2.2.1 DNA聚合酶活性**
- 逆转录酶是由具有不同生化活性的结构酶组成。尽管不同生物体来源的逆转录酶功能存在或多或少的差异, 包括如DNA依赖性的DNA聚合酶活性, 但逆转录酶的主要功能仍取决于RNA依赖性的DNA聚合酶活性和RNase H酶活性。如图2.2.1所示, 逆转录过程通常涉及许多步骤:

- 1) 在存在退火引物的条件下, 逆转录酶结合到RNA模板并引发反应
- 2) RNA依赖性的DNA聚合酶活性通过掺入dNTPs合成cDNA
- 3) RNase H活性降解DNA:RNA杂合链中的RNA模板
- 4) DNA依赖性的DNA聚合酶活性(如果存在)识别单链cDNA作为模板, 使用RNA片段作为引物, 合成第二链cDNA
- 5) 形成双链cDNA

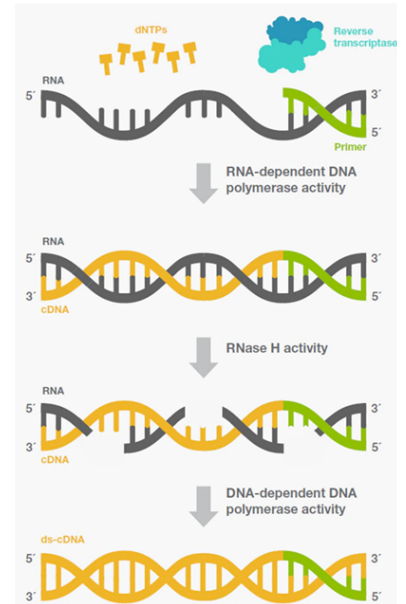


图2.2.1 逆转录过程

**2.2.2 RNase H活性** 逆转录酶的一个内在固有特性是RNase H活性。后者可以在合成过程中同时切割RNA:cDNA杂合链中的RNA模板(图2.2.2)。由于RNA模板在全长逆转录完成之前可能被降解, 所以RNase H活性是长片段cDNA合成过程中需要规避的因素。RNase H活性还可能降低逆转录效率, 这可能是因为其会与逆转录酶中的活性聚合酶发生竞争。

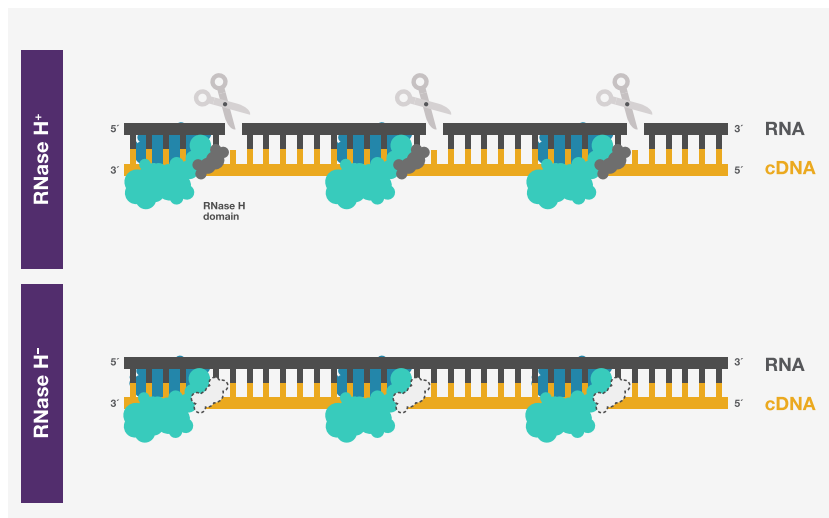
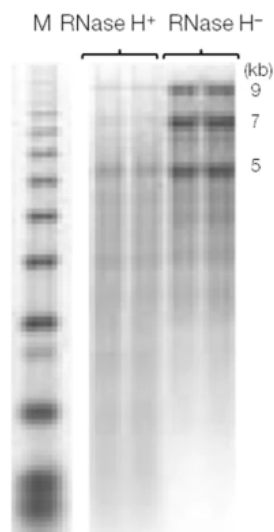


图2.2.2 cDNA合成过程中逆转录酶中的RNase H活性

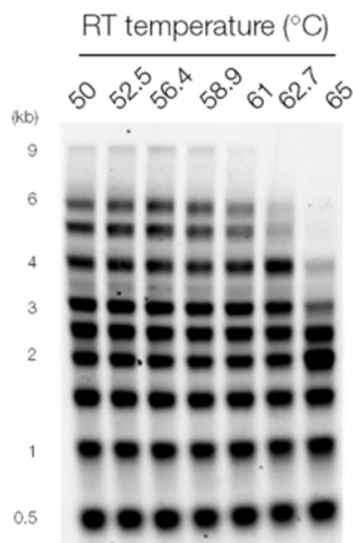
为了更好地合成cDNA, 通过在逆转录酶的RNase H结构域中引入突变, 逆转录酶的RNase H活性降低甚至完全消除。这种突变常常可以增加长链cDNAs的产量, 促进其合成(图2.2.3)。



**图2.2.3 RNase H活性对cDNA合成的影响。**使用具有或不具有RNase H活性的逆转录酶, 在相同反应条件下, 逆转录9.5 kb、7.5 kb和5.2kb的mRNA。结果表明, 无RNase H活性的逆转录酶可更高效地产生全长cDNA。M =标准长度DNA。

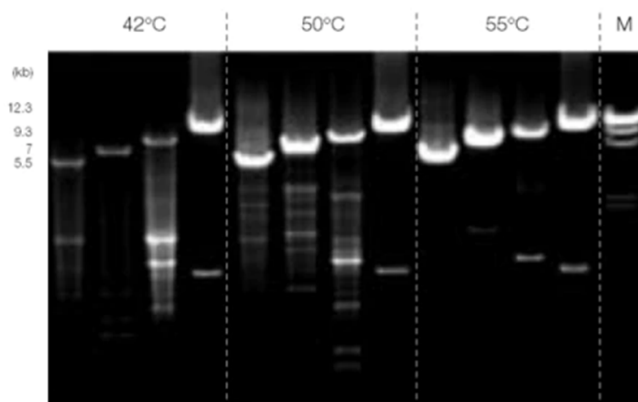
**2.2.3 热稳定性** 逆转录酶耐受高温的能力是cDNA合成的重要影响因素。提高反应温度有助于使具有复杂二级结构或高GC含量的RNA变性, 使得逆转录酶能够顺利读取序列。因此, 在较高反应温度下的逆转录能够实现全长cDNA合成, 产量更高, 进而使RNA能够更好地逆转录为cDNA。

与野生型MMLV逆转录酶相比, 野生型AMV逆转录酶表现出更高的热稳定性——二者最适宜的温度分别为37°C和42-48°C。一些经过基因工程改造的MMLV逆转录酶可以耐受55°C的高温, 但逆转录效率没有明显的改变(图2.2.4)。这种高度耐热的逆转录酶特别适用于从富含GC的RNA模板合成cDNA。



**图2.2.4 不同反应温度下的逆转录过程。**使用高度耐热、经过基因工程改造的MMLV逆转录酶，在不同温度下逆转录不同长度的RNA模板。通过NaOH处理除去RNA模板，利用变性琼脂糖凝胶电泳分析得到的cDNA，并用Invitrogen™ SYBR™ Gold核酸凝胶染色剂染色反应产物。结果表明，即使在56.4℃下，热稳定性酶依然具有100%活性。

在使用基因特异性引物的一步法RT-PCR中，使用较高温进行逆转录反应，可以提高引物与目标基因结合的特异性。该策略可以在随后的PCR中增加产量和降低背景干扰（图2.2.5），使用热稳定性的逆转录酶更适合cDNA合成。



**图2.2.5 高反应温度下的逆转录增强了PCR特异性。**使用oligo(dT)<sub>20</sub> (12.3kb mRNA) 或基因特异性引物 (9.3kb, 7kb和5.5kb mRNA) 在更高温度下逆转录四种不同基因的mRNA。在55℃反应温度下的逆转录，RT-PCR中的目标片段产生更高的特异性。

### 2.2.4 持续合成能力

逆转录酶的合成能力是指可结合到酶单一结合位点中的核苷酸数目。因此，合成能力高的逆转录酶可以在更短的反应时间内合成更长的cDNA链（图2.2.6）。一些基因工程改造的MMLV逆转录酶（如 Invitrogen SuperScript IV逆转录酶）在单个结合位点中可以结合多达1,500个核苷酸，结合能力大概是野生型MMLV逆转录酶的65倍。

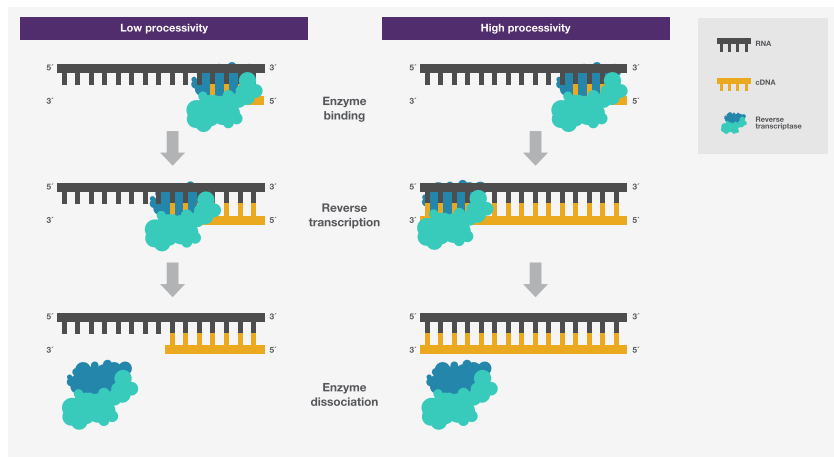


图2.2.6 逆转录酶的合成能力可以影响cDNA合成长度

酶合成能力也与其对模板的亲合力有关。因此，具有高合成能力的逆转录酶对来源于RNA样本中的常见抑制剂具有耐受性。逆转录酶的抑制剂包括来自血液和粪便的肝素和胆汁盐，来自土壤和植物的腐殖酸和多酚，以及来自福尔马林固定和石蜡包埋（FFPE）样品的福尔马林和石蜡。这些抑制剂通常与RNA结合降低合成活性，高合成能力的逆转录酶能够更好地克服这种抑制（图2.2.7）。

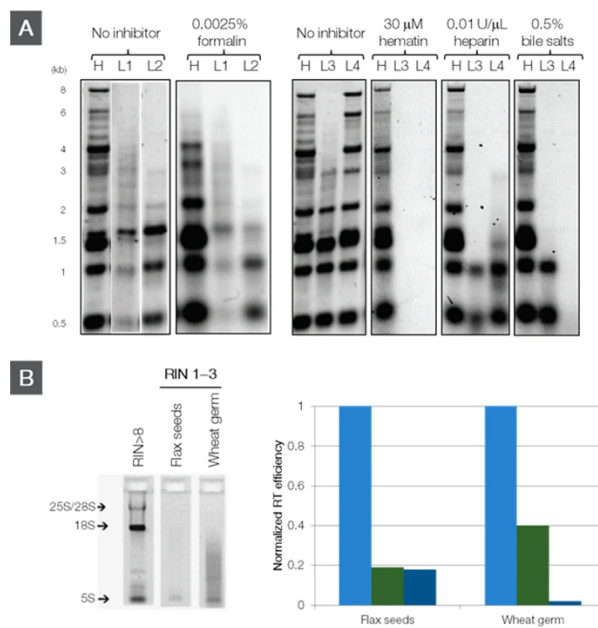


图2.2.7 对于含抑制剂的RNA样品或降解的RNA样品，使用具有高合成能力的逆转录酶进行cDNA合成的结果。(A) 使用含常见酶抑制剂（如来自FFPE样品的福尔马林，来自血液的血红蛋白和肝素，来自血液和粪便的胆汁盐）的RNA进行逆转录。使用含Invitrogen™ SYBR™ Gold核酸染料的碱性凝胶进行电泳，分析合成的cDNA。具有高合成能力(H)的逆转录酶比低合成能力酶(L1-L4)的cDNA合成效率更高。(B) 通过凝胶电泳评价从不同植物来源中纯化的总RNA。高质量RNA(RIN>8)显示不同的rRNA条带，而降解的RNA(RIN 1-3)主要由弥散或较小的RNA片段组成。使用具有高合成能力的逆转录酶(H)或低合成能力(L3, L4)的逆转录酶将已降解的RNA在随机六聚体引物介导下进行逆转录。用所得的cDNA进行qPCR获得特定的目标基因。通过将Ct值与具有高持续合成能力的逆转录酶的Ct值进行标准化来确定逆转录效率。H = 高合成能力, L = 低合成能力, RIN = RNA完整性数。

**2.2.5 保真度** 逆转录酶的保真度指的是RNA逆转录为DNA过程中的序列精确度。保真度与逆转录错误率成反比。据报道, 基于MMLV的逆转录酶错误率大概在合成15,000到27,000个核苷酸中有一个错误核苷酸, 而AMV逆转录酶表现出更高的错误率。

逆转录酶的保真度可能在RNA测序等需要高度序列准确度的情况下发挥重要作用。对于其它大多数情况, 逆转录中引入的错误数量可以忽略不计, 主要原因有两个: 大多数基因短于10 kb; 逆转录过程不会放大cDNA中的错误。

**2.2.6 末端转移酶 (TdT) 活性** 逆转录酶可表现出末端核苷酸转移酶 (TdT) 活性, 其可向合成的DNA 3' 末端非模板特异性地添加核苷酸。TdT活性仅在逆转录酶接触到RNA模板5' 末端才会表现出来, 此时其会向cDNA末端添加1-3个额外的核苷酸, 并且对双链核酸底物 (如第一链cDNA合成中的DNA:DNA和第二链cDNA合成中的DNA:DNA) 表现出特异性。通常来说, 这种内在活性是逆转录过程所不需要的, 因为加入的核苷酸与模板不匹配。非模板特异性核苷酸加入顺序通常为A>G>C>T。

不同的逆转录酶具有不同的内在TdT活性。使用野生型MMLV和AMV逆转录酶, 25-90%的合成DNA链可能在3' 端具有额外添加的核苷酸。另一方面, 经过基因改造的MMLV逆转录酶表现出较低的内在TdT活性。除逆转录酶外, 核苷酸掺入速率还取决于反应条件, 如RNA与酶的比例、酶量、孵育时间和反应温度。

对于一些特定应用, 如全长cDNA克隆, cDNA末端快速扩增 (RACE) 和RNA测序 (RNA-Seq), 逆转录酶可被诱导特异性地向cDNA的3' 末端加入一系列Cs。在高浓度镁或锰离子条件下的cDNA合成中, 这种类型的TdT活性会被触发。结合经特殊设计的具有3' Gs的DNA寡核苷酸 (又称链置换引物), TdT活性可以特异性地修饰3' cDNA末端和5' RNA末端 (图2.2.8)。这些序列修饰的应用实例包括引入用于后续cDNA克隆的限制性酶切位点或用于下游RNA测序的接头添加。



图2.2.8 通过逆转录酶引入非模板依赖性核苷酸对3' cDNA末端进行修饰

## 2.3 常见问题及解决建议

通过逆转录生成RNA的互补DNA (cDNA)，而cDNA可作为RNA研究中一系列下游实验应用的模板。因此，发现并避免cDNA合成过程中的潜在问题，对于保证实验结果的有效性至关重要。本节疑难解答提示适用于绝大多数常见的逆转录应用，尤其是RT-PCR或RT-(q)PCR。

### 2.3.1 RT-(q)PCR扩增量低或未扩增

表2.3.1 RT-(q)PCR扩增量低或未扩增

可能的原因	建议
RNA完整性低	<ul style="list-style-type: none"><li>• 合成cDNA前，通过凝胶电泳或微流控芯片技术对RNA完整性进行评估。</li><li>• 尽量减少RNA样品反复冻融的次数，以防止降解。</li><li>• 遵守实验室的操作惯例，以避免RNase污染。</li><li>• 在建立逆转录反应时加入RNase抑制剂。</li><li>• 使用确认无核酸酶或经DEPC (焦碳酸二乙酯) 处理过的水，以确保不含RNase。</li><li>• 将RNA存储于EDTA缓冲溶液 (0.1 mM EDTA, 或10 mM Tris + 1mM EDTA) 中，以尽量减小由具有金属离子辅酶因子的核酸酶造成的非特异性降解。</li><li>• 选择对RNA完整性的影响最小的gDNA去除方案。</li><li>• 考虑使用对降解RNA样品也可高效进行cDNA合成的逆转录酶。</li><li>• 考虑检测RNase, 如使用RNaseAlert™ (货号: 4479768) 检测实验环境, 或实验用品中是否有RNase污染。</li></ul>
RNA纯度低	<ul style="list-style-type: none"><li>• 遵循特定来源 (组织、血液和植物) 样品RNA纯化方案。</li><li>• 通过UV光谱法, 读取一定波长范围的吸光度, 评估RNA的纯度。</li><li>• 检查RNA提取步骤。避免超过样本的推荐用量, 使样品充分裂解并尽量减少抑制剂残留。确保洗涤步骤正确, 以除去杂质和抑制剂。</li><li>• 如有必要, 在无核酸酶水中稀释起始RNA, 以降低潜在的抑制剂浓度。</li><li>• 如有必要, 重新纯化RNA样品, 以除去残留的盐和抑制剂。</li><li>• 考虑使用耐受盐、残留生物抑制剂和提取试剂的抑制效应的逆转录酶。</li></ul>
GC含量高或含有复杂二级结构	<ul style="list-style-type: none"><li>• 在逆转录之前, 在65°C加热RNA 5min, 使二级结构变性, 然后在冰上迅速冷却。</li><li>• 在较高的温度下 (例如50°C) 进行逆转录, 最大程度降低发夹序列形成的可能。</li><li>• 使用能够承受高反应温度的热稳定逆转录酶。</li></ul>

低RNA量	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 检查起始RNA的推荐用量方案。通过紫外光谱确定RNA量。为获得更高精度和特异性,可考虑选择基于荧光定量的方法,如Qubit荧光计。</li> <li>• 选择对RNA完整性影响最小的gDNA去除方案。</li> <li>• 使用高效率、高灵敏度的逆转录酶,以便对低丰度RNA进行高效cDNA合成。</li> <li>• 选择在宽起始RNA量范围内可获得高线性度的逆转录试剂,以确保可以准确定量低丰度RNA。</li> </ul>
不理想的逆转录酶	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 为了提高cDNA的得率,选择具有更高灵敏度、更强持续合成能力、和耐受抑制剂的高效逆转录酶。高效逆转录酶非常适合于具有挑战性的RNA样品,如已降解或含抑制剂的样品。</li> <li>• 对于需要较短反应时间和较高反应温度的实验,分别使用具有高持续合成能力和高热稳定性的逆转录酶。</li> </ul>
逆转录未达到理想时间和温度	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 确保反应时间和温度适合于所选的逆转录酶。</li> </ul>
不正确的引物设计	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 针对特定的RNA模板,查看关于逆转录引物类型的建议。例如对于细菌RNA或缺乏poly(A)尾的RNA,以及可能降解的RNA,使用随机引物代替oligo(dT)引物。</li> <li>• 对于基因特异性的引物,确保引物的序列与靶序列的3'端互补。</li> </ul>
反应组分的质量(或稳定性)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 遵循制造商的建议存储和使用试剂。</li> <li>• 确保使用的试剂为新鲜配制,并适于所选择的逆转录酶。</li> <li>• 确保DTT和盐在混合的反应体系中保持完全溶解的状态。</li> </ul>

2.3.2 RT-(q)PCR非特异性扩增 表2.3.2 RT-(q)PCR非特异性扩增

可能的原因	建议
基因组DNA (gDNA) 污染	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 通过PCR检查gDNA污染,使用没有逆转录酶的对照反应(减量RT或无RT对照)。</li> <li>• 在逆转录前用DNase处理RNA样本,尽量选用可能降低RNA非特异性降解的gDNA去除步骤。</li> </ul>
有问题的引物设计	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 如果使用基因特异性引物,回顾引物设计的建议。验证引物的结合位点针对于目的基因的特异性。</li> <li>• 在较高的温度下进行逆转录,有助于提高引物结合的特异性,并使用热稳定逆转录酶。</li> <li>• 在构建(q)PCR时,选择跨越外显子-外显子接点的PCR引物,以使cDNA特异性扩增。</li> </ul>

2.3.3 cDNA截短 表2.3.3 cDNA截短

可能的原因	建议
RNA完整性低	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 合成cDNA前, 通过凝胶电泳或微流控芯片技术对RNA完整性进行评估。</li> <li>• 尽量减少RNA样品反复冻融的次数, 以防止降解。</li> <li>• 遵守实验室的操作惯例, 以避免RNase污染。</li> <li>• 在构建逆转录反应时加入RNase抑制剂。</li> <li>• 使用确认无核酸酶或DEPC(焦碳酸二乙酯)处理过的水, 以确保去除RNase。</li> <li>• 将RNA存储于EDTA经缓冲溶液(0.1 mM EDTA, 或10 mM Tris + 1mM EDTA)中, 以尽量减小由具有金属离子辅酶因子的核酸酶造成的非特异性降解。</li> <li>• 选择对RNA完整性的影响最小的基因组DNA去除方案。</li> <li>• 选择对已降解RNA样品也能进行高效cDNA合成的逆转录酶。</li> </ul>
存在逆转录酶抑制剂	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 遵循针对特定来源的RNA纯化方案, 比如组织、血液和植物。</li> <li>• 通过UV光谱法, 读取一定范围的波长的吸光度来评估RNA的纯度。</li> <li>• 检查RNA提取步骤。避免加入超过推荐用量的样本, 使得样品充分裂解并尽量减少抑制剂残留。确保洗涤步骤正确, 以除去抑制剂。</li> <li>• 如有必要, 重新纯化RNA样本以去除残留的盐和抑制剂。</li> <li>• 如有必要, 在无核酸酶水中稀释起始RNA, 以降低潜在的抑制剂的浓度。</li> <li>• 对于盐、残留的生物抑制剂和提取试剂引起的抑制效应, 可考虑使用具有耐受作用的逆转录酶。</li> </ul>
高GC含量或具有复杂二级结构	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 在逆转录之前, 在65°C加热RNA 5 min, 使二级结构变性, 然后在冰上迅速冷却。</li> <li>• 在较高的温度下(例如50°C)进行逆转录, 最大限度降低发夹序列形成的可能。</li> <li>• 使用能够承受高反应温度的高热稳定性逆转录酶。</li> </ul>
有问题的引物	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 如果使用基因特异性引物, 验证引物的结合位点靶向目的基因的唯一性。</li> <li>• 尽可能使用oligo(dT)引物进行全长cDNA的合成。</li> <li>• 对于可能降解的RNA, 为了进行最有效的逆转录, 可考虑随机引物。</li> <li>• 当使用随机引物时, 优化引物浓度以获得长cDNA片段, 同时保持高得率。</li> </ul>

不理想的逆转录酶	<ul style="list-style-type: none"> <li>选择能够合成长cDNA的逆转录酶。这种类型的逆转录酶常表现出低RNase H活性、高持续合成能力以及对抑制剂的高耐受性。</li> </ul>
----------	--

### 2.3.4 cDNA pool覆盖率低 表2.3.4 cDNA pool覆盖率低

可能的原因	建议
RNA丰度低	<ul style="list-style-type: none"> <li>使用能以最小偏差减少多余的RNA (比如核糖体RNA) 并富集目的RNA (比如poly(A)尾富集mRNA) 的RNA分离方法。</li> </ul>
RNA完整性低	<ul style="list-style-type: none"> <li>合成cDNA前, 通过凝胶电泳或微流控芯片技术对RNA完整性进行评估。</li> <li>尽量减少RNA样品反复冻融的次数, 以防止降解。</li> <li>遵守实验室的操作惯例, 以避免RNase污染。</li> <li>在构建逆转录反应时加入RNase抑制剂。</li> <li>使用确认无核酸酶或DEPC (焦碳酸二乙酯) 处理过的水, 以确保去除RNase。</li> <li>将RNA存储于EDTA缓冲溶液 (0.1 mM EDTA, 或10 mM Tris + 1mM EDTA) 中, 以尽量减小由具有金属离子辅酶因子的核酸酶造成的非特异性降解。</li> <li>选择对RNA完整性的影响最小的基因组DNA去除方案。</li> <li>考虑能高效处理已降解RNA样品的逆转录酶。</li> </ul>
RNA纯度低	<ul style="list-style-type: none"> <li>遵循针对特定来源 (如组织、血液和植物) 样品RNA的纯化方案。</li> <li>通过UV光谱法读取一定波长范围的吸光度, 评估RNA的纯度。</li> <li>检查RNA提取步骤。避免超过推荐用量的样本, 使得样品充分裂解并尽量减少抑制剂残留。确保洗涤步骤正确, 以除去杂质和抑制剂。</li> <li>如有必要, 重新纯化RNA样品, 以除去残留的盐和抑制剂。</li> <li>选择使用可耐受盐、残留的生物抑制剂和提取试剂引起的抑制效应的逆转录酶。</li> </ul>
高GC含量或含有复杂二级结构	<ul style="list-style-type: none"> <li>在逆转录之前, 在65°C加热RNA 5 min, 使二级结构变性, 然后在冰上迅速冷却。</li> <li>在较高的温度下 (例如50°C) 进行逆转录, 最大限度减少发夹序列形成的可能。</li> <li>使用能够承受高反应温度的热稳定逆转录酶。</li> </ul>
有问题的引物设计	<ul style="list-style-type: none"> <li>优化引物混合物和浓度 (例如, oligo(dT)和随机六聚体), 以减少偏差和增加对不同靶序列的检测效果。</li> <li>对于可能降解的RNA, 选择随机引物以确保适当的覆盖率。</li> </ul>
逆转录未达到理想时间和温度	<ul style="list-style-type: none"> <li>根据所选择的逆转录酶优化反应时间和温度。</li> </ul>

不理想的逆转录酶	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 选择具有更高灵敏度、更强持续合成能力和高热稳定性的高效逆转录酶。这些酶的性能可以检测低丰度RNA、长链转录本、降解样品及含有抑制剂的模板。</li> <li>• 对于需要较短反应时间和较高反应温度, 分别使用具有高持续合成能力和高热稳定性的逆转录酶。</li> </ul>
----------	---

2.3.5 cDNA测序错误 表2.3.5 cDNA测序错误

可能的原因	建议
不理想的逆转录酶	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 检查所用的逆转录酶的错误率或保真度。此外, 通过高质量的读长、配对末端测序及样本重复验证测序结果的可靠性。</li> </ul>
基因组DNA污染 (gDNA)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 进行没有逆转录酶的对照反应 (减少RT或无RT对照), 通过PCR检查gDNA污染。</li> <li>• 在逆转录前用DNase处理RNA样本。选择能最大限度减少RNA非特异性降解的gDNA去除步骤。</li> <li>• 如果PCR扩增的cDNA已测序, 选择跨越外显子-外显子接点的PCR引物, 以使cDNA特异性扩增。</li> </ul>

# 3 应用

## 3.1 逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR)

**3.1.1 RT-PCR** 在RT-PCR中, 通过逆转录 (RT) 将RNA转化为cDNA, 然后通过聚合酶链式反应 (PCR) 扩增cDNA (图3.1.1)。即便RNA样本数量有限或低丰度表达, 利用cDNA扩增步骤, 有望对初始RNA进行进一步研究。RT-PCR的常见应用包括表达基因检测、转录本突变检测, 以及制备cDNA模板用于下游分子克隆和测序。

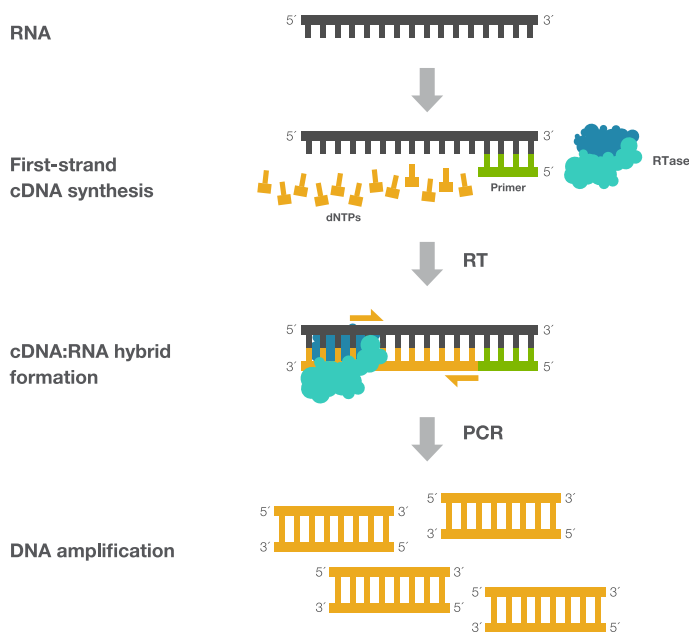


图3.1.1 逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR)

由于逆转录可为PCR扩增和下游实验提供cDNA模板, 因此, 它是实验成功的关键步骤之一。所选用的逆转录酶应具有高效cDNA合成能力, 即便针对复杂RNA样本, 如已降解、含抑制剂或具有高度二级结构的RNA样本。

一步法和两步法是两种最常用的RT-PCR方法, 每种方法都具有各自的优缺点 (图3.1.2)。顾名思义, 一步法RT-PCR在单个反应管中将第一链cDNA合成 (RT) 和后续PCR反应结合在一起。该反应设置可简化实验流程、减少结果差异, 并将污染的可能性降至最低。一步法RT-PCR简化了大量样本的操作, 适用于高通量应用。但是, 一步法RT-PCR使用基因特异性引物进行扩增, 将分析检测局限于每个RNA样本中的几个基因。由于反应需兼顾逆转录和扩增条件, 因此, 一步法RT-PCR在某些情况下可能具有较低的灵敏度和效率。但是, 在RT-PCR中使用基因特异性引物, 有助于最大化目标cDNA的得率, 并最小化扩增背景。

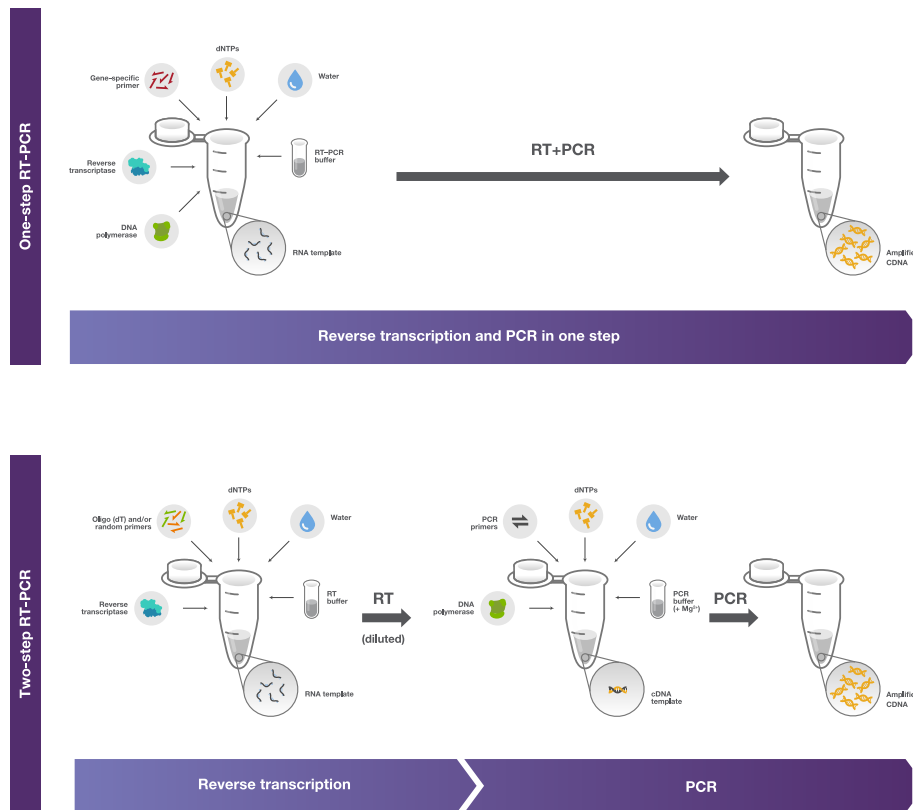
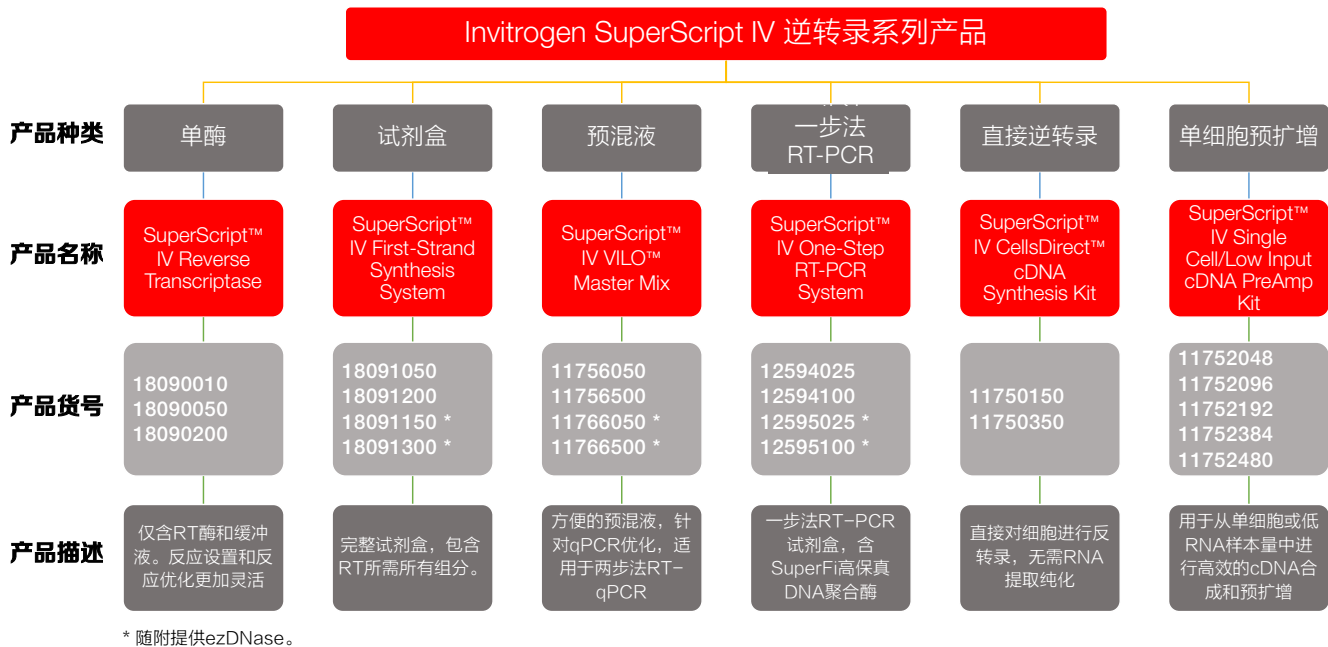


图3.1.2 一步法和两步法RT-PCR的比较

两步法RT-PCR包含两个独立反应，首先进行第一链cDNA合成 (RT)，然后在单个反应管中通过PCR扩增第一步中所得的cDNA。因此，两步法RT-PCR可用于检测单个RNA样本中的多个基因。RT和PCR反应独立进行，可对每个步骤的反应条件进行优化，使逆转录引物选择 (oligo(dT)引物、随机六聚体或基因特异性引物) 和PCR反应建立 (如DNA聚合酶选择和PCR组分) 更灵活。与一步法RT-PCR相比，两步法RT-PCR的缺点包括多个步骤延长了实验流程、增加样本处理和操作步骤以及提高污染和结果变异的可能性。

对于第一链 cDNA 合成, Thermo Fisher Scientific可提供多种优质产品, 以满足您的科研需求。您可以根据自己的实验应用, 选择最适合的逆转录酶、产品形式、引物和dNTP。借助Invitrogen SuperScript 高性能逆转录系列产品, 可从任意类型RNA模板中获得出色的 cDNA 合成结果。



### (1) 一步法RT-PCR实验方案

Invitrogen SuperScript IV 一步法RT-PCR系统 (货号: 12594100) 将SuperScript IV 逆转录酶的高持续合成能力和Platinum SuperFi DNA聚合酶的高保真性结合在一起，从而提供了出色的一步法RT-PCR性能。借助方便的一步法形式，可在同一反应管中同时进行cDNA合成和PCR扩增。

#### 实验方案:

以SuperScript IV One-Step RT-PCR System with ezDNase Enzyme (货号: 12595100) 为例:

1) 在冰上, 于0.2 mL无核酸酶的薄壁PCR管中配置10 μL gDNA 消化反应混合液:

组分	体积 (μL)
10X ezDNase Buffer	1
ezDNase Enzyme	1
Template RNA (0.01 pg to 1 μg total RNA)	varies
Nuclease-free Water	to 10

轻轻混匀并在37°C 孵育2分钟消化gDNA, 短暂离心后将离心管置于冰上。

2) 配置RT-PCR反应体系:

a. (选做) 对于长片段的RT-PCR产物 (>3 kb), 加入10 mM DTT, 并在55°C孵育5分钟。

b. 在包含RNA模板的反应管中配置50 μL RT-PCR反应体系, 轻轻混匀并确保所有组分皆在管子下方。若有必要可短暂离心。

组分	体积 (μL)
Template RNA (来自上一步骤)	10
2X Platinum™ SuperFi™ RT-PCR Master Mix	25
Forward primer (10 μM)	2.5
Reverse primer (10 μM)	2.5
SuperScript™ IV RT Mix	0.5
Nuclease-free water	to 50

3) 启动PCR热循环仪, 并执行如下程序:

步骤	温度	时间	循环数
逆转录	45–60°C	10分钟	1
逆转录失活/初始变性	98°C	2分钟	
扩增	98°C	10秒	35–40
	55–72°C	10秒	
	72°C	30秒/kb	
延伸	72°C	5分钟	1

## (2) 两步法RT-PCR实验方案

### 第一步, 第一链cDNA合成

SuperScript IV First-Strand Synthesis System with ezDNase Enzyme (货号: 18091300) 经优化用于从纯化的poly(A) mRNA或总RNA中合成第一链cDNA。试剂盒内包含 SuperScript IV 逆转录酶, 其为SuperScript家族最新一代产品, 即使对于复杂RNA样本, 也可进行出色的cDNA合成。SuperScript IV 第一链合成系统包含逆转录所需的所有组分, 组分单独包装可提供RT反应体系配制的灵活性。

### 实验方案:

i. (可选) 去除gDNA

1) 准备gDNA消化反应混合液: 对于实验组和No-RT对照组, 在置于冰上的无核酸酶的离心管中, 按下表准备10 μL 的gDNA 反应混合液:

组分	体积 (μL)
10x ezDNase Buffer	1
ezDNase Enzyme	1
Template RNA (1 pg to 2.5 μg total RNA)	up to 8
Nuclease-free water	to 10

- 2) 消化gDNA: 轻轻混匀并在37°C 孵育 2 分钟。
- 3) 使ezDNase 酶失活: 若RNA样品用于≥3 kb的RT-PCR, 将样本在10 mM DTT存在的情况下55°C孵育5分钟使酶失活。
- 4) 将反应置于冰浴中: 短暂离心后将离心管置于冰上。

ii. SuperScript IV 第一链cDNA 合成反应

1) 引物与模板RNA退火

- a. 在PCR反应管中将下列组分混合:

注: 考虑步骤1和2中列出的所有组分的体积, 以确定达最终反应体积所需加入的水量。

组分	体积 (μL)
50 μM oligo(dT) <sub>20</sub> primer, 50 ng/μL random hexamers, or 2 μM gene-specific reverse primer	1
10 mM dNTP mix (10 mM each)	1
Template RNA (10 pg–5 μg total RNA or 10 pg–500 ng mRNA)	up to 11
DEPC-treated water	to 13

- b. 混匀后短暂离心。
- c. 将RNA引物混合液65°C加热5 分钟, 并在冰上孵育至少1分钟。

2) 准备逆转录反应混合液

- a. 震荡并短暂离心 5× SSIV Buffer。
- b. 在反应管中加入以下组分:

组分	体积 (μL)
5× SSIV Buffer	4
100 mM DTT	1
Ribonuclease Inhibitor	1
SuperScript IV Reverse Transcriptase (200 U/μL)	1

- c. 盖上盖子后混匀, 并短暂离心。

3) 将已退火的RNA和逆转录反应混合液混匀将逆转录反应混合液加入已退火的RNA中。

4) 孵育反应

a. 若使用随机六聚体引物, 23°C孵育10 分钟, 接着进行步骤b;

若使用oligo(dT)<sub>20</sub>或者是基因特异型引物, 直接进行步骤b。

b. 50–55°C 孵育 10 分钟。

c. 80°C孵育10 分钟终止反应。

5) (选做) 去除RNA, 可加入1 μL *E. coli* RNase H, 并在37°C 孵育20 分钟

**注:** 扩增部分PCR 靶标 (>1 kb) 可能需要去除RNA。

6) PCR 扩增: 反应产物可立即用于PCR扩增或储存于–20°C。

**注:** 推荐逆转录反应 (cDNA) 应占总反应体积的10%。

## 第二步, PCR扩增

Invitrogen Platinum SuperFi II PCR 预混液 (货号: 12368010) 是含 Platinum SuperFi II DNA 聚合酶、Platinum SuperFi II 缓冲液和 dNTPs 的预混液, 用于方便快速地完成 PCR 扩增。Platinum SuperFi II DNA 聚合酶是一款校正读码 DNA 聚合酶, 将超高保真度与创新性 SuperFi II 缓冲液结合在一起, 可极大限度提高 PCR 在通用引物退火温度下的扩增成功率。它特别适用于需要高度序列准确性的克隆、诱变和其他应用。

### 实验方案:

i. 解冻试剂

1) 使用前充分解冻, 并振荡混匀。

ii. 制备反应液

1) 在PCR管中将下列组分混合:

**注:** 考虑列出的所有组分的体积, 以确定达最终反应体积所需加入的水量。

组分	最终浓度	20 $\mu$ L体系	50 $\mu$ L体系
2X Platinum SuperFi II PCR Master Mix	1X	10 $\mu$ L	25 $\mu$ L
Forward primer	0.5 $\mu$ M	X $\mu$ L	X $\mu$ L
Reverse primer	0.5 $\mu$ M	X $\mu$ L	X $\mu$ L
Template DNA	0.1–10 ng plasmid (5–100 ng genomic DNA)	X $\mu$ L	X $\mu$ L
Nuclease-free water	-	to 20 $\mu$ L	to 50 $\mu$ L

2) 盖上每个PCR管的盖子, 混匀并简单离心。

### iii. 设置孵育程序

1) 按照下面提供的三步方案或者两步方案设置PCR扩增的孵育程序:

#### a. 三步方案

循环步骤	温度	时间	循环次数
最初变性	98°C	30秒	1
变性	98°C	5-10秒	25-35
退火	60°C	15秒	
延伸	72°C	15-30秒/kb	
最终延伸	72°C	5分钟	1
	4°C	持续	-

#### b. 两步方案

循环步骤	温度	时间	循环次数
最初变性	98°C	30秒	1
变性	98°C	5-10秒	25-35
退火/延伸	72°C	15-30秒/kb	
最终延伸	72°C	5分钟	1
	4°C	持续	-

**注:** 关于循环条件的优化, 请参考产品说明书中的“优化策略”。

### iv. 凝胶电泳分析

1) 将loading buffer加入10  $\mu$ L的PCR产物中, 混合并短暂离心。

**注:** 在使用E-Gel™的时候, 为达到最佳分离状态, 请将样品稀释2-20倍。

2) 使用琼脂糖凝胶电泳分析样品。

3) PCR产品可立即进行下游应用或存储在-20°C。

### 3.1.2 定量RT-PCR

定量RT-PCR (RT-qPCR) 的最常见应用之一是通过细胞或组织处理 (如, 药物处理) 一段时间后, 对mRNA水平进行实时定量分析。RT-qPCR比RT-PCR的灵敏度更高, 因此, RT-qPCR也常用于检测样本中是否存在逆转录病毒 (RNA病毒)。与RT-PCR实验流程相似, RT-qPCR首先将RNA转化为cDNA, 然后进行PCR扩增。主要区别在于, RT-qPCR在扩增对数期通过荧光法测定扩增cDNA的水平。扩增水平是对RNA中初始靶标进行定量的基础。

RT-qPCR对基因表达定量的准确性在很大程度上取决于cDNA模板的质量和数量。因此, 逆转录对于RT-qPCR的成功至关重要。逆转录步骤应产生可代表初始RNA的cDNA产物。因此, 所选择的逆转录酶应该具有有效合成cDNA的能力, 即使是对低丰度基因以及次优质或难转录RNA样本 (即富含GC、存在抑制剂或降解RNA样本)。

除高效逆转录酶之外, 在选择逆转录反应试剂方面还需要考虑很多因素。首先, 在宽RNA起始量范围内, cDNA的动态范围或线性扩增是至关重要的。使cDNA得率与RNA起始量成正比, 可确保基因表达定量的准确性 (图3.1.3)。

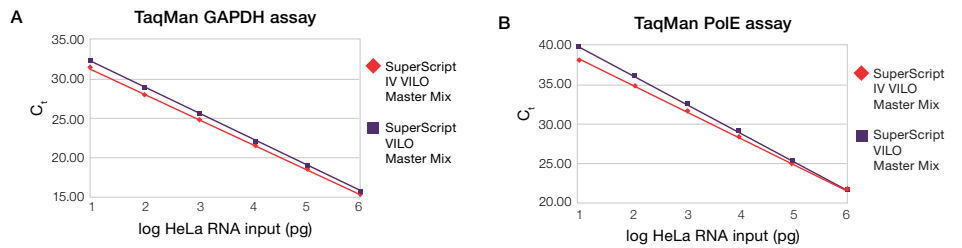


图3.1.3 针对一系列不同总RNA起始量, 使用逆转录预混液检测 (A) 高丰度和 (B) 低丰度RNA靶标的qPCR线性结果。

此外, 所选试剂在扩增过程中应产生较高且一致的cDNA得率, 以获得具有高灵敏度和低变异性的基因表达结果 (图3.1.4)。单管式预混液含有逆转录所需的所有必需组分, 有助于将实验变异、交叉污染和移液误差降至最低。

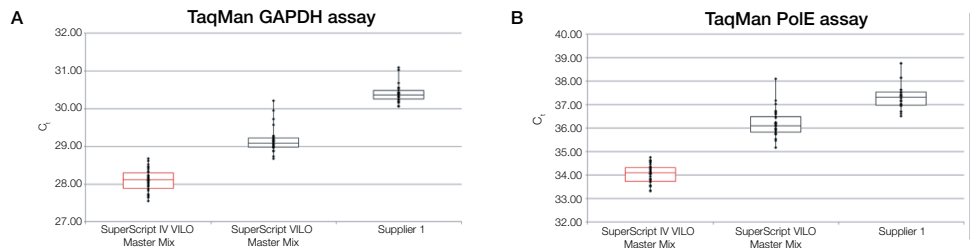


图3.1.4 使用不同逆转录预混液检测 (A) 高丰度和 (B) 低丰度RNA靶标所得qPCR结果的灵敏度和变异性。

Invitrogen SuperScript IV VILO预混液 (货号: 11756500) 是一种用于两步法RT-qPCR中第一链cDNA合成的预混液, 专为RT-qPCR而优化, 可在RT-qPCR反应中快速、灵敏且可重复性的进行cDNA合成。该预混液将经进一步优化的缓冲体系与具有更高合成能力且热稳定的SuperScript IV逆转录酶相结合, 从而将值得信赖的VILO技术 (适用于多种模板, 线性输出) 提升到了新的水平。

#### 实验方案:

以SuperScript IV VILO Master Mix with ezDNase enzyme (货号: 11766050) 为例:

- 1) 冰上准备10  $\mu\text{L}$  gDNA消化反应体系 (包含实验组和No-RT对照组), 轻轻混匀并在37°C孵育2 分钟, 消化gDNA, 短暂离心后置于冰上。

组分	体积 ( $\mu\text{L}$ )
10X ezDNase Buffer	1
ezDNase enzyme	1
Template RNA (1 pg to 2.5 $\mu\text{g}$ total RNA)	varies
Nuclease-free Water	to 10

- 2) 冰上准备实验组和No-RT对照组反应混合液。向第一步10  $\mu\text{L}$ 混合液中加入以下组分:

组分	实验组	No-RT对照组
SuperScript IV VILO Master Mix	4 $\mu\text{L}$	—
SuperScript IV VILO No RT Control	—	4 $\mu\text{L}$
Nuclease-free Water	6 $\mu\text{L}$	6 $\mu\text{L}$

- 3) 引物退火: 轻轻混匀并在25°C 孵育10 分钟。
- 4) 逆转录: 50°C 孵育10 分钟。
- 5) 酶失活: 85°C孵育5 分钟。
- 6) 逆转录获得的cDNA可在-20°C 储存一周, 或是长期储存在-70°C。
- 7) qPCR 扩增: 使用稀释或未稀释的cDNA进行下游qPCR扩增。

**3.1.3 直接RT-qPCR** RT-qPCR的一个特殊程序是从未经RNA分离的粗细胞裂解物直接进行逆转录。在重点关注稀有细胞或事件的实验中, 如使用稀缺样本或选用群体内特定细胞的实验, 可考虑使用直接RT-qPCR法来防止可能的样本损失和低RNA回收。在直接RT-qPCR过程中, 在细胞裂解过程中抑制可降解RNA的内源性RNA酶和去除细胞基因组DNA是至关重要的步骤。Invitrogen Fast Advanced Cells-to- $C_T$ ™试剂盒, 可完全省去RNA纯化步骤, 利用RT-qPCR方法直接从培养的细胞样本中检测相对基因表达。该试剂盒采用独特的方法裂解培养细胞, 同时去除基因组DNA (gDNA) 并保持RNA完整

性，只需7分钟即可完成样本制备。其包含具有高持续合成能力的逆转录酶具有抑制剂抗性和高灵敏性，特别适用于未纯化RNA提取物的cDNA合成。同时提供TaqMan™或SYBR™ Green预混液用于qPCR分析，也分别提供一步法和两步法两种方案，可根据实验目的灵活选择。

Cells-to-C<sub>T</sub>试剂盒选择指南:

	两步法		一步法		单细胞
	Fast Advanced Cells-to-C <sub>T</sub> kits		Cells-to-C <sub>T</sub> 1-Step		Single Cell-to-C <sub>T</sub> qRT-PCR Kit
检测方法	TaqMan	SYBR Green	TaqMan	SYBR Green	TaqMan
货号	A35377	A35379	A25605	A25601	4458237
特异性	高	中	高	中	高
工作范围	10–100,000 个细胞	10–100,000 个细胞	10–100,000 个细胞	10–100,000 个细胞	1–10 个细胞
获得最终结果时间	80 min	95 min	从细胞裂解到 qRT-PCR 结果 (35 min)	从细胞裂解到 qRT-PCR 结果 (83 min)	从细胞到qRT-PCR (180min)

## 3.2 cDNA克隆和文库构建

逆转录酶在分子生物学中的首要应用之一是构建cDNA文库。cDNA文库由可代表特定样本中转录序列的cDNA克隆组成。因此，文库提供了关于特定细胞类型、器官或发育阶段的基因时空表达信息。cDNA文库克隆可用于鉴定新型RNA转录物、测定基因序列和重组蛋白的表达。

构建cDNA文库的必要条件是RNA可适当代表其全长或相对丰度，因此，逆转录酶的选择非常重要。具有高持续合成能力的逆转录酶可以捕获低丰度RNA，并合成长cDNA。同样，在对具有高度二级结构的RNA进行逆转录时，建议使用热稳定性较强的逆转录酶。

在逆转录后，有多种方法可以将cDNA插入克隆载体。第二链合成后获得的双链cDNA通常具有平末端，可以克隆到平末端载体中（图3.2.1A）。虽然平末端克隆所含步骤较少，但这种方法可能具有较低的插入效率，并可能导致插入方向错误。此外，cDNA末端可进行修饰以添加具有已知序列的额外核苷酸。例如，如需修饰cDNA的5'末端，可使用具有额外5'核苷酸的oligo(dT)引物启动逆转录；如需修饰3'末端，可以连接含有预期序列的短DNA寡核苷酸（被称为linker或adapter）（图3.2.1B）。通过这种方式，可将定向插入位点（如限制性和同源重组）、启动子结合位点（如，T3和T7序列）和亲和纯化标签序列（如，生物素和His标签）轻松整合到cDNA序列中。

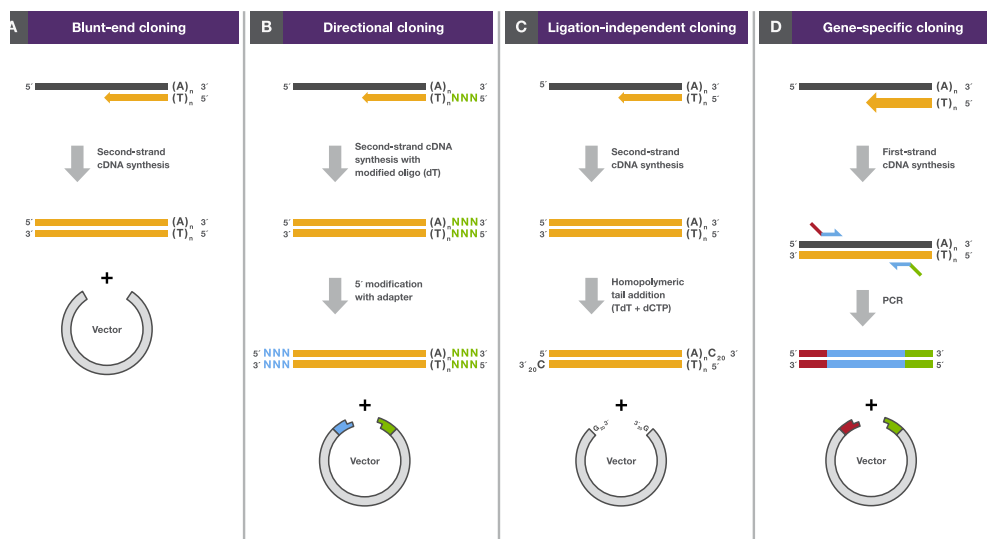


图3.2.1 常用的cDNA克隆方法

另一种比较常用的方法是, 可通过酶促反应在cDNA插入片段和载体的3' 末端加入互补的同聚尾部结构。使用末端脱氧核苷酸转移酶 (TdT) 和单一dNTP, 可以在插入片段上添加一串含20-30个核苷酸的序列, 并将一串互补的核苷酸以相似的方式添加到载体上 (如, 插入片段上的Cs和载体上的Gs), 使载体和插入片段尾部相互退火 (图 3.2.1C)。在转化后, 间隙在细菌内被修复, 因此不需要连接步骤。若目标序列是已知的, 可通过RT-PCR生成插入片段, 用于克隆cDNA的特定区域 (图3.2.1D)。

### (1) cDNA文库的第一链cDNA合成实验方案

推荐使用Invitrogen SuperScript IV 第一链cDNA合成系统 (货号: 18091200) 合成第一链cDNA。详细实验方案请参见P22页RT-PCR部分。

### (2) cDNA文库的第二链cDNA合成实验方案

Invitrogen 第二链cDNA合成试剂盒 (货号: A48571) 设计用于从第一链cDNA产物中合成第二链cDNA, 无需有机提取或乙醇沉淀步骤。试剂盒为预混组分, 方便使用, 减少实验中的移液步骤, 可在1小时内完成第二链cDNA合成。方便的单管形式可加速合成过程, 并最大程度提高双链cDNA产量。同时, 试剂盒包含残余RNA去除试剂。

- 1) 85 °C 加热5 分钟以终止第一链反应。
- 2) 对于100 μL的反应体系, 按顺序在第一链反应管中加入以下组分:

组分	体积 (μL)
First Strand cDNA Synthesis Reaction Mixture	20
Water, nuclease-free	55
5X Second Strand Reaction Mix	20
Second Strand Enzyme Mix	5
总体积:	100

- 3) 轻轻混匀并短暂离心。
- 4) 16 °C 孵育60 分钟。
- 5) 加入 6 μL 0.5 M EDTA, pH 8.0, 轻轻混匀以终止反应。
- 6) 将反应管置于冰上(4°C) 直至准备好继续进行残留RNA去除或双链cDNA纯化步骤。

#### i. 去除RNA

若使用总RNA作为起始材料, 我们建议通过以下步骤去除残留的 RNA:

- 1) 在第二链合成反应管中加入10 μL (100 U) RNase I。
- 2) 室温孵育5分钟。
- 3) 进行cDNA 纯化或储存于-20 °C。

#### ii. 双链cDNA纯化

使用PureLink™ PCR Micro Kit (货号: K310010) 纯化平末端双链cDNA, 立即用于下游应用或储存于-20 °C。

#### iii. cDNA产物分析

合成的双链cDNA数量和大小分布可通过测量260 nm处的吸光度(如使用NanoDrop™ ND-1000) 和凝胶分析来估计。

#### iv. 下游应用

纯化后, 平末端双链cDNA可用在以下克隆应用中:

- 直接连接
- 与任何平末端载体连接
- 与特殊设计的adaptor连接, 从而能克隆至粘性末端载体。adaptor的选择取决于所使用的载体

### 3.3 cDNA末端快速扩增

cDNA末端快速扩增 (RACE) 是一种基于PCR的方法, 可用于确定cDNA 5' 和3' 末端的未知序列。通常, 这类方法分别被称为5' RACE和3' RACE。RACE的实验目标包括鉴定5' 和3' 非翻译区、研究异质性转录起始位点、表征启动子区域、测定完整cDNA序列以及用于蛋白表达的完整开放阅读框 (ORF) 测序。

使用具有单侧特异性的PCR (也称为单侧或锚定PCR) 扩增cDNA的未知区域, 获得的序列即为RACE产物。5' RACE借助含PCR引物结合位点的寡核苷酸, 对5' 末端进行延伸, 而3' RACE利用mRNA的poly(A)尾作为PCR的通用引物结合位点 (图3.3.1)



图3.3.1 5' 和3' RACE过程示意图

在5' RACE中, 使用基因特异性引物, 将特定序列或相关家族的mRNA逆转录成第一链cDNA。然后通过末端转移酶 (TdT) 在cDNA 3' 末端添加一个同聚物尾部结构 (通常是一串Cs), 或将cDNA 3' 末端连接到寡核苷酸接头上。随后, 进行两轮半巢式PCR, 以扩增含有5' 未知序列的区域。借助下游实验应用的引物, 通过PCR还可对扩增子进行末端延伸, 如定向克隆中引入限制性酶切位点和测序中引入通用测序引物结合位点。

在3' RACE中, 使用含有接头序列的oligo(dT)引物将mRNA逆转录成cDNA。然后, 使用上游已知外显子序列的特异性引物和oligo(dT)引物中的接头序列引物, 进行两轮半

巢式PCR。通过这种方式,可对外显子和poly(A)尾部结构之间的未知3' mRNA序列进行扩增,以用于进一步分析。

起始RNA的质量和逆转录反应的设置对于成功完成RACE实验至关重要。在5' RACE中,任何长度的(甚至包括未到达mRNA 5'末端的)第一链cDNA都将含有添加序列(即同聚物尾部结构或接头),随后通过PCR进行扩增。为了最大程度合成全长cDNA,应选择具有低RNase H活性、高持续合成能力和高热稳定性的逆转录酶。或者,设计基因特异性引物结合到mRNA 5'末端附近,缩短cDNA合成距离,将有助于捕获未知的5'末端序列。类似的,可以考虑改进流程方案,选用具有5'-7-甲基鸟苷(7<sup>m</sup>G)帽子结构的RNA(代表成熟全长真核mRNA)进行逆转录(图3.3.2)。

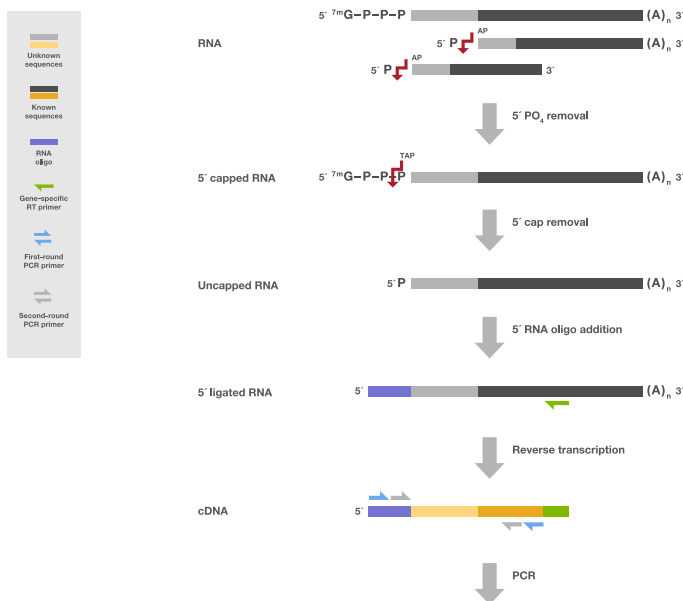


图3.3.2 改进的5' RACE有助于从具有7<sup>m</sup>G帽子结构的mRNA中高效捕获序列

Invitrogen FirstChoice™ RLM-RACE Kit (货号: AM1700) 利用改进型的RLM-RACE (RNA Ligase Mediated Rapid Amplification of cDNA Ends) 技术,用于仅从全长、加帽的 mRNA 中扩增 cDNA,通常在 PCR 后生成单一条带。在FirstChoice™ RLM-RACE 实验流程中,首先使用小牛肠道磷酸酶(CIP)处理总RNA 或多聚腺苷酸 RNA,以去除含游离 5'-磷酸盐的所有分子(核糖体 RNA、片段 mRNA、tRNA 和污染gDNA)中的 5'-磷酸盐,从而筛选得到全长 mRNA。全长 mRNA 不会受到影响。然后用烟草酸焦磷酸酶(TAP)处理RNA,以去除全长mRNA中的帽结构,留下5'-单磷酸。接下来将一个合成的RNA接头连接至RNA(仅含有 5'-磷酸盐的分子)上,未加帽的全长 mRNA 将接受接头。然后,进行随机引物标记、逆转录反应和巢式PCR以扩增特定转录本的 5' 端。

### 3.4 基因表达芯片

在20世纪90年代, DNA芯片的发展开辟了大规模无偏差或无先前假设的基因表达图谱分析。芯片由玻璃或硅晶片上数千个被称为“features”或“spots”的腔室组成。每个腔室的表面上固定有相同拷贝数的单链DNA序列, 称为“探针”, 每个探针代表一个基因。探针与荧光标记cDNA靶标进行杂交, 可实现两个样本之间的基因表达水平比较(图3.4.1和3.4.2)。

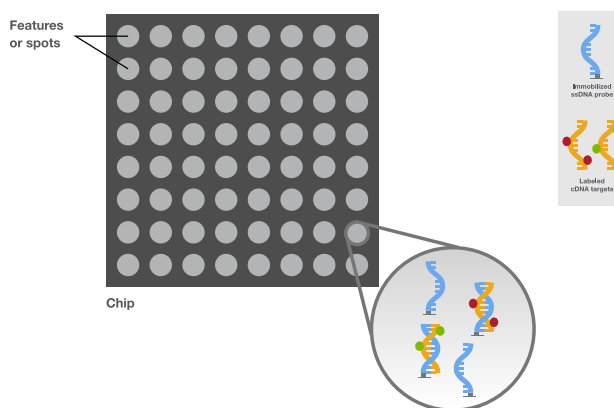


图3.4.1 基因表达微阵列芯片

微阵列探针由生物体基因组或cDNA的已知序列生成。例如, 可以利用PCR对每个已知基因进行扩增, 然后将其产物变性为单链DNA, 并将其固定到芯片上作为探针。或者可直接在芯片上合成20-60 nt寡核苷酸, 作为芯片探针。

图3.4.2概述了如何将基因芯片用于不同样本的基因表达分析。首先, 从实验样本和对照样本中分别分离总RNA或mRNA。然后, 将纯化的RNA样本转化为cDNA, 并用不同的荧光染料标记。接下来, 将两个样本的标记cDNA靶标混合, 并与一个微阵列芯片上的探针杂交。洗去未结合的靶标, 扫描芯片以检测标记的荧光基团。然后, 分析两种荧光信号的比例, 从而量化受实验条件影响的基因表达。

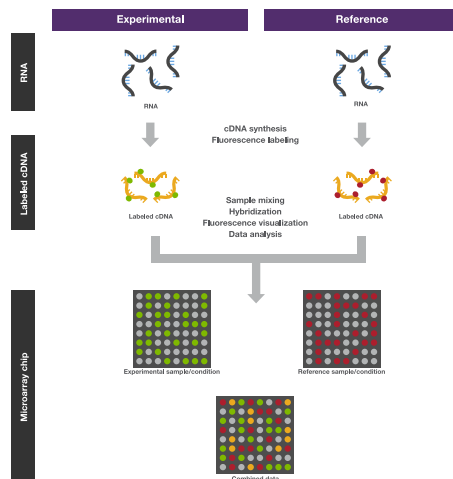


图3.4.2 基因表达芯片的cDNA靶标的制备和分析

cDNA靶标可在逆转录过程中或逆转录之后进行标记(图3.4.3)。若采用直接标记,则在cDNA合成期间掺入荧光标记的核苷酸。或者采用间接标记,可使用修饰的核苷酸进行逆转录,然后使用荧光基团标记cDNA。虽然间接方法需要更长的工作流程,但进行荧光标记往往更高效。

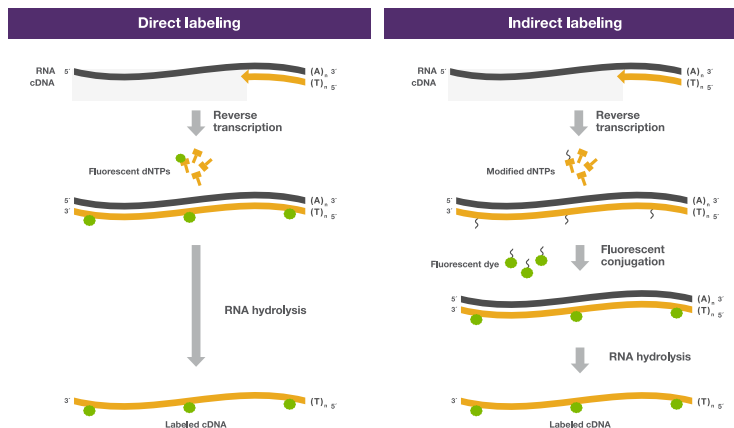


图3.4.3 直接和间接cDNA标记

当RNA起始量较少时(如10-100 ng),可以使用T7-oligo(dT)启动子引物将RNA逆转录为双链cDNA。随后,通过体外转录扩增cDNAs(图3.4.4)。在体外转录过程中,可以使用修饰的核糖核苷酸直接或间接标记RNA。或者对扩增的RNA进行逆转录和标记,生成cDNA靶标。

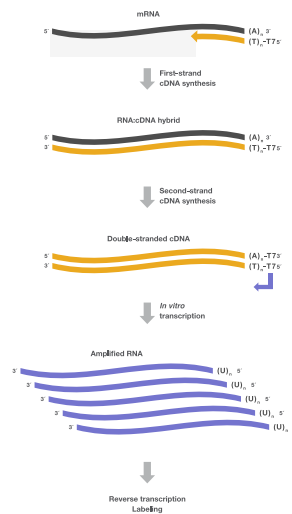


图3.4.4 通过将RNA转化为cDNA并从oligo(dT)引物附加启动子序列进行体外转录,实现RNA扩增

在选择逆转录酶以制备用于基因芯片实验的cDNA靶标时,即使当RNA序列富含GC或具有二级结构,获得高产量全长cDNA的能力对于获得RNA的高覆盖度来说至关重要。同样重要的是,为确保获得高信噪比,逆转录酶必须能够有效整合修饰的核苷酸,从而能够准确且无偏差地检测起始RNA。

Molecular Probes为研究人员提供能够标记所需生物分子的标记试剂,用于免疫化学、荧光原位杂交(FISH)、细胞示踪、受体标记和细胞化学等相关应用,也可用于检测生物结构、生物功能及其相互作用。Thermo Fisher Scientific也提供多种专为细胞标记及检测而优化的荧光染料标记的抗体、链霉亲和素、多肽、蛋白和追踪(指示)剂,以及信号放大底物等。

## 3.5 RNA测序

RNA测序,又称为RNA-Seq,通常可用于研究从基因组转录的RNA及其调控作用。随着二代测序(NGS)的出现, RNA-Seq已经成为用于分析全转录组(即转录的编码和长非编码RNA)、测定基因表达、发现剪接变异和融合转录物以及检测低丰度基因的高通量方法。与基因芯片相比, RNA-Seq的优点包括动态范围更大、灵敏度更高以及可在无基因组信息的情况下表征RNA序列。

由于大多数测序平台是为DNA设计的,因此, RNA-Seq模板制备需要进行逆转录。最好的结果是所得到的cDNA能够无偏差的代表初始RNA,包括低丰度转录物。全长cDNA合成能力对于捕获样本中的所有RNA序列非常重要。逆转录的错误率非常关键,其决定了序列文库的大小和数据质量。因此,应慎重选择逆转录酶。

研究目标和测序技术将决定RNA-Seq模板制备的顺序和方法。生成测序文库的标准流程包括富集目标RNA、RNA或cDNA片段化、逆转录、测序接头的添加(在多重测序中,还需添加index或barcode),以及可选的文库PCR扩增(图3.5.1)。

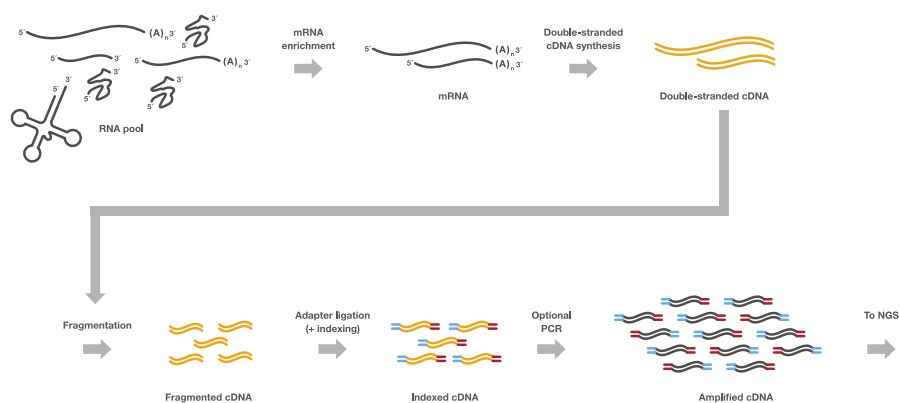


图3.5.1 RNA测序的传统实验流程

为了富集mRNA样本,通常需要从样本中去掉占总RNA约80%的核糖体RNA(rRNA),以改善转录组的测序数据。poly(A)尾部结构通常存在于真核mRNA和长非编码RNA中,所以能够结合Poly(A)尾部的oligo(dT)磁珠成为有效富集这些mRNA的替代方法。Invitrogen Dynabeads™ mRNA 纯化试剂盒(货号: 61006)通常在15分钟内快速分离mRNA转录组,提供完整的纯mRNA。

相比之下, rRNA去除是富集原核mRNA的优选方法, 因为原核mRNA不具有可用于分离的poly(A)尾部结构。Invitrogen RiboMinus 是专门针对转录组测序前去除rRNA的试剂盒, 根据样本来源不同, 可提供用于RNA测序的RiboMinus 植物试剂盒(货号: A1083808), RiboMinus细菌2.0转录组分离试剂盒(货号: A47335)等。快速高效, 仅需90分钟就能去除多达99.9%的rRNA。

对于小RNA (<200nt) 来说, 可以选用分子筛或特殊分离方法。

根据实验目标和测序平台, 可选择在逆转录前或逆转录后(即在RNA或双链cDNA上)进行片段化处理。为兼容NGS技术, 应制备200-500 nt的片段, 以确保高质量读取。片段化方法包括机械法(如超声处理, 雾化)、化学法(如水解)和酶促法(如RNase III、DNase I)。

为了检测转录物的方向或正义/反义性(称为“链型”), 可以在逆转录之前处理RNA片段, 例如使用不同接头标记末端。或者, 可在第二链cDNA合成中使用dUTP, 从而特异性标记第一链cDNA的互补链(图3.5.2)。

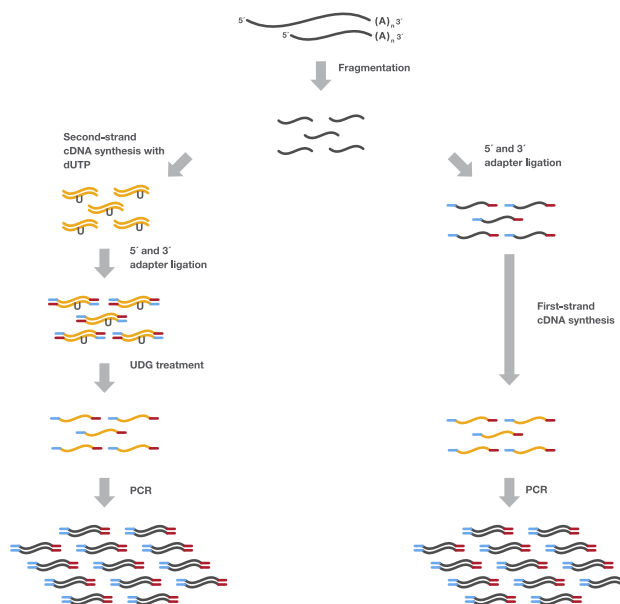


图3.5.2 链特异性RNA测序

片段末端的接头序列可作为与测序平台的连接物。在cDNA合成或扩增过程中, 可直接添加或通过特殊设计的引物添加这些接头。除接头外, 可以通过PCR加入barcode或index序列, 从而同时对多个样本进行测序(多重测序)。当RNA起始量较低时, 通过PCR扩增有助于获得足够量的cDNA起始量用于测序。

对于测序分析, 可使用genome-guide法或de-novo法获得转录组数据, 具体取决于是否有可用的参考基因组。genome-guide法将测序reads首先比对到已知的基因组序列, 而de-novo法直接通过reads的比对组装而得出结果, 后者需要大量的计算能力。

### 3.6 逆转录环介导等温扩增 (RT-LAMP)

RT-LAMP是一种快速、简单和灵敏的RNA和DNA检测方法,可通过多种方式评估检测结果。由于其简单的检测流程和快速的反应时间,RT-LAMP尤其适用于对病毒病原体的现场检测和监测。

LAMP方法依赖于具有高链置换活性的DNA聚合酶、特殊设计的内外引物及环状引物。当对RNA靶标进行扩增时,可通过简单地向LAMP反应中添加逆转录酶进行一步式反应(RT-LAMP)。

LAMP在恒温下(60–65°C)进行反应,所以属于等温扩增。可在30分钟内完成对RNA或DNA靶标的扩增。LAMP技术需要4-6对经特殊设计的引物,与两个不同靶标区域(相距约300bp)进行结合。LAMP技术起初使用4对引物,但随后两对环状引物的加入可将反应时间减半。LAMP所需的引物包括两对外引物(F3和B3)、两对内引物(FIP和BIP)以及两对环状引物(Loop F和Loop B)。

LAMP扩增主要有两步—非循环步骤和自动循环步骤。第一步是非循环步骤,内引物(FIP)的延伸,与靶标DNA结合开始互补链的合成。紧接着是外引物(F3)的链侵入延伸,释放单链DNA作为backward引物的模板。转换得到的内部序列在F端形成一个茎环结构。在另一端借助BIP引物和B3引物进行同样的过程,最终得到一个哑铃结构,两端各有一个茎环结构。这种结构含有多个扩增起始位点,通过自扩增加快了DNA的扩增,得到不同长度和菜花样结构的扩增DNA。

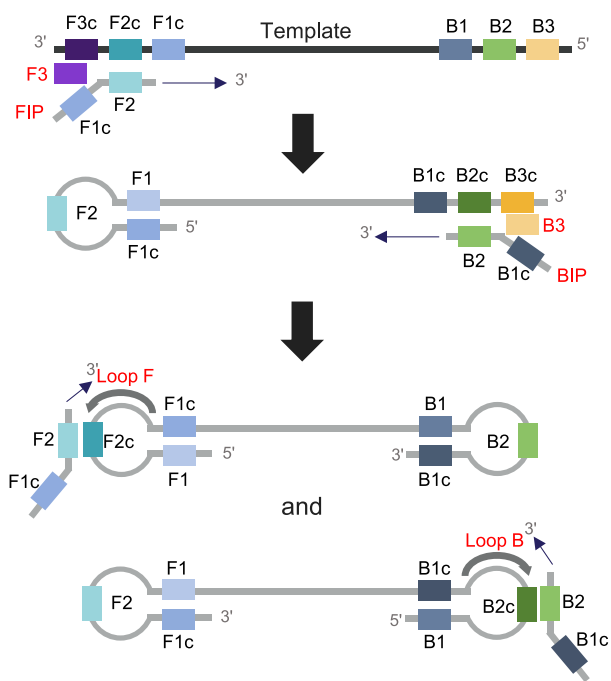


图3.6.1 等温DNA扩增(简化流程)—引物(3对): FIP/BIP, F3/B3和Loop F/B。“c”代表互补序列(如F1c与F1序列互补)。

RT-LAMP的优势:

- 无需PCR仪(仅需加热模块)
- 快速(15-60分钟)
- 多种方式进行结果检测
- 检测流程简单
- 对抑制剂更高的耐受能力
- 适用于现场检测

RT-LAMP仅需少量的RNA或DNA, 耐受抑制剂, 操作简单且具有良好的特异性和灵敏度。在恒温条件下进行扩增使得反应无需PCR仪, 由于无需等待温度变化, 可提供更高的扩增效率。借助这些特性, LAMP技术从发明开始在一些应用领域内得到了迅速发展。RT-LAMP可用于实验室内对病原体(细菌、寄生虫和病毒)进行更为快速的检测。由于检测的简便性, 其还非常适用于现场检测或床旁检测。由于RT-LAMP仅需简单设备但可提供高特异性的检测结果, 且检测结果可即时读取, 所以其也是应对流行病的理想检测方案。这意味着在诸如机场、学校等非标准检测场所也可进行检测。随着RT-LAMP技术的发展, 其还可用于开发多重检测试剂、移动生物感应器和可携带的侧向流检测试剂。其还可应用于遗传疾病的早期检测。此外, 为了增加RT-LAMP的灵敏度和特异性, 可将RT-LAMP和CRISPR等技术结合, 开启了一些新的应用机会。总的来说, RT-LAMP的优势给现场即时检测和诊断领域带来了新的发展机会。

Invitrogen SuperScript IV RT-LAMP Master Mix(货号: A51801)经开发用于病毒病原体RNA的快速扩增, 可获得高灵敏度、高特异性的检测结果。经优化的预混液整合了高性能的酶(包括Invitrogen SuperScript IV逆转录酶、改进型Bst DNA聚合酶等), 可在5-15分钟内针对多种RNA靶标进行可靠检测。其性能已经多种病毒RNA进行过验证, 包括麻疹病毒、流感病毒和SARS-CoV-2。此外, 该预混液也可用于DNA靶标的检测。

## 赛默飞世尔科技

---

### 上海

上海市浦东新区新金桥路27号3,6,7号楼  
邮编 201206  
电话 021-68654588

### 成都

成都市临江西路1号川投大厦1406室  
邮编 610041  
电话 028-65545388\*5300

### 南京

南京市中央路201号金茂广场南楼1103室  
邮编 210000  
电话 021-68654588\*2901

### 北京

北京市东城区北三环东路36号环球贸易  
中心C座7层/8层  
邮编 100013  
电话 010-87946888

### 沈阳

沈阳市沈河区惠工街10号卓越大厦3109室  
邮编 110013  
电话 024-31096388\*3901

### 西安

西安市高新区科技路38号林凯国际大厦  
1006-08单元  
邮编 710075  
电话 029-84500588\*3801

### 广州

广州国际生物岛寰宇三路36、38号合景  
星辉广场北塔204-206单元  
邮编 510000  
电话 020-82401600

### 武汉

武汉市高新四路22号58众创光谷产业园A座1楼2-5楼  
邮编 430075  
电话 027-59744988\*5401

---

欲了解更多信息, 请扫描二维码关注我们的微信公众账号与官方网站。

赛默飞世尔科技在全国有共14个商业办公室。本资料中的信息, 说明和技术指标如有变更, 恕不另行通知。

如需了解更多, 欢迎访问 [thermofisher.cn/ssiv](http://thermofisher.cn/ssiv)



赛默飞  
官方微信



赛默飞  
生命科学小助手

免费服务电话: 800 820 8982/400 820 8982  
信息咨询邮箱: [cnbidmarketing@thermofisher.com](mailto:cnbidmarketing@thermofisher.com)  
[www.thermofisher.cn](http://www.thermofisher.cn)

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC