

利用SuperScript IV一步法RT-PCR系统进行高效分析

简介

在一步法RT-PCR中，RNA的逆转录(RT)和cDNA的扩增在同一反应管中完成。相比单独的两步法，通常优先选择一步法，因为其工作流程更快速、更简单，需要的移液步骤更少，这样可以最大程度地减少污染，提升数据可重复性。

大部分一步法RT-PCR系统基于传统的RT和PCR酶，它们在标准RNA模板中具有极佳的性能，但通常不适用于更具挑战性的应用领域。我们开发出了Invitrogen™ SuperScript™ IV一步法RT-PCR系统，将热稳定性Invitrogen™ SuperScript™ IV逆转录酶与高保真Invitrogen™ Platinum™ SuperFi™ DNA聚合酶相结合——具有极高的产率和稳定性。上述两种酶及优化的反应缓冲液组合可为一步法RT-PCR提供高性能，适用于标准及难以处理的RNA模板。在本研究中，我们比较了SuperScript IV一步法RT-PCR系统及更早的一步法RT-PCR系统(基于SuperScript II和SuperScript III逆转录酶)的灵敏度、特异性、抑制剂耐受性和准确性。

材料与方法

研究中使用的产品包括：

- SuperScript IV一步法RT-PCR系统(货号：12594025)，包含SuperScript IV逆转录酶
- 含Platinum Taq DNA聚合酶的SuperScript一步法RT-PCR系统(货号：10928034)，包含SuperScript II逆转录酶
- 针对长模板的SuperScript一步法RT-PCR系统(货号：11922010)，包含SuperScript II逆转录酶
- 含Platinum Taq DNA聚合酶的SuperScript III一步法RT-PCR系统(货号：12574018)，包含SuperScript III逆转录酶
- 含Platinum Taq高保真DNA聚合酶的SuperScript III一步法RT-PCR系统(货号：12574030)，包含SuperScript III逆转录酶

RNA样本

使用HeLa细胞的总RNA进行RT-PCR反应(Ion Total RNA-Seq试剂盒v2，货号：4475936的商品化组分)。使用Thermo Scientific™ MagJET™ 全血RNA试剂盒(货号：K2751)分离人血液中的总RNA，利用总RNA比较RT-PCR试剂盒的保真度。

一步法RT-PCR

除特别说明外，遵循各一步法RT-PCR系统推荐的标准实验方案进行RT-PCR反应。反应终体积始终为50 μL。对于所有实验，使用基因特异性的引物生成不同长度的扩增片段：β-肌动蛋白，353 bp；GNE，528 bp；HTF，1,006 bp；GNE，1,492 bp；BF，2,441 bp；VIN，4,497 bp；DNCH，7,818 bp。使用Tm计算器确定PCR退火步骤的温度(thermofisher.com/tmcalculator)。利用琼脂糖凝胶电泳分辨扩增片段，利用溴化乙锭染色法观察。Thermo Scientific™ ZipRuler™ Express DNA分子量标准组(货号SM1373)中的分子量标准可用于大小测定。

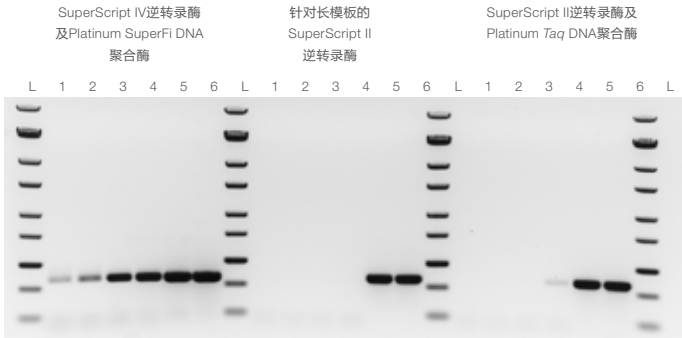
保真度检测

利用二代测序(NGS)检测不同的RT-PCR系统的保真度。遵循各试剂盒推荐的实验方案,从1 µg人总RNA中拷贝并扩增1,006碱基的靶点。将扩增获得的PCR片段用于生成文库,使用Illumina™ MySeq™系统进行测序。将采集的序列与模板进行比对,鉴别扩增错误,确定错误率。

结果与讨论

灵敏度

一步法RT-PCR系统的高灵敏度可实现低丰度RNA靶点的检测,且适用于RNA起始样本有限的一步法RT-PCR实验。我们比较了SuperScript IV一步法RT-PCR系统及其他一步法RT-PCR试剂盒扩增靶点的能力,靶点量低至0.01 pg总RNA。SuperScript IV一步法RT-PCR系统显示了最高的灵敏度,它只需其他RT-PCR系统1/10至1/1,000的起始RNA量即可生成可检测的产物(图1)。



特异性

要获取准确的结果,一步法RT-PCR的高特异性至关重要。我们使用不同的一步法RT-PCR试剂盒,比较了不同长度(0.3至7.8 kb)靶点的扩增。对于一些较早的一步法RT-PCR试剂盒而言,较长片段的靶点扩增颇具挑战性,而我们使用SuperScript IV一步法RT-PCR系统则可以获得最高的特异性,针对长达7.8 kb的靶点亦可获得清晰且明显的条带(图2)。

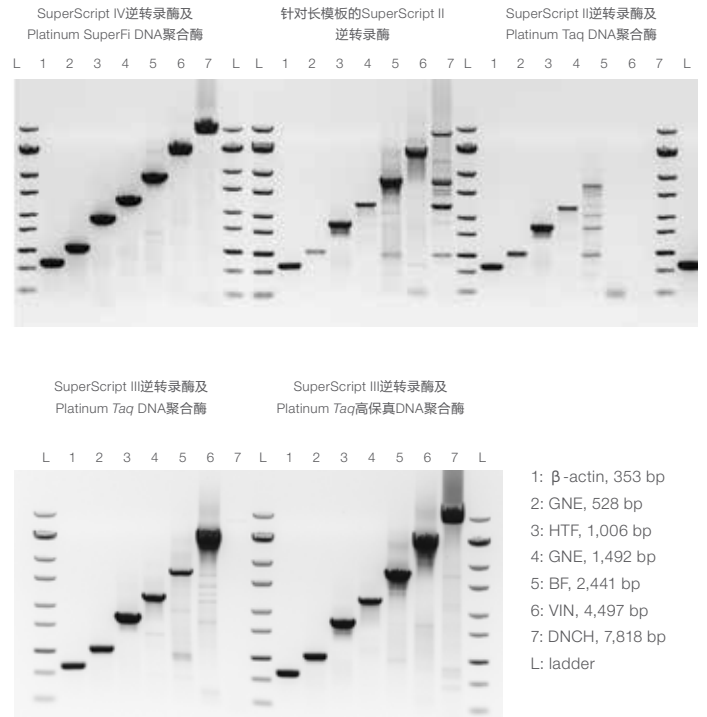


图2. 在较宽的靶点长度范围内的功能多样性。使用不同的一步法RT-PCR系统,检测100 ng总HeLa RNA中0.3至7.8 kb的靶点。

抑制剂耐受性

RNA样本中常见的多种化合物均对RT和PCR酶具有抑制使用(即便是经过彻底纯化后)。这些抑制剂包括从生物学样本或RNA纯化试剂中共纯化的化合物。SuperScript IV一步法RT-PCR系统中的SuperScript IV逆转录酶和Platinum SuperFi DNA聚合酶能够在杂质存在的情况下发挥作用。在测试抑制作用的实验中,SuperScript IV一步法RT-PCR系统可以耐受各种测试抑制剂的影响,而其他一步法RT-PCR试剂盒则不能(图3)。这种稳定性可以减少SuperScript IV一步法RT-PCR系统对RNA样本质量的依赖性,从而获得可靠的结果。

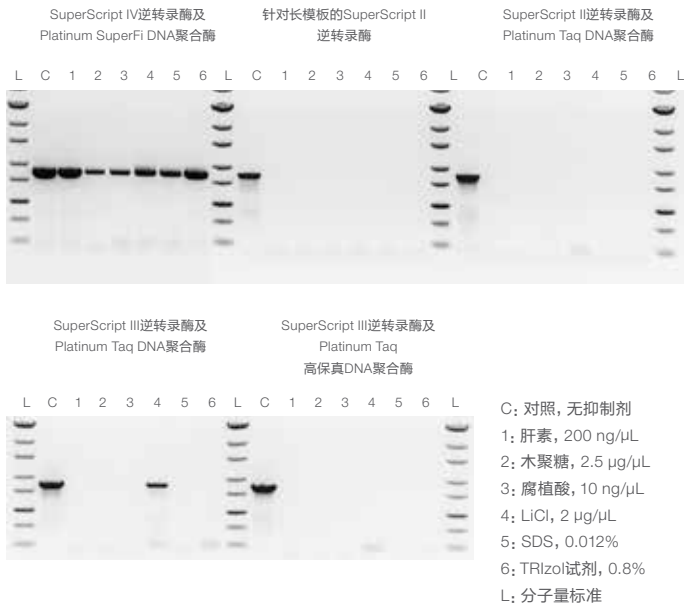


图3. 抵抗抑制剂作用。在含有标示抑制剂的反应混合物中,使用SuperScript IV一步法RT-PCR系统或其他一步法RT-PCR试剂盒检测100 ng总HeLa RNA中的1 kb RNA靶点。

RT-PCR产物的序列准确度

SuperScript IV一步法RT-PCR系统中使用的Platinum SuperFi DNA聚合酶是最准确的DNA扩增酶之一。但RT-PCR中的靶点为RNA,必须先逆转录为cDNA再进行PCR。由于逆转录酶无校正活性,在cDNA合成过程中可能产生错误。高保真DNA聚合酶可以确保在后续PCR步骤中不会出现其他错误。

对测试RT-PCR试剂盒的结果比较证实, SuperScript IV一步法RT-PCR系统可提供最低的错误率,生成最准确的产物(图4)。

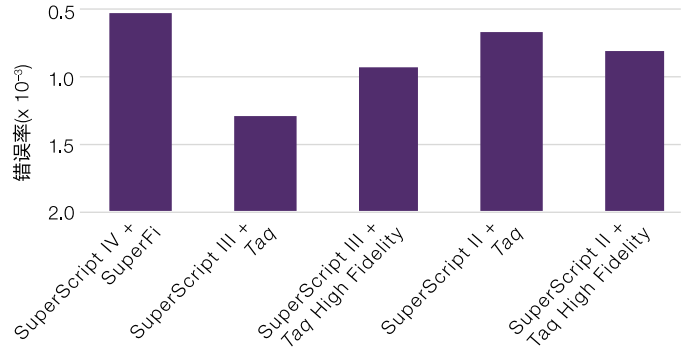


图4. RT-PCR扩增中的保真度。使用不同的一步法RT-PCR试剂盒进行靶点扩增。利用NGS测定最终产物中的错误,确定试剂盒的错误率(总聚合核苷酸中错误合成的核苷酸数量)。错误率范围在Y轴上倒序显示,柱形图的高度表示准确度/保真度。

结论

随着RNA检测和分析提高了对高灵敏度和通量的要求,较早的一步法RT-PCR系统可能已无法满足这些要求。当RNA量较低或样本纯度不佳时,新开发的性能出众的SuperScript IV一步法RT-PCR系统可提供最稳定且特异的RT-PCR产物合成。结合使用SuperScript IV逆转录酶和高保真Platinum SuperFi DNA聚合酶可以实现更长片段靶点的扩增,且错误率最低。研究人员可以放心地将当前工作流程中使用的较早的一步法RT-PCR试剂盒更换为SuperScript IV一步法RT-PCR系统。

如需了解更多信息,请登录 thermofisher.com/ssiv-onestep



赛默飞
官方微信



赛默飞
生命科学官方微信

免费服务电话: 800 820 8982/400 820 8982
销售服务信箱: sales.china@thermofisher.com
技术咨询信箱: LifeScience-CNTS@thermofisher.com

ThermoFisher
SCIENTIFIC