

循环逆转录反应方法及应用条件研究*

陈 燃 金 睿 伍 迪 唐 榕 毛裕民**

(复旦大学生命科学学院遗传所遗传工程国家重点实验室, 上海 200433)

摘要 建立了循环逆转录反应方法 (repeated reverse transcription reaction, RRTR). 其原理是通过控制高温变性-低温退火延伸的循环过程, 反复利用起始 RNA 模板进行逆转录反应. RNA 杂交的结果证明在 RRTR 过程中, RNA 模板是保持稳定的; 点杂交结果表明 cDNA 产物量得到了增加; 定量 PCR 的结果表明 RRTR 是 cDNA 线性增长过程. 结果提示, RRTR 可有效地提高 RNA 检测灵敏度, 并适合应用于定量分析等领域.

关键词 循环逆转录反应, RNA, 定量

学科分类号 Q522

现行的逆转录 (RT) 方法, 只能得到与 RNA 模板相同拷贝数的 cDNA 产物. 这对于低丰度 RNA 的研究是不利的. 本文根据 FD-TRT (FD 耐热逆转录酶) 能耐受使核酸变性的高温, 并在较高温度下保持逆转录催化活性的特性^[1,2], 发明了循环逆转录反应 (RRTR) 方法 (国家发明专利 ZL98121932.2): 引入高温变性-低温退火延伸的循环过程, 通过控制温度变化, 反复利用起始的 RNA 作为模板进行逆转录反应, 可以得到拷贝数几十倍于模板 RNA 的 cDNA, 从而提高 RNA 分析的灵敏度.

文中选择了二种 RNA 模板进行研究, 分别是: a. 鼠 Tublin mRNA, 全长为 1 593 bp, 是一种高丰度的 mRNA^[3]; b. HCV RNA, HCV 为单股

正链 RNA 病毒, 感染者血液中的病毒数量很少, 因此, HCV RNA 是一种低丰度 RNA^[4,5].

1 材料与方法

1.1 样品来源

小鼠购自第二军医大学. HCV 阳性血清由上海第二医科大学免疫室提供.

1.2 核酸提取

RNA 提取采用异硫氰酸胍-酚-氯仿一步法并略加改进. RNA 溶于 DEPC 处理过的双蒸水中.

1.3 靶序列探针和引物

寡核苷酸序列见表 1, 由上海生工生物工程公司代为合成.

Table 1 Synthetic oligonucleotide sequences

Target	Oligo DNA	Locus	Sequence (5' ~ 3')	Length of amplification/bp
Tublin mRNA	TRP1	115~ 139	CTCTACTGCCTGGAACATGGCATCC	301
	TRP2	380~ 405	CAGGACAAGGTCAATGATCTCCTTGC	
HCV RNA	HCVP1	45~ 65	CTGTGAGGAAGTACTGTCTTC	297
	HCVP2	341~ 321	GGTGACGGTCTACGAGACCT	

1.4 RT 和 RRTR 反应体系和条件

20 μ l 体系中, 含 Tris-HCl (pH 8.2, 25 $^{\circ}$ C) 25 mmol/L, (NH₄)₂SO₄ 15 mmol/L, MnCl₂ 1.0 mmol/L, dNTP 0.3 mmol/L, DTT 1.0 mmol/L; 明胶 0.1 mg/ml, 逆转录引物 (TRP2 或 HCVP2 或 hTERTP4) 1.2 μ mol/L, FD-TRT 0.5 U, RNA 模板 5 μ l, 以液蜡封住液面. 按程序: 94 $^{\circ}$ C 40 s, 65 $^{\circ}$ C

2 min; 进行循环反应. 不同循环次数的 RRTR, 分别在各自预定的循环数完成后, 以沸水浴 5 min 终止反应.

* 国家自然科学基金资助项目 (39700082).

** 通讯联系人.

Tel: 021-65643573, E-mail: ymmao@fudan.edu.cn

收稿日期: 2000-09-29, 接受日期: 2000-12-12

1.5 杂交

RNA 杂交以³²P 标记的 TRP2 为探针, 点杂交以生物素标记 TRP1 为探针, 转膜、探针标记、杂交显色均参照《核酸探针杂交实验技术》有关操作步骤进行, 略有改动.

1.6 PCR 及电泳

RRTR 反应结束后, 向反应管中加入 0.5 mmol/L EGTA, 1.0 μmol/L PCR 上游引物, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.5 U Taq 酶, 约 0.02 ng 对照模板, 按程序: 94 °C 20 s, 55 °C 20 s, 72 °C 40 s 34 次循环, 72 °C 5 min, 继续进行反应. 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶 (含 EB 0.5 mg/L) 电泳, 扫描记录. 定量分析方法参考文献 [6] 方法进行. 计算靶扩增带与对照扩增带的光密度比值, 取对数, 采用 Microcal Origin 5.0 系统分析作图.

2 结 果

2.1 RNA 在 RRTR 过程中的稳定性

分别将 10 μg 鼠 RNA 加入到无引物的 RRTR 体系中, 按一般的 RRTR 反应程序进行, 对不同循环后的 RNA, 进行 RNA 杂交, 结果发现被检测的 RNA 量, 基本上是不变的. 这表明 RRTR 过程中 RNA 是保持稳定的, 因此可反复用作逆转录反应的模板 (图 1).

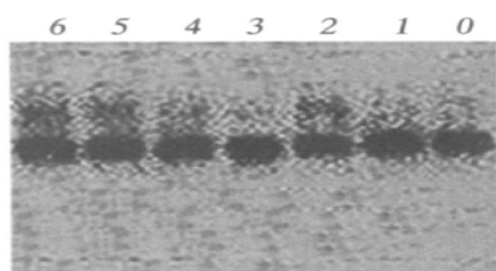


Fig. 1 Results of Northern blot hybridization

0~6: different cycles of RRTR, respectively:

0, 1, 2, 4, 8, 16, 32.

2.2 RRTR 提高 cDNA 产量

分别将 10 μg 鼠 RNA 加入到有引物 (TRP2) 的 RRTR 体系中, 按一般的 RRTR 反应程序进行, 不同循环后的体系直接点膜, 进行点杂交, 结果可见 cDNA 的量是明显增加的. 而 TRP1 在 TRP2 上游 300 bp, 说明 RRTR 的 cDNA 产物的长度至少可在 300 bp 以上 (图 2).

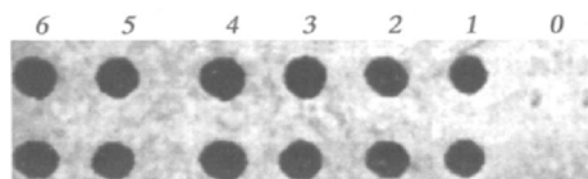


Fig. 2 Results of cDNA dot blot hybridization

0~6: the different cycles of RRTR, respectively:

0, 1, 2, 4, 8, 16, 32.

2.3 RRTR 定量检测应用

二价阳离子对于 FD-TRT 的催化活性影响很大^[1,2]. Mn²⁺ 浓度在 1.0~1.5 mmol/L, 特异扩增最好 (图 3). 图 4 表明, 采用竞争 PCR 体系,

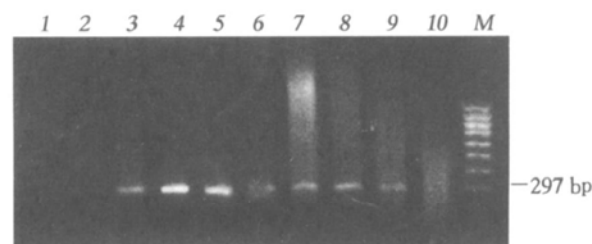


Fig. 3 The effecting of Mn²⁺ concentration in RRTR-PCR

The cycle of RRTR is 16. 1~10: different concentration of Mn²⁺, respectively: 0, 0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 mmol/L; M: DNA Ladder (bp: 1031, 900, 700, 600, 500, 400, 300).

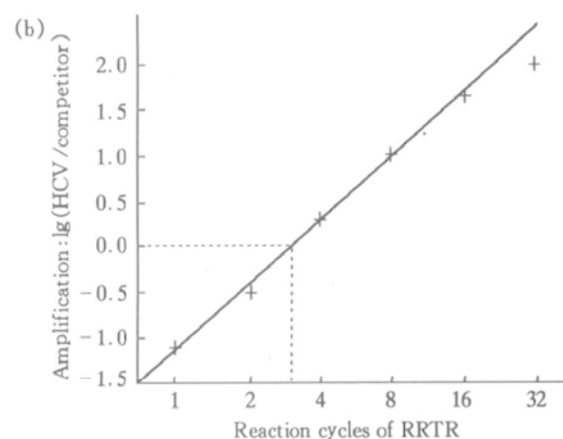
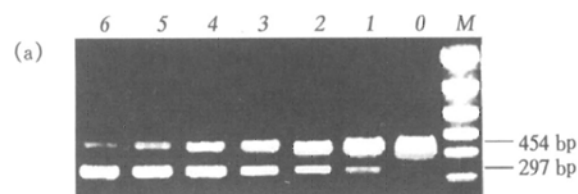


Fig. 4 The result of RRTR-competitive PCR of HCV RNA

(a) ethidium bromide stained PCR products, (b) plot of standard curves. M: DNA molecular mass marker (PCR marker, bp: 1 543, 994, 695, 515, 377, 237); 0~6: different cycles of RRTR, respectively: 0, 1, 2, 4, 8, 16, 32. Initial amounts of competition= 1.0 μg/L, $r = 0.9943$

HCV 扩增量随着 RRTR 循环数的增加而增多, 而且拟合标准曲线为一条直线, 说明 RRTR 是线性增长过程; 从图 4 可以读出 HCV RNA 的拷贝数, 约为竞争对照模板拷贝数的 1/3. 2.

3 讨 论

RRTR 有三个要点: a. RNA 模板的稳定性; b. cDNA 产物的质量; c. 避免 FD-TRT 的 DNA 聚合酶及 5' 外切酶活性的干扰^[1,2]. 以上的实验结果表明对于多达 32 次 94~65℃ 循环的 RRTR, 至少长达 300 bp 以上的 RNA 模板区是保持稳定的, cDNA 产物的长度至少可在 300 bp 以上, 这达到了一般 PCR 要求的产物长度范围, 能否适用于对产物有更长要求的反应, 有待于进一步的实验验证; 而避免 DNA 聚合酶及 5' 外切酶活性干扰的关键, 在于采用适当的 RRTR 体系, 最重要的是适宜的 Mn^{2+} 浓度. 另外, 酶量要适当, 逆转录引物和 dNTP 的用量都要比一般的 RT 反应高 (具体数据略).

RRTR 是线性过程, 可以用下面的方程描述: $[cDNA] = [RNA] \times E \times C$, 其中 E 为每步 RT 反应的效率, C 为 RRTR 循环数. 理论上, RRTR-PCR 的灵敏度无法与巢式 PCR (nested primers-PCR) 相比, 但在一般性的检测应用领域, 如对临床血样的 HCV RNA 的检测, 能够接近后者, 明显比普通的 RT-PCR 高^[7]. 与巢式 PCR 比较, RRTR-PCR 具有以下优点: a. 设计简单, 成

本低; b. 便于实行定量; c. 操作简便, 发生污染的机会低, 结果易判断. 在一些对 cDNA 产物长度要求不高的领域, RRTR 可以用于提高灵敏度, 比如: RNA/cDNA 定量、RACE (cDNA 末端快速扩增)、差异展示等.

参 考 文 献

- 1 郑佐华, 周宗祥, 朱蔚, 等. FD 耐热逆转录酶的部分酶学性质研究. 中国生物化学和分子生物学报, 1998, 14 (2): 170~174
Zheng Z H, Zhou Z X, Zhu W, et al. Chin J Biochem Mol Biol, 1998, 14 (2): 170~174
- 2 殷长传, 颜学恒, 郑佐华, 等. FD-TRT 耐热逆转录酶的特性分析. 复旦学报 (自然科学版), 1998, 37 (2): 225~228
Yin C C, Yan X H, Zheng Z H, et al. J Fudan University (Natural Science), 1998, 37 (2): 225~228
- 3 Villasante A, Wang D, Dobner P, et al. Six mouse alpha-tubulin mRNAs encode five distinct isotypes: Testis-specific expression of two sister genes. Mol Cell Biol, 1986, 6 (7): 2409~2419
- 4 Garson J A, Tedder R S, Briggs M, et al. Detection of hepatitis C viral sequences in blood donations by "nested" polymerase chain reaction and prediction of infectivity. Lancet, 1990, 335 (8703): 1419~1422
- 5 汪兴太, 王佑春, 孙德贵, 等. 首次及重复感染 HCV 后抗体及 HCV RNA 的动态观察. 中华微生物学和免疫学杂志, 1994, 14 (1): 1~4
Wang X T, Wang Y C, Sun D G, et al. Chin J Microbiol Immunol, 1994, 14 (1): 1~4
- 6 Tsai S-J, Wiltbank M C. Quantification of mRNA using competitive RT-PCR with standard-curve methodology. BioTechniques, 1996, 21 (5): 862~866
- 7 陈燃, 伍迪, 唐榕, 等. 应用循环逆转录 PCR 技术检测丙型肝炎病毒 RNA. 病毒学报, 2000, 16 (3): 266~269
Chen R, Wu D, Tang R, et al. Chin J Virology, 2000, 16 (3): 266~269

Repeated Reverse Transcription Reaction (RRTR) Protocol and Its Application*

CHEN Ran, JIN Zhe, WU Di, TANG Rong, MAO Yu-Min**

(State Key Laboratory of Genetic Engineering, Institute of Genetics, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract The RRTR can linearly increase cDNA products via repeated reverse transcription reactions controlled by temperatures and catalyzed by FD-TRT (FD thermostable reverse transcriptase). The stability of RNA in RRTR is proved via the Northern blot, and the increase in cDNA products along with that in reacting cycles is shown via the Dot hybridization. After components of the reaction system are optimized, the RRTR combined with PCR is applied in quantification of HCV RNA through changing the reacting cycles of the RRTR. It can be concluded that due to the linearity of RRTR, the RRTR is a convenient method to enhance the sensitivity and efficacy of RNA related study. It can be used in some fields which full-length cDNA is not required, such as quantification of RNA or cDNA, RACE (rapid amplification of cDNA end), and different display.

Key words repeated reverse transcription reaction (RRTR), RNA, quantification

* This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (39700082).

** Corresponding author. Tel: 86-21-65643573, E-mail: ymmao@fudan.edu.cn

Received: September 29, 2000 Accepted: December 12, 2000