

Обратная транскрипция и амплификация кДНК: в одну или в две стадии?

вер. 02 от 6 марта 2019 г.

Обратная транскрипция (или синтез кДНК) выполняется при участии фермента ревертазы на матрице РНК, в результате чего получается первая цепь кДНК. Первая цепь или ее фрагмент могут быть амплифицированы с помощью ДНК полимеразы. Обе стадии этого процесса имеют множество вариантов исполнения. В зависимости от цели, условий и возможностей исследователя рекомендуются различные подходы для получения амплифицированной кДНК.

При выборе стратегии проведения RT-qPCR (Reverse Transcription Quantitative PCR), особенно при анализе большого количества проб, очень важно учесть все достоинства и недостатки каждого подхода.

1. Двухэтапный подход

При двухэтапном подходе последовательно в разных пробирках выполняются две реакции: синтез кДНК и ПЦР. На каждом этапе можно оптимизировать условия реакции.

1.1. Первый этап

На первом этапе проводят синтез первой цепи кДНК с использованием случайных (вырожденных) Random-праймеров, олиго(dT)праймеров или ген-специфичных праймеров.

Выбор праймера для синтеза кДНК определяется задачей или качеством образца РНК:

- Олиго(dT)праймер используют при работе с интактными полиаденилированными мРНК. Однако, в случае частично деградированной РНК рекомендуется применять Random или ген-специфичные праймеры, поскольку использование олиго(dT)праймеров приведет к потере 5'-концевых фрагментов транскриптов;
- Реакции с использованием случайных Random-праймеров или олиго(dT)праймеров (или их комбинации) позволяют получить смесь кДНК-копий всех видов РНК, которые были в образце (библиотека кДНК);
- При затравке ген-специфичным праймером синтезируется только целевой участок кДНК.

Полученный на первом этапе продукт представляет собой одноцепочечную кДНК, растворенную в реакционной смеси (реакционный буфер, содержащий

ионы Mg^{2+} , неиспользованные остатки праймера, остатки РНК, также могут присутствовать следы геномной ДНК).

В этих условиях первая цепь кДНК сохраняется недолго, поэтому ее желательно использовать в дальнейшей работе как можно быстрее. При хранении в реакционной смеси даже в замороженном виде одноцепочечная кДНК может легко разрушиться.

При попытке очистить первую цепь кДНК от реакционной смеси значительная часть одноцепочечных молекул может быть потеряна по причине низкой концентрации ДНК или вследствие разрушения ДНК на сорбенте.

Реакцию синтеза первой цепи можно масштабировать, увеличивая объем реакции, чтобы обеспечить более высокий выход кДНК с целью более успешной очистки кДНК из реакционной смеси и концентрирования образца. Это увеличивает расход реагентов, но позволяет получать более воспроизводимые результаты при RT-qPCR, а также сохранять часть пробы для дальнейших экспериментов. Однако в одноцепочечном состоянии ДНК хранится существенно хуже, чем в двуцепочечном.

Для увеличения количества и срока хранения образцов кДНК можно перевести ДНК в двуцепочечное состояние, проведя амплификацию полноразмерной кДНК библиотеки.

Амплификация полноразмерной кДНК при помощи технологии Mint (кат. ## SK001, SK005, Евроген):

<http://evrogen.ru/technologies/Mint-cDNA-synthesis.shtml>

Если кДНК необходимо сохранить для исследований в будущем, рекомендуется использовать набор Mint для синтеза двуцепочечной полноразмерной библиотеки кДНК. кДНК получают в 2 этапа: сначала с олиго(dT)праймера синтезируют первую цепь кДНК, фланкированную за счет специального адаптера универсальной последовательностью. Затем амплифицируют кДНК с помощью праймера, имеющего структуру этого адаптера. В полученном образце (библиотека кДНК) ДНК находится в двуцепочечном виде, и все транскрипты многократно умножены в результате амплификации.

К недостаткам технологии Mint можно отнести вероятность потери редких транскриптов, представленных в образце РНК лишь несколькими копиями. При амплификации всех кДНК эти последовательности могут выпасть (drop-out), или их представленность в кДНК-библиотеке после амплификации может исказиться.

1.2. Второй этап

На втором этапе с матрицы кДНК, полученной на предыдущем этапе, амплифицируют целевой фрагмент со специфичными праймерами.

Матрицей для ПЦР-анализа может быть:

- первая цепь кДНК (реакционная смесь после первого этапа, разведенная в 2–10 раз, или очищенная первая цепь кДНК);
- амплифицированная библиотека кДНК (в конечном разведении не менее 1:100).

Для оценки экспрессии генов измеряется численность выбранных РНК методом qPCR. В этом случае проводится амплификация небольших по размеру ампликонов (до 250–300 п.о.) Для анализа численности транскриптов всегда необходимо использовать референсные гены, для которых предварительно показан постоянный уровень экспрессии в исследуемых тканях.

Если поставлена задача амплифицировать полноразмерные транскрипты кДНК (или протяженные фрагменты кДНК), то в ряде случаев можно столкнуться с трудностями. Например, низкая представленность транскрипта в пробе, низкое качество РНК, протяженные GC-участки или сложные структуры ДНК могут снизить эффективность амплификации транскрипта. В этом случае применяются различные приемы оптимизации ПЦР, которые подбираются индивидуально и могут потребовать значительного времени.

1.3. Достоинства и недостатки двухэтапного подхода

Достоинства

Двухэтапная ОТ-ПЦР разобщает синтез кДНК и последующую ПЦР, что дает большую свободу выбора отдельно ОТ-реагентов и реагентов для ПЦР. Эта гибкость может быть полезна для контроля качества проб РНК и увеличения эффективности каждого этапа по отдельности.

Недостатки

Для двухэтапной ОТ-ПЦР требуется дополнительный этап, включающий открывание пробирок, дополнительные манипуляции и пипетирование. Это увеличивает время работы, снижает воспроизводимость и увеличивает риск загрязнения, что делает двухэтапную ОТ-ПЦР менее доступной для высокопроизводительных приложений.

1.4. Область применения

Двухэтапный подход применяют, если предстоит работа с небольшим количеством образцов, при этом каждый образец имеет значительную ценность. Другой вариант — если необходимо амплифицировать протяженные последовательности с целью изучения их структуры, для клонирования и т.п.

2. Одноэтапный подход

Одноэтапный подход позволяет выполнить синтез кДНК и последующую ее амплификацию последовательно в одной пробирке в стандартизованных условиях. В пробирку с готовой реакционной смесью одновременно добавляют матрицу РНК, ген-специфичный праймер для синтеза кДНК и встречный праймер для амплификации мишени.

Для оценки экспрессии генов в серийных образцах необходимо принимать во внимание качество РНК. РНК может быть частично деградирована, содержать ингибиторы ПЦР, а также примеси геномной ДНК. Если часть образцов РНК имеет низкое качество, или в них присутствуют ингибиторы ПЦР, эффективность в одной серии одностадийных реакций может быть снижена в разной степени, что ухудшает сопоставимость результатов между образцами. Для решения этой проблемы необходимо использовать референсные гены.

Если подбор ген-специфичных праймеров осуществлен без учета интронно-экзонной структуры гена, примеси геномной ДНК могут исказить результаты RT-qPCR.

Однако, одностадийный протокол позволяет независимо контролировать пробу РНК на уровень присутствия геномной ДНК. Для этого одновременно выполняется постановка ПЦР с пробой РНК без добавления ревертазы («No RT» контроль). Это позволяет исключить ложноположительные результаты амплификации мишени с геномной ДНК.

2.1. Достоинства и недостатки одноэтапного подхода

Достоинства

Основным преимуществом одноэтапных реакций является минимальная обработка образцов, что уменьшает вероятность ошибок при пипетировании и перекрестного загрязнения (контаминации), и сокращает время подготовки реакции.

В двухэтапном процессе эффективность обратной транскрипции с олиго(dT)праймаера зависит от близости целевого ампликона к 3'-концу; при повышении температуры процессивность ревертазы и выход длинных продуктов снижаются. В одноэтапном протоколе при амплификации коротких продуктов с использованием ген-специфичных праймеров эффективность ОТ-ПЦР не зависит от близости к 3'-концу. Таким образом, одноэтапный протокол позволяет установить более высокую температуру реакции ОТ, чем двухэтапный процесс, что приводит к большей специфичности.

Недостатки

При выборе стратегии работы необходимо учитывать, что первая цепь кДНК не может быть сохранена после одноэтапного ОТ-ПЦР. Для повторения реакций или оценки экспрессии других генов необходимы дополнительные аликвоты исходного образца РНК, то есть расход РНК может быть выше, чем в случае двухэтапного процесса.

Кроме того, реакционная смесь для одноэтапного процесса представляет собой компромисс между условиями, оптимальными для реакции обратной транскрипции и для ПЦР. В случае сложных матриц, требующих оптимизации каждой из этих стадий, одноэтапный метод может не работать.

2.2. Область применения

Одноэтапный метод удобен для рутинного определения уровня экспрессии генов, особенно в высокопроизводительных и диагностических приложениях. Полученный ПЦР-продукт может быть клонирован в T-векторы (pAL2-T, кат. # TA002 или pKAN-T, кат. # TA003, Евроген).

3. Выбор реагентов для синтеза кДНК

Праймеры для ОТ	Преимущества	Недостатки	Применение	Кат. ##
Одноэтапный процесс ОТ-ПЦР				
Ген-специфические	<p>Сокращение времени на подготовку и проведение реакции.</p> <p>Снижение вероятности засора.</p> <p>Стандартизация условий постановки однотипных реакций.</p> <p>Простой контроль уровня геномной ДНК в пробах РНК.</p>	<p>Для повторных экспериментов или для анализа новых мишеней требуются свежие дополнительные аликвоты РНК (РНК плохо хранится и ограничена по количеству).</p> <p>Метод может не работать для сложных мишеней (вторичные структуры и GC-состав).</p>	<p>Одновременная оценка большого количества образцов РНК методом RT-qPCR.</p> <p>Анализ небольших ампликонов (до 0.5 т.п.о.)</p>	SK031 SK032
Двухэтапный процесс ОТ-ПЦР				
Олиго(dT) праймеры	<p>Гибкая оптимизация реакции: подбор количества РНК, выбор ферментов и их количества, оптимизация режима ПЦР и состава реакционной смеси (концентрации праймеров, Mg²⁺, подбор реакционного буфера).</p> <p>Подбор комбинаций праймеров.</p> <p>Сохранение первой цепи кДНК для повторного использования (хранение не более 1 мес).</p>	<p>Большее время работы по сравнению с одноэтапным процессом, особенно при подборе условий оптимизации.</p> <p>Риск загрязнения из-за дополнительной стадии.</p>	<p>Работа с небольшим количеством ценных образцов.</p> <p>Аmplификация протяженных (более 1 т.п.о.) и структурно сложных фрагментов кДНК.</p>	SK021 SK022 SK003
Случайные (random) праймеры				
Ген-специфические				
Комбинации праймеров				

Праймеры для ОТ	Преимущества	Недостатки	Применение	Продукты
Получение библиотек кДНК с использованием технологии Mint				
Олиго(dT) праймеры	<p>Аmplификация полноразмерной кДНК с малых количеств РНК.</p> <p>Сохранение амплифицированной двуцепочечной кДНК для будущего повторного использования (хранение более года).</p> <p>Возможность препаративной наработки двуцепочечной кДНК.</p>	<p>Вероятность потери или искажения профиля экспрессии редких транскриптов при амплификации двуцепочечной кДНК.</p> <p>Большее время работы по сравнению с одноэтапным процессом.</p> <p>Риск загрязнения из-за дополнительной стадии.</p>	<p>Работа с малыми количествами РНК с целью сохранения материала кДНК для последующего анализа транскриптов.</p> <p>Получение направленных и ненаправленных полноразмерных кДНК библиотек для высокоэффективного секвенирования транскриптома.</p>	SK001 SK005

Наборы и сервисы Евроген

 – ссылка на страницу НАБОРА

 – ссылка на страницу СЕРВИСА

Выделение и очистка нуклеиновых кислот 

Реактивы для ПЦР и ПЦР-РВ 

Синтез и амплификация кДНК  

Клонирование ДНК  

Выявление контаминации микоплазмой 

Оценка ДНК 

Нормализация кДНК  

Практикум по генной инженерии 

Генотипирование 

Синтез олигонуклеотидов и зондов 

Секвенирование по Сэнгеру 

NGS секвенирование 

Синтез генов 

Сайт-направленный мутагенез 

Консультация по продуктам: support@evrogen.ru

Подробную информацию о наших наборах и сервисах
можно получить на сайте www.evrogen.ru

ЗАО Евроген
Москва 117997
ул. Миклухо-Маклая 16/10, к. 15
Тел.: +7 (495) 784-7084
order@evrogen.ru
www.evrogen.ru