

# SuperScript™ IV 逆转录酶

## 摘要

历时三年的调查和访谈研究发现科学家们对于他们目前使用的逆转录酶并不满意，并且正在开展更加高难度样本的实验研究，如含有抑制剂的纯化不完全的 RNA、从植物中提取的 RNA、明显降解的 FFPE 样本以及未纯化的 RNA 样本（直接进行逆转录）。为了弥补这部分的效果缺陷，我们研发出了 SuperScript™ IV 逆转录酶 (RT)。内部试验结果证明，相比较其他用于扩增困难 RNA 样本的酶来说，这是一款非常强劲的逆转录酶。SuperScript IV 逆转录酶的特点就是在使用人员没有获得理想的 RNA 样本的非完美背景下展露出来的。通过一系列严谨的实验，本文论证了 SuperScript IV 逆转录酶拥有优越的效果，即使在样品制备过程中典型存在的如酒精、盐、去污剂、肝素、血色素、胆盐、福尔马林等抑制剂的情况下。在我们的实验中，SuperScript IV 逆转录酶在降解的 RNA (RIN: 1-3) 和未纯化的 RNA 样本中保持了最高的灵敏度。而且对于不同的 RNA 起始量，该酶保留了最低的波动性。总而言之，SuperScript IV 逆转录酶具有最强的温度稳定性（温度高达 56°C 仍保持 100% 活性，60°C 仍保持 90% 活性）和快速的酶（10 分钟即可扩增 9kb）。为了证明出其具有强大的价值，以上提及到的 SuperScript IV 逆转录酶的所有特点都和其他领先的逆转录酶进行了比较。

## 简介

逆转录酶是一类从 RNA 模板开始合成出 cDNA 的酶。传统情况下，科学家们使用逆转录酶从全部的有机物或细胞中克隆基因并研究表达出的基因。然而，新的科学领域已经明显的转变到包括单细胞分析、无样本制备分析、二代测序等。满足这些研究就需要一种对于单拷贝

敏感的、速度扩增快、可以应对困难样本和高温下保持活性的逆转录酶。为了达到这些要求，我们开发出了一种新的逆转录酶，SuperScript IV RT 酶是 SuperScript 逆转录酶家族中一个全新的成员，将在 cDNA 合成中因其质量和可靠性而闻名。逆转录酶的功能被从几个方面进行描述：扩增长度、灵敏度、可重复性和产量。虽然很多逆转录酶能够在以上几个方面满足使用人的要求，但是当存在抑制剂、RNA 被降解、样本制备困难的情况下，竞争品牌的逆转录酶就低于预期效果，这时 SuperScript IV RT 酶就表现出了非同一般的效果。

## 材料和方法

### RNA 纯化

商店里购买的小麦胚芽和亚麻籽放置在液氮中研磨成细粉。使用 PureLink Plant RNA Reagent (Thermo Fisher Scientific, Cat.No. 12322012) 及推荐的操作方法提取和纯化 RNA。总 RNA 用 Thermo Scientific™ NanoDrop 定量并且经过 DNase I (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 18068015) 处理。RNA 的质量采用 Bio-Rad Experion™ Automated Electrophoresis System 分析，并且进行 EB 染色的琼脂糖凝胶电泳。

## 降解的RNA样本制备

Hela RNA(Thermo Fisher Scientific, Cat. No. AM7852)和拟南芥RNA (BioChain, Cat. No. R1634310) 在加入终浓度为1 mM MgCl<sub>2</sub>后于95°C加热15min降解至RIN1-3。

## 未纯化的RNA（直接逆转录）样本

成团的Hela细胞、拟南芥组织、小麦胚芽组织和亚麻籽组织在液氮中研磨成细粉。将粉末转移到离心管中，加入TE缓冲液，振荡离心生成沉淀物。吸取得到的上层澄清液转移到新的离心管中。在进行逆转录前，加入EDTA和DTT至上清液中，终浓度分别为1 mM 和5 mM, 95°C加热10min。

## 逆转录

使用商业化的 RNA 包括宫颈癌(HeLa-S3) 总 RNA (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. AM7852)、拟南芥 RNA (BioChain, Cat. No. R1634310)、大鼠脑组织总 RNA(Clontech, Cat. No. 636653)、0.5–10 Kb RNA

Ladder (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 15623200) 以及RNA Millennium™ Markers (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. AM7150).

## qPCR

逆转录反应占到整个qPCR反应体积的10%，目标基因的TaqMan实验结果以数据显示。实验中使用了 EXPRESS qPCR SuperMix (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 1178501K) 和 ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 4453536)。以SuperScript IV RT酶为基数，公式计算出Ct 比值： $Y \text{ 轴数值} = [2^{-(Ct_{SSIV} - Ct_{competitor})}] / [2^{-(Ct_{competitor} - Ct_{SSIV})}]$

## 终点 PCR

逆转录反应体积占到整个 PCR 反应体积的 10%，实验中使用 Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity 和推荐的操作流程。用琼脂糖凝胶电泳分离 10 μL 的 PCR 反应产物，并用 EB 染色观察结果。

**SuperScript IV 逆转录酶使用指导**

**SuperScript IV 第一链cDNA合成反应**

下图举例的流程里展示了一个20 μL逆转录酶反应体系各反应物的正确体积。对于多数反应来说，准备所有反应所需组份的混合物可以减少加样引起错误。之后在加入退火的模板RNA和引物之前，将正确体积的酶混合物加入到每个反应管中

步骤	流程	流程细节										
1	退火引物与RNA模板结合	<p>a 将下列反应物放到一个反应管中</p> <p><b>Note:</b> 需要考虑第一和第二步中加入的所有反应物的体积，以便于最终确定达到总的反应体系需要补足的水</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Component</th> <th>Volume</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>50 μM Oligo d(T)<sub>18</sub> primer, 50 μM random hexamers, or 2 μM gene-specific reverse primer</td> <td>1 μL</td> </tr> <tr> <td>10 mM dNTP mix (10 mM each)</td> <td>1 μL</td> </tr> <tr> <td>Template RNA (10 pg–5 μg total RNA or 10 pg–500 ng mRNA)</td> <td>up to 11 μL</td> </tr> <tr> <td>DEPC-treated or nuclease-free water</td> <td>to 13 μL</td> </tr> </tbody> </table>	Component	Volume	50 μM Oligo d(T) <sub>18</sub> primer, 50 μM random hexamers, or 2 μM gene-specific reverse primer	1 μL	10 mM dNTP mix (10 mM each)	1 μL	Template RNA (10 pg–5 μg total RNA or 10 pg–500 ng mRNA)	up to 11 μL	DEPC-treated or nuclease-free water	to 13 μL
Component	Volume											
50 μM Oligo d(T) <sub>18</sub> primer, 50 μM random hexamers, or 2 μM gene-specific reverse primer	1 μL											
10 mM dNTP mix (10 mM each)	1 μL											
Template RNA (10 pg–5 μg total RNA or 10 pg–500 ng mRNA)	up to 11 μL											
DEPC-treated or nuclease-free water	to 13 μL											
2	准备RT反应混合物	<p>b 混合，快速离心所有反应物</p> <p>c 65°C加热引物和RNA模板混合物5min，并将反应物置于冰上孵育1min</p> <p>a 震荡并快速离心5X SSIV buffer</p> <p>b 将以下组份加入到一个反应管中</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Component</th> <th>Volume</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>5x SSM Buffer</td> <td>4 μL</td> </tr> <tr> <td>100 mM DTT</td> <td>1 μL</td> </tr> <tr> <td>RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor</td> <td>1 μL</td> </tr> <tr> <td>SuperScript® IV Reverse transcriptase (200 U/μL)</td> <td>1 μL</td> </tr> </tbody> </table> <p>c 盖上瓶盖，混匀，快速离心</p>	Component	Volume	5x SSM Buffer	4 μL	100 mM DTT	1 μL	RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor	1 μL	SuperScript® IV Reverse transcriptase (200 U/μL)	1 μL
Component	Volume											
5x SSM Buffer	4 μL											
100 mM DTT	1 μL											
RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor	1 μL											
SuperScript® IV Reverse transcriptase (200 U/μL)	1 μL											
3	混合退火的RNA和RT反应混合物	将RT反应混合物加入到混合退火的RNA中										
4	孵育反应物	<p>a 如果使用random hexamer，将反应混合物在23°C孵育10min，然后进行step b，如果使用oligo d(T)<sub>18</sub>或gene-specific primer，直接进行step b</p> <p>b 混合后的反应物于 50–55°C孵育10min</p> <p>c 80°C，10min终止反应</p>										
5	可选：去处RNA	<b>Note:</b> 扩增部分PCR目的基因 (> 1kb) 可能需要去处RNA。可以加入1 μL <i>coLi</i> RNase H, 37°C孵育20min										
6	PCR扩增	<p>使用你的RT反应产物立刻进行PCR扩增或者储存在-20°C。</p> <p><b>Note:</b> 作为PCR的建议起始量，逆转录反应物 (cDNA) 应该占到整个反应体积的10%。</p>										

## 热稳定性实验

将逆转录酶置于1X反应缓冲液和100 ng/μL小牛胰腺DNA(Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 15633019)中,在特定的温度下预孵育了一定的时间。孵育完成后,酶被加入到含有1X反应buffer中、2 mM oligo(dT)16、0.02 μg poly(rA) (GE Healthcare, Cat. No. 45-001-356)、2 mM dTTP和 1X EvaGreen™ dye (Biotium,Cat. No. 31000)的混合液中,室温延伸10分钟。用Molecular Devices SpectraMAX™ Gemini EM板读取荧光,激发波长为490 nm,发射波长为520nm。假设没有热处理的荧光值设为100%,可以测定经过热处理的剩余酶活性百分比。

## 第一链cDNA合成的热稳定性

除了反应温度从 50 到 65°C 变化外,如上所述用 oligo(dT)20 和 500 ng RNA Millennium Markers 进行逆转录酶反应, SuperScript III RT 反应按照附带的操作流程进行,除了反应温度从从 50°C 到 65°C 外,反应时间为 50 分钟。用碱性凝胶电泳合成的第一链 cDNA, cDNA 使用 SYBR™ Gold Nucleic Acid Gel Stain (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. S11494)染色。NaOH 水解了所有的 RNA,结果只能看到 cDNA。每一条 cDNA 链都通过 TotalLab 测量,每个反应温度下的 cDNA 含量也被计算出来。活性百分比是用在每个

反应温度里的总含量相对于 50°C 条件下的含量比值计算而来。

## 结果

### SuperScript IV RT酶和其他竞争对手的RT酶在抑制剂存在的情况的RT-qPCR效果

RNA 分离中残留的微量的试剂将会对逆转录反应造成各种问题。举例来说,一些试剂用于裂解细胞,如 SoluLyse™ and BugBuster™ 试剂,含有去污剂。TRIzol™ reagent,通常用于从细胞和组织中提取 RNA,含有酚红。盐类如盐酸胍、异硫氰酸胍、醋酸铵和氯化锂在 RNA 分离和提取的多个过程中都被广泛使用。FFPE 样本可能仍然含有福尔马林和石蜡。抑制剂也可能是生物样本来源中固有的如血红素,一种血液中发现的药物;在血液和粪便中存在的胆盐、泥土和植物中的腐殖酸。为了检测这些化学合成物是如何影响逆转录效率的,可能存在的抑制剂在 oligo(dT)20 融合步骤前被添加到总 Hela RNA 中。表格中的浓度是整个逆转录反应中的抑制剂终浓度。SuperScript IV RT 酶(红色条)、SuperScript III RT 酶和六种其它竞争对手逆转录酶(P, T, BR, Q, BL, and N) 逆转录后进行 qPCR 实验表明, SuperScript IV RT 酶在所有检测过的抑制中有着最佳一致性的结果 (Figure 1)。在乙醇、SoluLyse

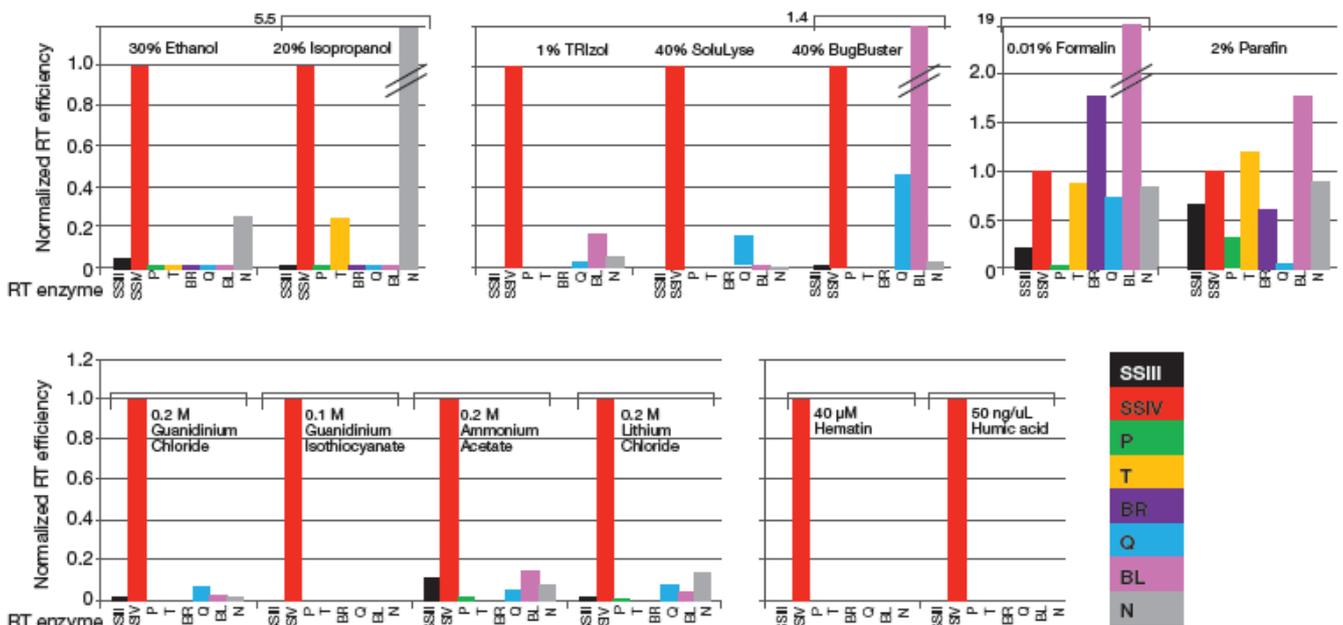


Figure1 SuperScript IV RT酶和其他竞争对手的RT酶在抑制剂存在的情况的RT-qPCR效果

试剂、盐、血红素和腐殖酸存在下，SuperScript IV RT酶的效果显著超越其它检测酶类。竞争对手N酶比SuperScript IV RT酶多生成了5倍的产物。竞争对手BL酶在BugBuster试剂中效果和SuperScript IV RT酶相当。竞争对手BR酶和BL酶在福尔马林中的作用好于SuperScript IV。由于大部分的逆转录酶在石蜡中的功能相近，在FFPE样本中的石蜡成分对于逆转录反应造成的抑制作用很小甚至没有。总而言之，在一系列抑制剂中，SuperScript IV RT酶代表了最高的结果一致性。

### 在抑制剂存在的情况下SuperScript IV RT酶和竞争对手RT酶第一链cDNA合成结果比较

除了研究 RTqPCR 反应中抑制剂的影响外，抑制剂对于逆转录酶活性的直接影响也进行了分析。因为靶基因通常少于 200 bp，对于逆转录来说相对容易，这样 RTqPCR 就可能隐藏了众多 RT 酶的真实效果。因此，使用不同大小的 RNA 靶基因进行第一链合成能够更为准确的体现出逆转录酶活性。从 0.5–10 kb RNA ladder 转录而来的第一链 cDNAs 进行碱性凝胶电泳，该电泳可以降解剩余的 RNA。单链 cDNA 用 SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain 染色。和观察到的小片段结果相反，长片段的基因逆转录结果揭示了酶更容易受到抑制剂的影响(Figure 2)。在异丙醇存在情况下,竞争对手 N 酶 对于最少的 0.5kb 处没有任何条带，然而 SuperScript IV RT 酶可以合成到 1 kb。在 BugBuster 试剂中, SuperScript IV RT 酶可以合成长达 8 kb，而竞

争对手 BL 酶只能生成非常少的 cDNA，并且在 1.5 左右 kb 后停止反应。对于福尔马林来说同样的影响也被观察到，竞争对手 BL 和 BR 酶在 cDNA 产量上遭遇困难，而 SuperScript IV RT 酶保持了自身大多数的活性。其它的抑制剂的影响如生物样本中本身固有的抑制剂，包括动物血液、组织、细胞中的肝素以及血液和粪便中的胆盐，也通过直接的 cDNA 分析。仅使用第一链 cDNA 合成分析，SuperScript IV RT 酶超过了其它竞争对手的逆转录酶。超过预期的是 SuperScript IV RT 酶在胆盐存在情况下仍然保持着大多数的活性。无抑制剂添加的逆转录酶阳性实验也进行了检测，竞争对手 BL, P, Q 和 BR 酶不能合成超过 2 kb 的目标基因，即使是在条件都很理想的情况下。

### 对于降解的RNA样本，SuperScript IV RT酶和竞争对手RT酶活性的效果比较

灵敏度或者从非常微量的起始 RNA 合成 cDNA 的能力是进行酶评级的一个重要的属性。而且，科学家们现在也在研究难度逐渐提高的样本来源，这些样本在 RNA 纯化过程中出现降解，导致全长逆转录时的产量更低。逆转录酶的灵敏度因此就用从 HeLa 细胞、拟南芥、小麦胚芽和亚麻籽来源的降解 RNA 进行评价(Figure 3)。RIN 值在 1 和 3 之间，而高质量完整 RNA 的 RIN 值高达 8。9 个目标基因被用 qPCR 进行每个情况的分析，SuperScript IV RT 酶（红色条）比其他检测酶类更加的敏感。

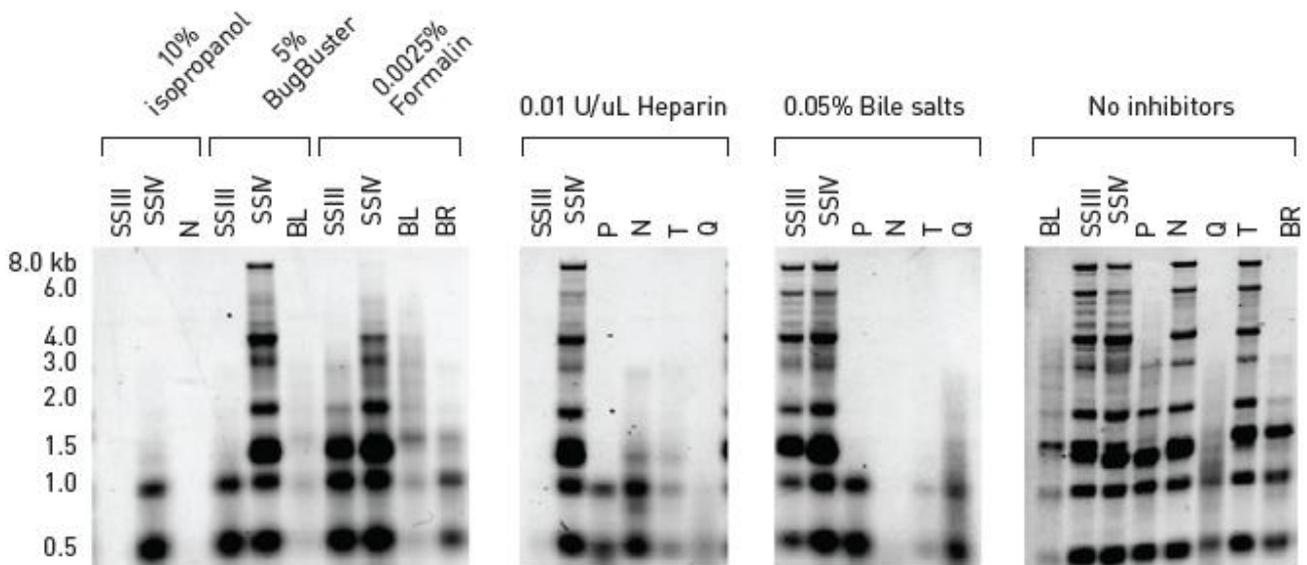


Figure2 在抑制剂存在的情况下SuperScript IV RT酶和竞争对手RT酶第一链cDNA合成结果比较

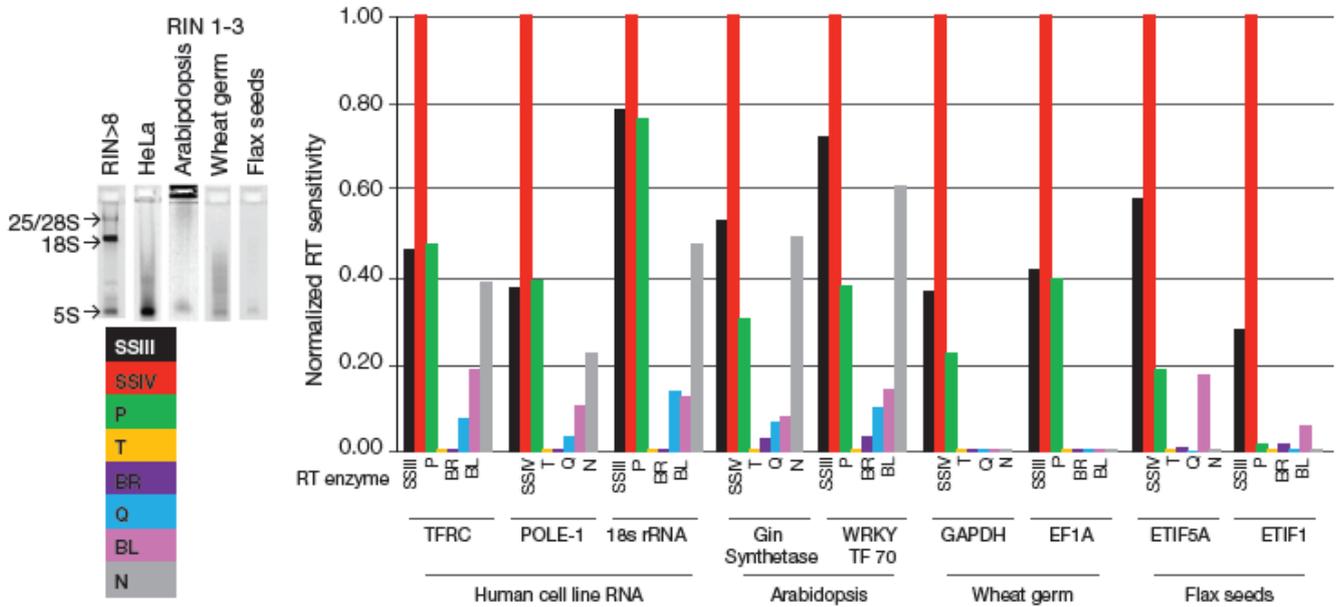


Figure3 对于降解的RNA样本，SuperScript IV RT酶和竞争对手RT酶活性的效果比较

### SuperScript IV RT酶和其他竞争对手RT酶的对于未纯化RNA样本的效果比较

之前的实验数据已经证明在抑制剂和降解的RNA情况下 SuperScript IV RT酶是最强有力、最敏感的逆转录酶。然而，科学家们面临了他们自身样本带来的多种混合的问题。为了在真实情况下挑战逆转录酶，实验用未纯化的RNA进行直接的逆转录反应。293细胞、拟南芥组织和小麦胚芽组织混合TE后溶解RNA，之后直接加入到逆转录反应中。这样，起始样本中就含有非常低的转录子拷贝和多种抑制剂。对于293细胞中的7种PCR目标基因、拟南芥组织和小麦胚芽组织，SuperScript IV RT酶（红色柱）是最敏感的（Figure 4）。大多数逆转录酶对于小麦胚芽中的GAPDH效果良好，然而SuperScript IV RT酶是直接逆转录反应中最稳定高效的酶。

### SuperScript IV RT酶和竞争对手RT酶对于降解的植物RNA样本的灵敏度和不稳定性比较

一个对于逆转录酶活性和不稳定性更加彻底的研究是在用拟南芥中纯化出的降解RNA(RIN: 1-3)条件下进行。使用1, 10和100 ng降解的总RNA进行逆转录实验。对于每种RNA起始量进行三次逆转录反应，两种拟南芥靶基因在每次逆转录反应后进行三次qPCR反应。对于两个基因，SuperScript IV RT酶在所有起始RNA量下都获得了最低的Ct值（Figure5）。所有起始RNA量的标准偏差图显示，不仅SuperScript IV RT酶有着最低的标准偏差，而且在所有三个起始RNA量中是变动量最低。

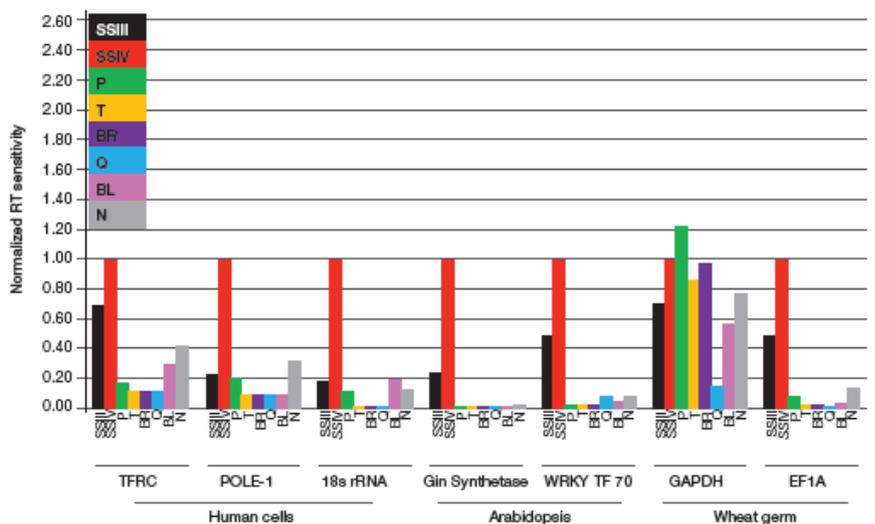


Figure4 SuperScript IV RT酶和其他竞争对手RT酶的对于未纯化RNA样本的效果比较

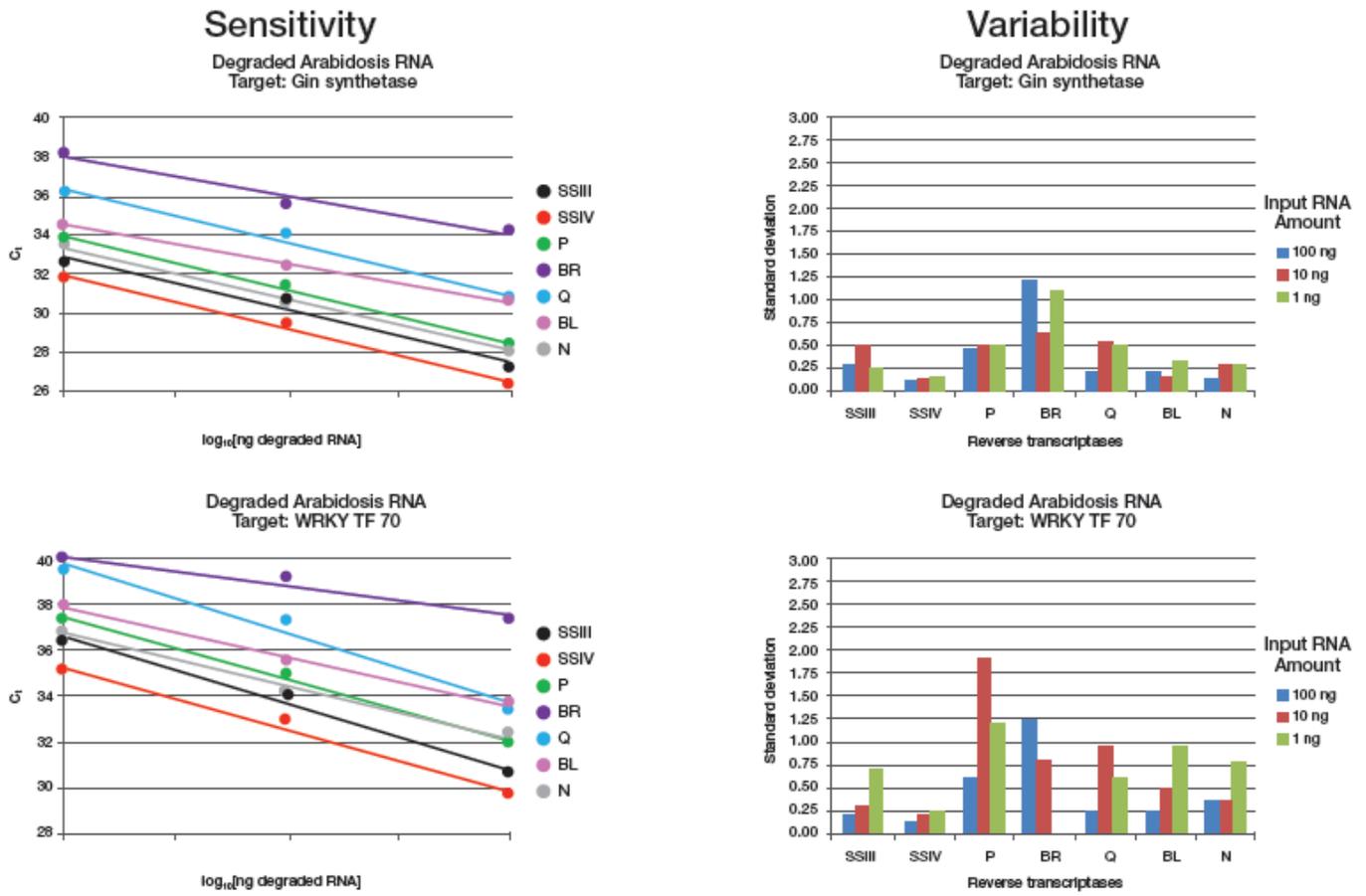


Figure5 SuperScript IV RT酶和竞争对手RT酶对于降解的植物RNA样本的灵敏度和不稳定性比较

### SuperScript IV RT酶和竞争对手RT酶的持续合成能力研究

持续合成能力是酶在不释放 RNA 模板的情况下，进行持续的核苷酸添加过程。酶的持续合成能力越强，cDNA 的合成长度越长，酶在生成全长 cDNA 的速度越快。逆转录酶的速度和长度用 0.5–9 kb RNA ladder 进行评估。逆转录时间为 10 分钟。只有 SuperScript IV RT 酶合成至 9 kb cDNA(Figure 6)。SuperScriptIII RT 酶可以合成至 5 kb，而其他的竞争对手酶合成 cDNA 长度不超过 3 kb，从而表明 SuperScript IV RT 酶是持续合成能力最佳的逆转录酶。

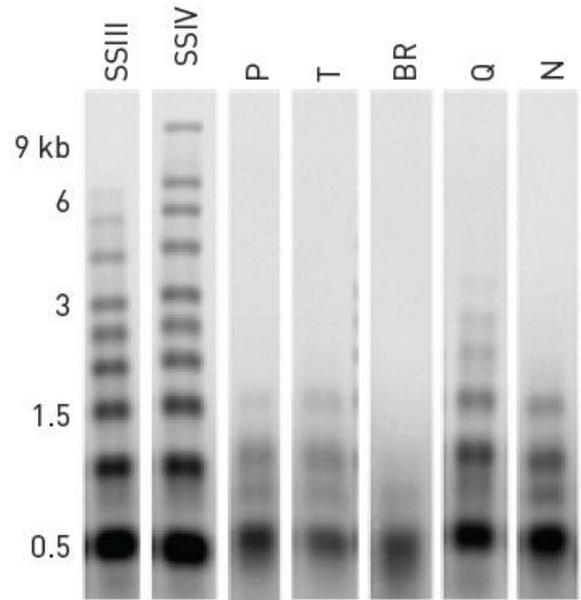


Figure6 SuperScript IV RT 酶和竞争对手 RT 酶的持续合成能力研究

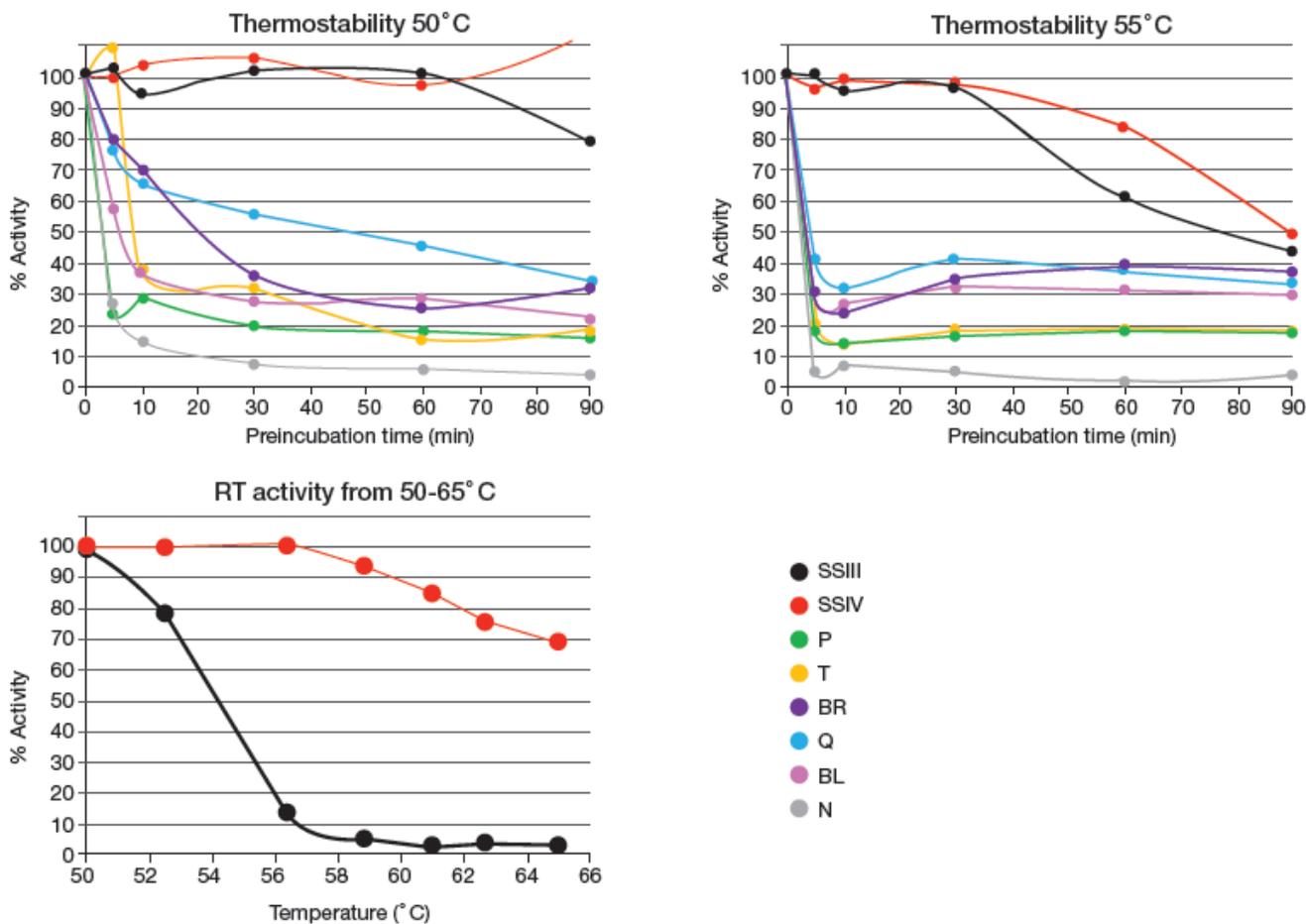


Figure7 SuperScript IV RT酶和竞争对手RT酶的热稳定研究

### SuperScript IV RT酶和竞争对手RT酶的热稳定研究

通过在 50°C 从 0 min 到 90min 预孵育进行逆转录酶的热稳定性研究。在孵育后，用荧光活性实验检测聚合酶活性。只有 SuperScript III 和 SuperScript IV RT 酶在 50°C 保持长时间的活性(Figure 7)。SuperScript III 和 SuperScript IV RT 的热稳定性通过从 50°C 到 65°C 对 0.5–9 kb RNA ladder 的第一链 cDNA 合成进行严格的分析。SuperScript III RT 酶的 RNA ladder 合成产量和长度随着温度略高于 50°C 即显著下降。而 SuperScript IV RT 酶在 56.4°C 保持了 100%的活性，温度高达时活性 65°C 仍然有 70%。SuperScript IV RT 酶在更高温度条件下的合成能力使得含有复杂二级结构的 RNA 靶基因得以实现逆转录。

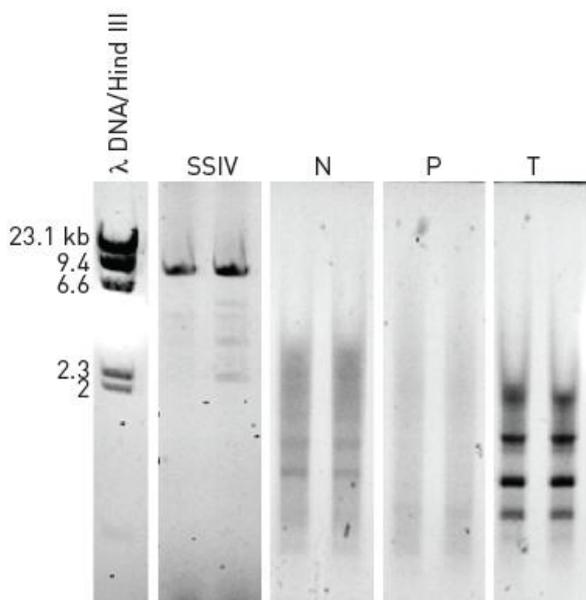


Figure7 SuperScript IV RT 酶和竞争对手 RT 酶合成的 cDNA 长度研究

## SuperScript IV RT酶和竞争对手RT酶合成的cDNA长度研究

虽然大多数处理的 RNA 都在 3 kb 左右, 也有基因超过了这个大小。为了研究逆转录酶的长片段转录能力, 在体外转录了 12.3 kb 后进行了终点 PCR 扩增。逆转录操作流程进行了修改, 加入了基因特异性的 RT 引物。对于所有测试用于二级结构和长片段转录的酶, 在逆转录体系中于推荐的反应温度下孵育 30min。高于反应温度 5°C 孵育 15min, 高于反应温度 10°C 孵育 15min。后续的 PCR 结果显示只有 SuperScript IV RT 酶反应混合物得到了 12.3kb 产物, 其他的逆转录酶的产物条带都模糊且都是小片段(Figure 8)。

## 总结

科学发展需要科学家们持续进行各种新的挑战, 并且更快的获得结果。Scientific Thermo Fisher Scientific 致力于不断为现在和将来研究并创新试剂和工具以满足科学界的各种需要。SuperScript IV RT 酶就是一个例子。SuperScript IV RT 酶能从低拷贝目标 RNA、降解的 RNA 和抑制剂中得到灵敏和可靠的 RNA 分析结果, 使得科学家能够快速的推进他们的研究。SuperScript IV RT 酶通过使科学家们不需纯化即可分析 RNA 从而将 RNA 研究推到了一个更高的水平。

更多详情请见 [lifetechnologies.com/ssiv](https://lifetechnologies.com/ssiv)

**ThermoFisher**  
S C I E N T I F I C

仅供科学研究使用, 不做临床诊断。2015 Thermo Fisher Scientific Inc. TaqMan is a registered trademark of Roche Molecular Systems, Inc., used under permission and license. Experion is a trademark of Bio-Rad Laboratories, Inc. EvaGreen is a trademark of Biotium, Inc. SpectraMAX is a trademark of Molecular Devices, LLC. TRIzol is a trademark of Molecular Research Center, Inc. BugBuster is a trademark of Merck, KGAA. SoluLyse is a trademark of Genlantis, Inc. All other trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries. CO014511 0415