

产品简介

长链非编码 RNA (lncRNA) 是一类转录本长度超过 200nt 的 RNA 分子, 以 RNA 的形式在多种层面上 (表观遗传调控、转录调控以及转录后调控等) 调控基因的表达水平。锐博生物针对 lncRNA 的特点进行了 qPCR 引物优化设计, 最大限度地保证了 lncRNA 的有效检测。

试剂内容

表 1 试剂规格内容

试剂	规格	浓度	体积	储存
lncDETECT™ lncRNA_qPCR_Forward Primer	5 nmol	20 μM	250 μL	-20°C
lncDETECT™ lncRNA_qPCR_Reverse Primer	5 nmol	20 μM	250 μL	

运输储存

产品以 20 μM 水溶液的形式提供, 常温运输, 于-20°C 以下低温冻存, 可以稳定保存半年。

使用前请瞬时离心, 以免引物储存液粘附于管壁或管盖上, 造成损失或污染。建议使用灭菌 ddH₂O, 稀释引物储存液 (5 μM 引物储存液的配置参见表 2), 混匀后分装保存, 减少反复冻融。

表 2 5 μM 引物储存液的配置参考

Primer(nmol)	1
管中引物储存液(μl)	250
需再加入ddH ₂ O (μl)	750

使用前须知

建议 lncRNA 的 RT 反应需依据其特点来选择合适的 RT 引物, 如 Random Primer, Random Primer + Oligo dT, 基因特异性 RT 引物。

血浆/血清/外泌体的 lncRNA qPCR 检测需要在提取 RNA 前加入外参。

实验方法

以下是搭配锐博生物的配套试剂盒 Ribo™ mRNA/lncRNA qRT-PCR Starter Kit 进行检测试验的操作方法，若使用其它公司的 qRT-PCR 试剂盒，请参考对应试剂盒的操作说明书。

1. mRNA/lncRNA RT 反应

- 1) 取 Random Primer (200 μM) 和 Oligo (dT)₁₈ (25 μM)，恢复至室温，振荡混匀。
- 2) 推荐以 10 μL RT 反应体系进行实验：

Reagent	10 μL 体系	终浓度
RNA Template(1 μg)	x μL	
Random Primer (200 μM)	1 μL	20 μM
Oligo (dT) ₁₈ (25 μM)	1 μL	2.5 μM
5X Reverse Transcription Buffer	2 μL	1X
RTase Mix	2 μL	
RNase-free Water	至 10 μL	

以上体系混匀后，瞬时离心，RT 反应程序为：42℃ 60 min，70℃ 10 min。

注：1) Random Primer 和 Oligo (dT) 混合使用，可以高效合成 cDNA。实验目的不同，也可以用单引物或者基因特异性 RT 引物，使用量如下：

引物	使用量	终浓度
Random Primer (200 μM)	1 μL	20 μM
Oligo (dT) ₁₈ (25 μM)	1 μL	2.5 μM
基因特异性 RT 引物(5 μM)	1 μL	500nM

- 2) RT 反应结束后请立即将 cDNA 产物取出，快速置于冰上冷却备用或-20 度以下保存；
- 3) 体系可按照实验需求等比放大，20 μL 反应体系建议不超过 5 μg 的 Total RNA。

2. mRNA/lncRNA qPCR 反应

- 1) SYBR Green Mix: 包括 Taq 酶、dNTP mix、PCR Buffer、SYBR Green I 等。

推荐以 20 μL qPCR 反应体系进行实验：

Reagent	20 μL 体系	终浓度
2X SYBR Green Mix	10 μl	1X
RT Product	2 μl	
lncDETECT™ lncRNA _qPCR_Forward Primer (5 μM)	0.8 μl	200nM
lncDETECT™ lncRNA _qPCR_Reverse Primer (5 μM)	0.8 μl	200nM
ddH ₂ O	至 20 μl	

注：1) 正反向引物初始反应浓度推荐使用 200nM，最佳浓度可以在 100nM~500nM 之间优化；

2) 本试剂盒不含 ROX 染料，使用 ABI PRISM[®] 7000/7700/7900HT, 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System 等需额外添加 ROX 染料作为校正荧光的仪器，请用户自行准备所需的 ROX 染料。不同仪器对 ROX 染料的用量需求不一，请根据仪器的使用说明进行添加；

3) DNA 最高使用量不能超过 qPCR 反应体系的 1/10，对于表达丰度较高的 mRNA/lncRNA，可将 cDNA 稀释后再进行 qPCR，稀释比例可以在 10-1000 倍之间，请根据具体的 Ct 值进行调整。

2) 建议使用标准三步法进行检测，请在定量 PCR 仪（以 Bio-Rad CFX96 为例）上设定如下程序：

循环	步骤	温度	时间	内容
1 X	预变性	95℃	10 min	Taq 酶激活
40 X	变性	95℃	5 sec	PCR 模板变性
	退火	60℃	30 sec	退火
	延伸	72℃	30 sec	延伸（收集信号）

注：1) 如无特殊说明，订购的所有 qPCR 引物退火温度均按 60±2℃ 进行设计。qPCR 程序设置时选择通用退火温度 60℃，最佳退火温度可在 57℃-63℃ 之间适当调整；

2) 部分仪器如 ABI 系列仪器收集荧光信号需要较长的恒温时间方能收集信号，使用此类仪器请将反应程序更改为两步法，将退火及延伸反应合并，退火延伸温度设置为 60℃，时间设置为仪器收集信号所需的最短时间。

3) 对于用 SYBR Green I 染料法进行的 qPCR 检测反应都需要在循环结束后立即进行熔解曲线分析，检测温度为 70℃~95℃，升温速率为 0.5℃/次，恒温时间为 5 sec/次。

相关产品

产品编号	产品名称
C10220-1	Ribo [™] mRNA/lncRNA qRT-PCR Starter Kit (20T RT + 60T qPCR)
C10170	Ribo [™] Reverse Transcription Kit (50T)
Variant [†]	Ribo [™] lncRNA Smart Silencer
Variant [†]	Ribo [™] lncRNA_CHIRP-Probe
Variant [†]	lncRNA FISH Probe Mix (Red)
LNC110101	h-U6 FISH Probe Mix (Red)
LNC110102	h-18S FISH Probe Mix (Red)
LNC110103	m-U6 FISH Probe Mix (Red)
LNC110104	m-18S FISH Probe Mix (Red)
LNC110105	r-U6 FISH Probe Mix (Red)
LNC110106	r-18S FISH Probe Mix (Red)
C10910	Fluorescent in Situ Hybridization Kit

FAQ

1. 产品为什么以 20 μ M 水溶液的形式提供而非干粉？常温运输，是否会降解？

溶液形式较方便直接使用，并可减少溶解等过程操作不当带来的影响。我司经过可重复的测试，短期内的常温运输不会导致引物失效，可以放心使用。

2. 是否可以搭配其他公司的逆转录及 qPCR 试剂盒？

可以搭配使用。

3. 引物非特异扩增（熔解曲线有杂峰）怎么办？

在合理的 Ct 值范围内（15-30，数据稳定性好的 30-35）出现熔解曲线有杂峰的现象，建议做如下改进：

- 1) 使用更合适的扩增条件（控制延伸时间，提高退火温度）；
- 2) 确认 RNA 模板质量，使用高质量高完整度的 RNA 模板；
- 3) 以上均不能解决杂峰现象时，建议重新设计引物。

如果目的基因表达丰度很低（Ct 值超过 30，与内参基因的 Ct 值相差 15 以上），处理同无扩增信号，此时的熔解曲线不具参考意义。

4. 无扩增信号是否是引物问题？

只要引物序列能够跟目的模板序列匹配上，基本均可以扩增，建议做如下改进或检测：

- 1) 使用合适的反应体系及程序；
- 2) 使用阳性对照样品（如对应 lncRNA 的过表达质粒）进行 qPCR 检测，以确认是否是引物问题；
- 3) 如若反应体系、程序和引物都没有问题，很有可能是目的 lncRNA 在实验模型中表达丰度很低或不表达，建议更换为其它样品或模型再进行相应 lncRNA 的 qPCR 实验。

5. 阴性样品有扩增信号是否是引物问题？

需根据具体 Ct 值分析对样品扩增信号是否有影响，若有影响，处理同引物非特异扩增。

6. 按照此说明书的操作，qPCR 的设定程序中预变性 10min 时间太长，是否可以缩短？

预变性主要目的为激活热启动酶，需根据热启动酶的性质设置，不能缩短；如果采用其他热启动 Taq 酶或试剂盒，热激活时间可能较短，请严格按照具体使用的 qPCR 试剂盒/Taq 酶使用说明书进行操作。