

LncRNA qPCR 实验体系与 mRNA 低丰度分子实验体系：一步法逆转录和 qPCR 检测指南

在分子生物学研究中，对特定核酸分子的精准检测至关重要。本文聚焦于一步法逆转录和 qPCR 检测技术，为您详细介绍其在 LncRNA 和低丰度 mRNA 检测中的应用。

样本 RNA 特征与检测适用性

从组织、细胞或全血中抽提的总 RNA，包含足量的 mRNA、LncRNA 和 microRNA，因此可用于这三类核酸分子的检测。而从血清或血浆中抽提的总 RNA，所含 LncRNA 量较为微量。对于低丰度基因的 LncRNA 检测，推荐采用一步法逆转录 LncRNA 结合 qPCR 实验。

一步法技术优势

本实验采用的一步法逆转录和 qPCR 检测，运用单链特异性逆转录方式，与传统的 oligo dt 和随机引物逆转录方式相比，具有更高的灵敏度和特异性。

简要操作步骤

1、引物定制：可通过 biotnt 进行 LncRNA 引物定制。我们推荐 LncRNA 套餐，包含 LncRNA 引物、内参引物以及 LncRNA 专用一步法 RT-PCR mix，仅需 699 元即可获得 200T×10ul 体系。

2、试剂准备：

BioTNT A2010A005b	LncRNA 专用一步法逆转录 qPCR mix（染料法）	0.5ml*2	600
BioTNT A2010A005b-5	LncRNA 专用一步法逆转录 qPCR mix（染料法）	2.5ml*2	2400

3、反应体系构建：

组份名称（目的孔）	组份名称（内参孔）	加量（μl）	反应终浓度	备注
Master PCR Mix	Master PCR Mix	2.5	1 x	
Enzyme PCR Mix	Enzyme PCR Mix	2.5	1 x	
LncRNA正向引物 (10 μM)	内参正向引物 (10 μM)	0.2	0.2 μM	用户 自备
LncRNA反向引物 (10 μM)	内参反向引物 (10 μM)	0.2	0.2 μM	
待检样本	待检样本	0.5-2	≤200ng	
补加DEPC 水至总体积	补加DEPC 水至总体积	10	/	

4、仪器设置：

步骤	温度	时间	循环次数
反转录	50℃	10-15 分钟	1
解链及反转录酶灭活	95℃	5 分钟	1
扩增	95℃	5-10 秒	40-45
	★60℃	15-30 秒	
熔解曲线分析	使用仪器配套软件进行		

相关产品和服务

1、LncRNA 抽提：依据不同样本类型，选择对应的抽提方式。

2、LncRNA qPCR 引物定制

- 货号：cust - lncRNAp
- 规格：200ul×10um×2
- 客户必填信息：种属（可选）、基因信息编号、数据库（可选）。
- 客户可填信息：备注。

3、LncRNA 的序列查找，引物设计和实验方案推荐：BioTNT 提供专业的 LncRNA 引物设计验证服务。

- 序列查找：可通过 ncbi 或 ensemble 查找 LncRNA 序列。
- 序列比对：将查找到的 LncRNA 序列在 ncbi blast 中进行比对。设计的区段必须具有特异性。由于 ensemble 数据库与 ncbi 数据库存在差异，可能出现难以确认的序列，此时需与客户沟通确认。无法确认的序列不能进行设计；若找不到约 200bp 的特异序列片段，原则上也不能设计，对于较短的特异性序列，建议客户采用探针法设计。
- 引物设计原则：在找到特异性序列后进行设计，设计好的序列需再次与 RNA 序列和基因组序列进行比对。鉴于 LncRNA 通常表达量较低，为排除引物因素，推荐在同一个外显子内设计引物，这样设计出的引物可用基因组样本进行验证。此外，引物设计还需符合 qPCR 的一般原则，如引物长度、产物长度、TM 值、退火温度，且引物二级结构良好，可借助 oligo 软件进行引物结构分析。
- 引物特异性比对：选用同种属的基因组序列和 RNA 序列对引物进行特异性比对，确保引物符合特异性要求。
- 引物合成验证：引物采用 Page 纯化，合成后需通过 qPCR 实验验证，以基因组 DNA 为模板进行验证。理想的产物扩增曲线应为 S 型，熔解曲线为单峰，且 TM 值与引物设计的 TM 值相差不超过 2℃。
- 提供产品：提供上下游两支引物，浓度为 10um，体积为 200ul，采用标准的 qPCR 两步退火方式，可满足 500T 的检测需求。

客户准备事项

- 1、样本基因组处理：**由于 LncRNA 引物采用同一外显子设计方式，扩增产物可在基因组上找到。若要获得准确的表达结果，样本需进行基因组去除处理，可在抽提或逆转录时进行。同时，建议客户抽提一些含基因组的样本，用于引物验证。
- 2、RNA 抽提方法：**尽量采用抽提总 RNA 的方法。
- 3、逆转录方式：**检测 LncRNA 时，因其序列无 poly A 尾，在抽提 RNA 后进行逆转录，可选择随机引物逆转录或特异性引物逆转录。使用 mRNA 的 oligodT + 随机引物逆转录方式，也可检测 LncRNA。
- 4、内参选择：**根据抽提方式和样本情况，若抽提的是总 RNA，可选用 GAPDH、actb 作为内参。

LncRNA 引物定制下单表单填写内容

需填写种属、基因信息编号、数据库，以及备注（可选）。

LncRNA 序列查找和比对

- Ncbi 数据库
- Ensembl 数据库：
<http://asia.ensembl.org/index.html>

设计和检测的难点和痛点，biotnt 的方案

1. 序列来源多，需要比对的数据库多；与 mRNA 序列进行比对，input 的序列，有很大概率没有办法设计出特异的引物；
2. 样本中含量低，实际检测可能难以测出；
3. 逆转录推荐用 oligodT+随机引物的逆转录方式进行逆转录；含量很低的情况下，推荐用特异性逆转录来进行；