RIBOBIO 锐博

lnc*DETECT*™ lncRNA qPCR 引物使用说明

RN: R11061.3

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
lnc*DETECT*™ lncRNA_qPCR_Forward Primer	5 nmol	20 μM	250 μL	-20℃
lnc*DETECT*™ lncRNA_qPCR_Reverse Primer	5 nmol	20 μM	250 μL	

运输储存

产品以 **20μM** 水溶液的形式提供，**常温运输**，于-20℃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 ddH_2O，稀释引物储存液（5μM 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　5μM 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_2O (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 & Oligo (dT) (5 μM)，恢复至室温，振荡混匀。

2）推荐以 10μl 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 & Oligo (dT) (5 μM)	1μl	500nM
5X Reverse Transcription Buffer	2μl	1X
RTase Mix	2μl	
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）最佳 RT 引物浓度依据具体实验而定，引物浓度范围可在 200nM～800nM 之间优化；

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）mRNA/lncRNA 进行特异性逆转录时，需单独进行逆转录；

4）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 20μl 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	
lnc*DETECT*™ lncRNA _qPCR_Forward Primer (5 μM)	0.8μl	200nM
lnc*DETECT*™ lncRNA _qPCR_Reverse Primer (5 μM)	0.8μl	200nM
ddH_2O	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[1]	Ribo™ lncRNA Smart Silencer
Variant[1]	Ribo™ lncRNA_ChIRP-Probe
Variant[1]	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 20μM 水溶液的形式提供而非干粉？常温运输，不会降解了吗？

以水溶液形式提供而非干粉主要是为了避免客户因溶解引物操作不当而导致的产品质量质疑；我司经过可重复的测试，短期内的常温运输不会发生引物的失效现象，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．无扩增信号是不是引物不好？

只要引物序列能够跟目的模板序列匹配上，基本可以扩增，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 的实验。

5．阴性样品有信号是不是引物问题？

具体 Ct 值分析对样品扩增信号有没有影响，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。