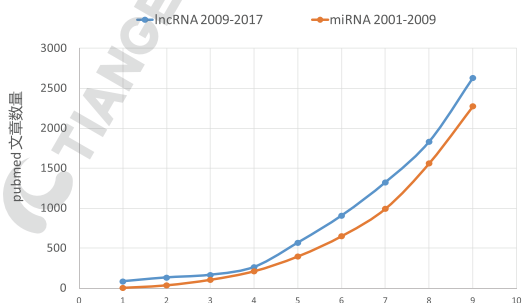


IncRNA 技术简介

Long Non-coding RNAs (lncRNAs) 是一种不具有开放阅读框，不编码蛋白质，长度大于 200 nt 的单链 RNA。它具有在转录水平或翻译水平调控基因表达的功能。已经证明，lncRNA 在个体发育、疾病发生过程中发挥重要作用 (Bartoniccek et al, Mol Cancer. 2016)，是目前表观生物学的前沿研究方向之一。



IncRNA与miRNA研究文章的发表数量。IncRNA研究的前九年（2009-2017，蓝线）比miRNA研究的前九年（2001-2009，红线）文章发表量更高。数据来源：NCBI pubmed。

IncRNA 的功能研究，通常需要经过寻找研究对象、确认研究对象和确认生物学功能三大步骤，常用的实验技术如下：



IncRNA 的提取

进行IncRNA研究，首先要进行IncRNA的提取。IncRNA的长度与mRNA相似，所以IncRNA的提取可以采用与普通total RNA相同的提取方式，沉淀法和介质吸附法都可以很好的进行IncRNA的提取。

TIANGEN为广大科研用户提供专业的RNA提取试剂，其中TRNzol系列和RNAprep系列都非常适合包含IncRNA的总RNA提取使用。关于这些试剂的详细信息请参考“第一章——核酸提取和纯化”中的“RNA提取”部分（第67页）。

IncRNA 的反转定量

在确认研究对象的过程中，利用RT-qPCR的办法对特定IncRNA进行定量是一项必不可少的实验。qPCR不但能够验证高通量实验的准确性，也能确认实验者样本中的IncRNA表达趋势是否与已知资料相同。

长久以来，IncRNA的定量与mRNA的定量通用同一方法甚至试剂。虽然IncRNA的提取可以采用传统方法，但是由于IncRNA与mRNA有诸多不同，IncRNA的荧光定量与mRNA的荧光定量也应采用不同的方法。

IncRNA的丰度只有mRNA丰度的1/10 (Cabili et al, Genes Dev, 2011; Aleksandra et al, Genome Biol, 2016)。据估计，人体内有超过30,000种IncRNA，但一个细胞内大于1个copy的IncRNA不超过1000种 (Djebali et al, Nature, 2012)。故此，传统mRNA的定量试剂的灵敏度远远不足，并不适用于IncRNA的反转录和荧光定量实验。



相同点	具有组织特异性	具有组织特异性
	可以形成功能相关的二级结构	可以形成功能相关的二级结构
	经过转录后加工（5'帽子和3'尾巴）	经过转录后加工（5'帽子和3'尾巴）
不同点	编码蛋白，直接表达基因 在不同物种中保守性强	不编码蛋白，调控基因表达 保守性较差
	大多分布在细胞质中，少数在细胞核中	少量分布在细胞质中，在细胞核、染色质、亚核区域分布较多
	总体约20000-24000种	超过30000种，比mRNA种类高3-100倍
	表达量较高	表达量低，约是mRNA的1/10
	GC含量较均一	GC含量波动较大

TIANGEN 关注 lncRNA 与 mRNA 的不同, 根据 lncRNA 的特点量身定制了检测试剂, 是国内屈指可数的专门适用于 lncRNA 反转录和染料法荧光定了的检测试剂盒。

lncRNA 的生物功能及与 miRNA 的相互作用

在寻找到目的 lncRNA、并确认其为研究对象之后, lncRNA 课题就进入了重要的确认其生物学功能环节。随着研究的不断深入, 现已表明, lncRNA 左右逢源, 既可以与核酸结合, 也可以与蛋白结合, 在转录和翻译层面发挥重要的调控作用。lncRNA 的经典作用机制可归为四类 (Kevin et al, Mol Cancer. 2011):

- 信号: 在特定时间或地点表达, 作为特定时间、地点、生理状态的标志物。

- 诱饵: 与 RNA 结合蛋白结合, 使蛋白离开 mRNA, 调节转录。
- 引导: 与 RNA 结合蛋白结合, 引导蛋白结合 mRNA, 调节转录。
- 平台: 与多种蛋白和核酸共同结合, 作为蛋白复合体组装的平台。

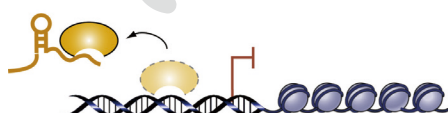
对于每一条 lncRNA, 其作用机制都有可能是多种机制同时作用。此外, 仍有许多非经典的作用机制被报道。例如, lncRNA 作为非编码 RNA, 在一定情况下也可以编码多肽 (Ingolia et al, Cell, 2011; Kim et al, Nature, 2013)。

此外, lncRNA 与 miRNA 关系也是研究 lncRNA 功能的一个前沿方向, 这个研究方向源于 ceRNA 假说。ceRNA (competitive endogenous RNA, 竞争性内源 RNA) 假说是 2011 年由著名癌症遗传学家 Pier Paolo Pandolfi 教授率先提出的。该假说指出, 共享 miRNA 结合位点的转录本会竞争结合相同的 miRNA, 由此调控彼此的表达水平。能够与 miRNA 形成 ceRNA 关系的包括人工反义 miRNA、环状 RNA、lncRNA、假基因 RNA 等 (Thomson et al, Nat Rev Genet, 2016)。在 lncRNA 的课题中加入 miRNA 的研究, 可以加深 lncRNA 课题的意义, 使实验事半功倍。

I. Signal



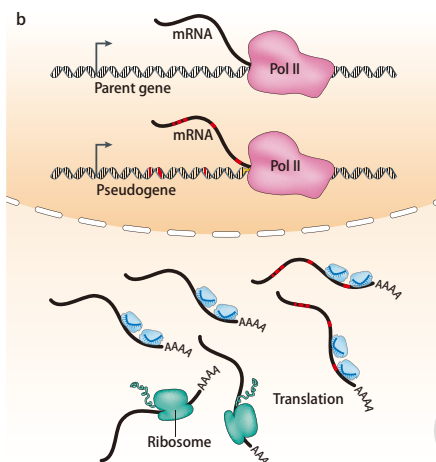
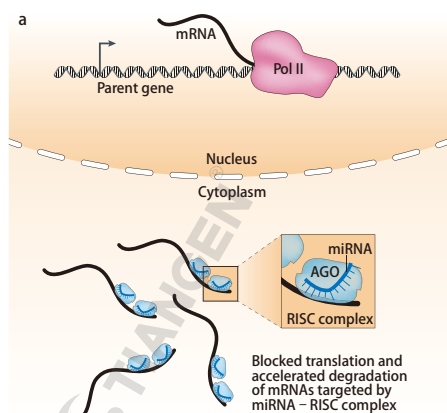
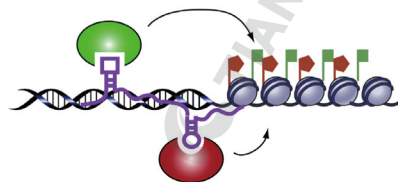
II. Decoy



III. Guide



IV. Scaffold



总之, lncRNA 作为非编码 RNA 的代表, 是目前表观遗传学研究的前沿方向, 其研究已经覆盖生命科学研究的各个领域。除了前述的 lncRNA 研究基本的思路和原则外, 深化 lncRNA 课题也有不同的方向和方法。

InRcute IncRNA cDNA 第一链合成试剂盒 (去基因组)

InRcute IncRNA First-Strand cDNA Kit

——超灵敏的 IncRNA 专用反转试剂

目录号	包装	价格
KR202-01	20 μ l \times 25 次	780 元
KR202-02	20 μ l \times 100 次	2380 元

产品包装

试剂盒组成	25 次 (20 μ l 体系)	100 次 (20 μ l 体系)
5 \times gDNA Buffer	50 μ l	200 μ l
InR-RT Primer Mix	50 μ l	200 μ l
InR RT Enzyme Mix	25 μ l	100 μ l
10 \times InR RT Buffer	50 μ l	200 μ l
RNase-Free ddH ₂ O	1 ml	2 \times 1 ml

产品特点

- 高效：稳定高效的 King 反转录酶，反转效率超过 95%。
- 灵敏：缓冲液中加入提升灵敏度的组分，检测下限可达 0.1 ng total RNA。
- 抗逆：无惧复杂模板，抵御杂质干扰。
- 快速：21 min 高效制备无基因组残留的 cDNA。

保存条件

-30~-15 $^{\circ}$ C 保存

产品简介

InRcute IncRNA cDNA 第一链合成试剂盒是专门针对长链非编码 RNA (lncRNA) 反转录而开发的产品。与 mRNA 相比，lncRNA 具有丰度低、GC 含量差异大、二级结构更复杂等特性，传统反转录试剂对 lncRNA 难以达到理想的效果。本试剂盒含有高效去除基因组 DNA 的 gDNase，可有效避免残留的基因组 DNA 对后续检测结果的干扰。本试剂盒中 InR RT Enzyme Mix 中使用的反转录酶为 FastKing RT Enzyme，此酶是通过分子改造后的新型反转录酶，特别增加了疏水 motif，具有更强的 RNA 亲和性和热稳定性，使本试剂盒在通读 GC 含量高，二级结构复杂，低丰度的 RNA 模板和抗逆性等方面表现突出，特别适合表达水平相对较低，二级结构相对复杂的 lncRNA 的反转录反应。

下游应用

- 反转录后的 cDNA 可用于 lncRNA 的荧光定量 PCR 使用，亦可用于 mRNA 的常规 PCR，荧光定量 PCR，cDNA 文库构建等实验。

InRcute IncRNA 荧光定量检测试剂盒 (SYBR Green)

InRcute IncRNA qPCR Kit (SYBR Green)

——灵敏抗逆的 IncRNA 专用荧光定量试剂

目录号	包装	价格
FP402-01	20 μ l \times 125 次	545 元
FP402-02	20 μ l \times 500 次	2180 元

产品包装

试剂盒组成	500 次 (20 μ l 体系)
2 \times InR IncRNA PreMix (SYBR Green)	4 \times 1.25 ml
50 \times ROX Reference Dye	1 ml
RNase-Free ddH ₂ O	5 \times 1 ml

产品特点

- 高灵敏的抗体修饰聚合酶，适用快速定量流程，高效完成 lncRNA 检测。
- H-Competitor 因子竞争氢键，解决高 GC 和复杂 lncRNA 模板。
- EP 组分稳定 PCR 体系，有效的保护酶活，抵御各种抑制剂的干扰。

保存条件

-30~-15 $^{\circ}$ C 保存

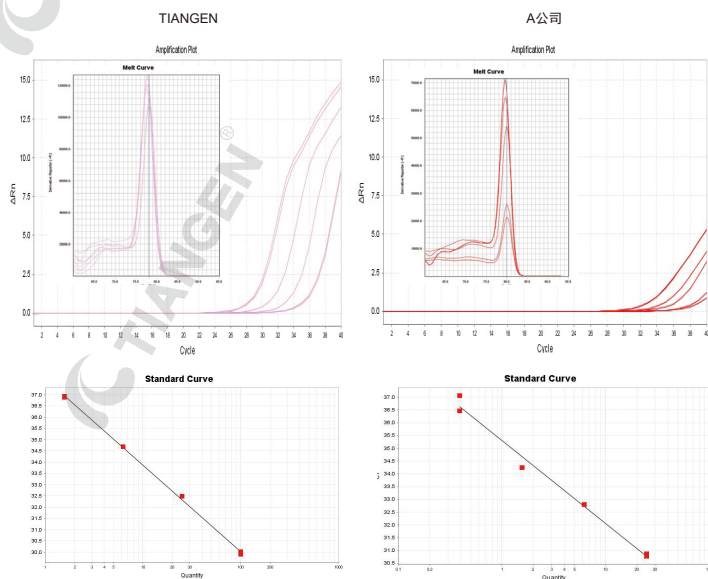
产品简介

与 mRNA 相比，lncRNA 具有丰度低、GC 含量差异大、二级结构更复杂等特性，传统定量试剂对 lncRNA 难以达到理想的效果。本试剂盒中的 2 \times InR IncRNA PreMix 是专门为 lncRNA 定量检测而研发的新一代预混形式的荧光定量 PCR 检测试剂，其中的 DNA Polymerase 采用的是抗体修饰的热启动形式，确保本产品在保证较高的反应特异性的情况下具有更高的检测灵敏度。此外，Buffer 中添加了 H-competitor 因子和 EP 组分，使得本产品具有广泛的样本普适性，对不同 GC 含量的模板、具有复杂高级结构的模板、PCR 抑制剂残留较多的模板以及长片段模板等具有非常好的扩增适用性，特别适合高级结构相对复杂，整体丰度相对较低的 lncRNA 的定量检测。

下游应用

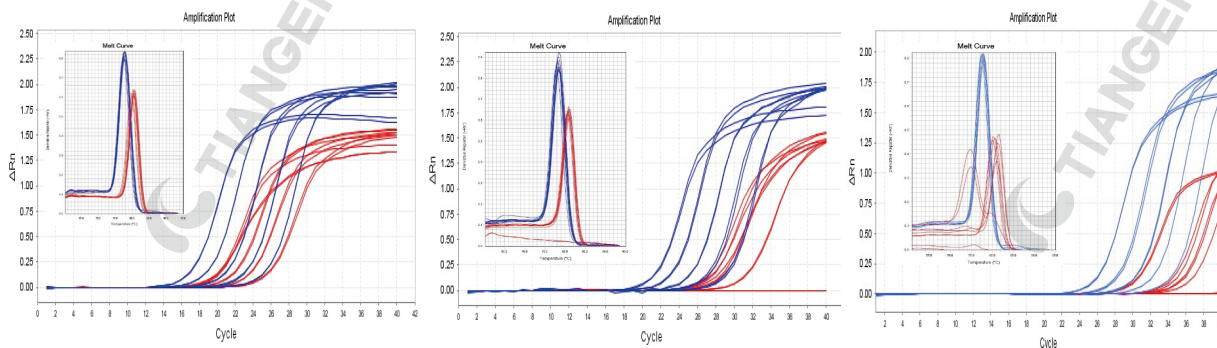
- 特别适用于在各类荧光定量仪器上采用 SYBR Green 法进行 lncRNA 表达分析的实验，也适合高 GC、复杂二级结构、杂质残留量高及长片段 cDNA 模板定量时使用。

实验例 (KR202/FP402)



检测引物		COOLAIR	
品牌		TIANGEN	A公司
各个模板 梯度平均 Ct值	100 ng	26.32	30.81
	25 ng	28.7	32.79
	6.25 ng	30.9	34.24
	1.56 ng	33.1	36.77
	NTC	ND	ND

实验例 1. 提取拟南芥总 RNA, 分别使用 TIANGEN KR202+FP402 及国外 A 公司提供的解决方案 (使用 mRNA 反转定量试剂) 检测 IncRNA COOLAIR, 展示扩增曲线、熔解曲线、标准曲线和 Ct 值。结果显示, TIANGEN IncRNA 专属检测试剂扩增 Ct 靠前, 特异性高, 梯度优秀, 优于 A 公司的 mRNA 通用试剂。NTC: 阴性对照。ND: 未检出。



实验例 2. 分别提取人类 (左)、小鼠 (中) 和大鼠 (右) 总 RNA, 分别使用 TIANGEN KR202+FP402 (蓝色线) 及国内 B 公司提供的解决方案 (使用 mRNA 反转定量试剂, 红色线) 检测 IncRNA (人类: HEIH, 小鼠: NONMMUT000882, 大鼠: NONRATT000076), 展示扩增曲线和熔解曲线。结果显示, TIANGEN IncRNA 专属检测试剂扩增 Ct 靠前, 特异性高, 具有良好的物种普适性, 优于 B 公司的 mRNA 通用试剂。

部分使用 TIANGEN IncRNA 产品发表的文献列表

题目	期刊	IF	使用产品	单位
The long noncoding RNA T5120 regulates nitrate response and assimilation in Arabidopsis	New Phytologist	7.299	IncRNA 反转	山东农业大学
LncRNA ZEB1-AS1 down-regulation suppresses the proliferation and invasion by inhibiting ZEB1 expression in oesophageal squamous cell carcinoma	Journal of Cellular and Molecular Medicine	4.658	DNA 提取 / IncRNA 反转 / 定量	郑州大学附属肿瘤医院
Long non-coding RNA CDKN2B antisense RNA 1 gene contributes to paclitaxel resistance in endometrial carcinoma	Frontiers in Oncology	4.137	TRNzol/IncRNA 反转 / 定量	中国医科大学
Silencing of GAS5 alleviates glaucoma in rat models by reducing retinal ganglion cell apoptosis	Human Gene Therapy	3.855	IncRNA 反转 / 定量	中南大学湘雅医院
Whole-transcriptome RNA sequencing reveals the global molecular responses and ceRNA regulatory network of mRNAs, lncRNAs, miRNAs and circRNAs in response to copper toxicity in Ziyang Xiangcheng (Citrus junos Sieb. Ex Tanaka)	BMC Plant Biology	3.67	RNA 提取 / miRNA 提取 / IncRNA 反转 / 定量	西南大学
The global effects of PmRunt co-located and co-expressed with a lincRNA IncRunt in pearl oyster Pinctada fucata martensii	Fish & Shellfish Immunology	3.298	IncRNA 反转 / 定量	广东海洋大学
LncMSEN1, a mantle-specific LncRNA participating in nacre formation and response to polyl: C stimulation in pearl oyster Pinctada fucata martensii	Fish & Shellfish Immunology	3.298	IncRNA 反转 / 定量	广东海洋大学
Knockdown of lncRNA KCNQ1OT1 suppresses the adipogenic and osteogenic differentiation of tendon stem cell via downregulating miR-138 target genes PPAR γ and RUNX2	Cell Cycle	3.259	IncRNA 反转 / FastFire 定量	温州医学院附属育英儿童医院
Long non-coding RNA CDKN2B antisense RNA 1 gene inhibits Gemcitabine sensitivity in bladder urothelial carcinoma	Journal of Cancer	3.182	IncRNA 反转 / 定量	中国医科大学
Long non-coding RNA GHET1 contributes to chemotherapeutic resistance to Gemcitabine in bladder cancer	Cancer Chemotherapy and Pharmacology	3.008	TRNzol/IncRNA 反转 / 定量	中国医科大学附属盛京医院
Resveratrol exhibits an effect on attenuating retina inflammatory condition and damage of diabetic retinopathy via PON1	Experimental Eye Research	2.998	IncRNA 反转 / 定量	西安培华学院
Long Noncoding RNA Expression Signatures of Colon Cancer Based on the ceRNA Network and Their Prognostic Value	Disease Markers	2.761	IncRNA 定量	南方医科大学南方医院
Comparative profiling of differentially expressed microRNAs in estrous ovaries of Kazakh sheep in different seasons	Gene	2.638	IncRNA 反转 / 定量	石河子大学