

lncRNA芯片定量验证引物设计

长链非编码RNA(long nocoding RNA, lncRNA)一般不编码蛋白，但以RNA形式在表观遗传、转录及转录后等层面调控基因的表达水平。

当我们拿到lncRNA数据时，需要对其进行RT-qPCR验证，lncRNA定量验证需要注意的几个点如下：

- 1、选择信号值较高的探针，优先选择Flag为P（若组间差异大，可选择一组为P，另一组为A），信号值大于7（原始信号值 $2^7=128$ ）的探针数据进行验证。
- 2、设计引物位于探针序列附近，PCR扩增产物序列最好包含芯片上探针的序列。
- 3、引物设计出来后要对引物扩增效果进行验证，确保引物的溶解曲线良好，扩增Ct值在20-25之间。
- 4、用于芯片结果验证的样本最好与用于芯片实验的样本为同一样本，以保证芯片结果与定量结果的一致性。

对用于定量验证的lncRNA序列的获得，分为两点：

1、lncRNA序列的获得

SBC lncRNA检测基因是从各大数据库整合而来，因此，可以根据数据结果中的Accession号在相应的数据库中进行lncRNA序列查找。

Type	Accession	Source
Noncoding	NR_002163	RefSeq
Noncoding	lnc-MTUS2-2:1	lncipedia
Noncoding	lnc-MFSD4-3:1	lncipedia
Noncoding	ENST00000566929	ENSEMBL_GENCODE
Noncoding	NONHSAT107058	NONCODE
Noncoding	ara_hg_1	lncRNAdb

各数据库中lncRNA序列查找:

RefSeq (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>):



Inclopedia (<http://www.Inclopedia.org/>):

1 lncRNA transcripts found (1 pages)

Transcript ID	Gene ID	Location (hg19)
lnc-MTUS2-2:1	lnc-MTUS2-2	chr13:30170020-30170919

TRANSCRIPT: LNC-MTUS2-2:1

Basic information

LNclopedia transcript ID: [lnc-MTUS2-2:1](#)

LNclopedia gene ID: [lnc-MTUS2-2](#)

Location (hg19): [chr13:30170020-30170919](#)

Strand: +

Class: intergenic

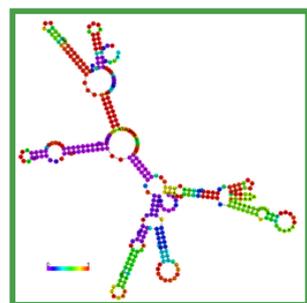
Transcript size: 357 bp

Exons: 2

Sources: Broad Institute; NONCODE v4

Alternative transcript names: [TCONS_00021740](#); [NONHSAT032745](#)

Alternative gene names: [XLOC_010330](#); [linc-USPL1-7](#)



RNA sequence:

```
AGGCGCCCAACCTGGGGTTCCCGGGGGGGGGGGGGCTGCGCCTCCGCTGGCTTCTCAGTAGCTCCGTAGGGGTGTGGCCGTTTCCTCCGCAATCTGAGCGCACCGGGCCACAGCATCTGTGGTCCCTGTCAGATCCACAGCGCCCTGGCCAGAACTAGTGTGCAAGTCCGGCCGTGCCAACCCCTCCGGGGGGGGCCAGGGAGCTCACAGGAACTCGAGACCAGTTTTCCTTTCCTCCAAAATAAAAGATTGGAAAAACAGA  
AAAAACAGTGGACGGTCCGTGGTCTTTGAATCCTTCTACAGGTCCTTCTCAAATATCAGCTGCTGAACATTCCTTGGAAATTAG
```

NONCODE (<http://www.noncode.org/>):



NONCODE is an integrated knowledge database dedicated to non-coding RNAs (excluding tRNAs and rRNAs). Now, there are 16 species in NONCODE2016 (human, mouse, cow, rat, chicken, fruitfly, zebrafish, celegans, yeast...). [More](#)

Accession 号

use NONCODE ID (eg.NONHSAG000001) or Gene Symbol (eg.hotair) or Gene ID used in other databases (eg. refseq, ensembl) we linked.

Page 1 Total Page:1 Total amount:1 First page|Previous page|Next page|Last page

NONCODE ID	Species	Original ID
NONHSAT052359.2	Human	NONHSAT052359

Sequence

```
>NONHSAT052359
GGGCTGACTAGCATTCAAGAGCTTTTGGTTTAAAAGATCAAAACATCCCAGCAGTGTGATCAGTGACAATTCTATTACCATATAAAGTTTCCCAAATCCTTACCCAGCTT
AGTTCTCTGGGAAGCTCTTAATTGTCTCTATTTCTAGGAAGTTATCAAAGATAACAATCTCATATGGAATTACCAACCCCTGTGTAAGAATGAGA
```

Incrnadb (<http://www.incrnadb.org/>):



Long Noncoding RNA Database v2.0: The Reference Database For Functional

Search Incrnadb

Accession 号

Set filter

Any Species Output Per Page 10

Results

Displaying results 1 to 1 of 1

showing refresh << previous next >>

[Download Results as XML](#)

1.ARA - Alias : BX537613, DKFZp686E11117

Description : ARA is located in an intron from PAK3. It is a ~5kb single exon transcript.

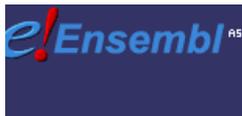
Species : Homo sapiens

Sequences ▾

Sequence Name	Sequence Accessions	Species	Fasta Sequence
ara_hg_1	-	Human	Show Sequence

鼠标左键即可获得序列

ENSEMBL_GENCODE (<http://asia.ensembl.org/index.html>) :

 [BLAST/BLAT](#) | [BioMart](#) | [Tools](#) | [Downloads](#) | [Help & Documentation](#) | [Blog](#) | [Mirrors](#)

Search: for

e.g. BRCA2 or rat 5:62797383-63627669 or rs699 or coronary heart disease

Only searching Human ▾

5 results match ENST00000566929 when restricted to

CTD-2313J23.1-001 (Human Transcript)

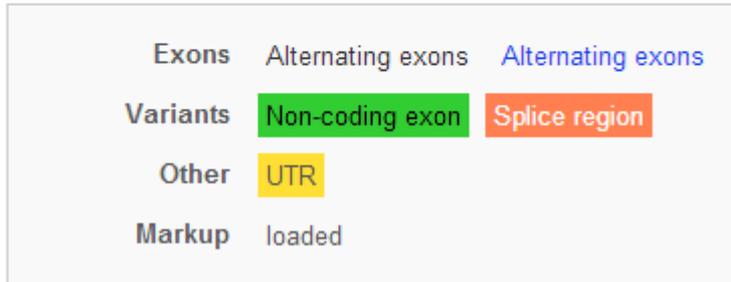
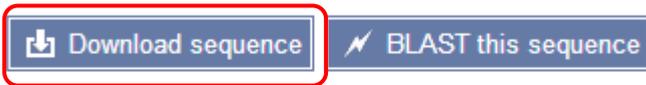
ENST00000566929 16:24472798-24495177:-1

BX538205.1 (European Nucleotide Archive) is used as supporting evidence for transcript

ENST00000566929

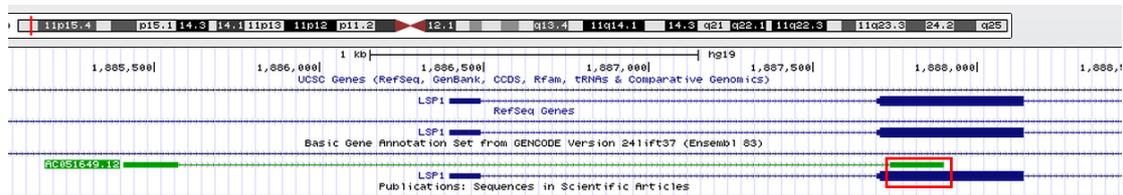
[Location](#) • [External Refs.](#) • **[cDNA seq.](#)** • [Exons](#) • [Variant table](#) • [Population](#)

cDNA sequence ?



2、引物设计序列的选择

由于 lncRNA 从基因组来源的不同，其序列也有不同特点，特别是 “exonic_sense” 类 lncRNA，其来源与 mRNA 外显子的一部分。因此，在引物设计时一定将 lncRNA 与 mRNA 区分开来。如 lncRNA----AC051649.12 (绿色)，和 LSP1 (蓝色) 基因有外显子重叠部分 (APTR 第二个外显子和 LSP1 第一个外显子重叠，红色框标注)：



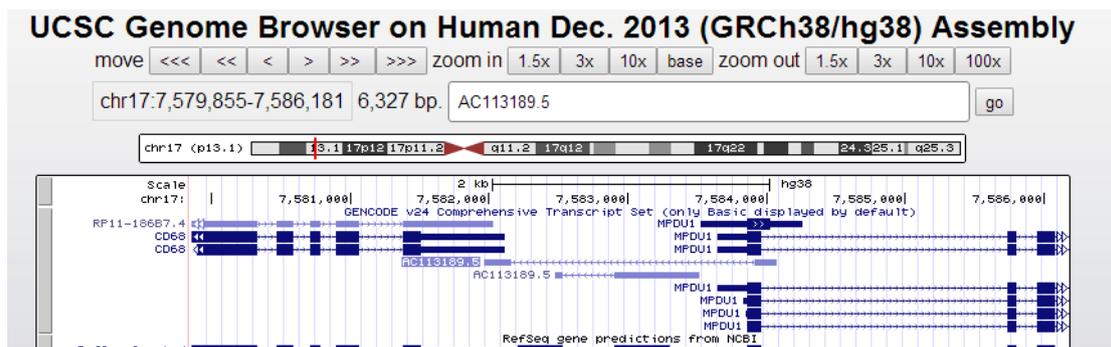
因此，对 AC051649.12 引物设计时，扩增产物应避免和 LSP1 的重叠部分，选择第一个外显子区域进行验证。

对于 “exonic-sense” 类的 lncRNA 与 mRNA 的位置关系，可以在数据库 UCSC (<http://genome.ucsc.edu/index.html>) 上进行分析，选择相应的基因组版本



后，根据lncRNA的

genesymbol进行查找：



通过点击放大倍数，可以查看lncRNA与mRNA的位置重叠关系。

