

miRNA mimic/inhibitor产品使用说明

Version 1.0

❖ 产品简介

mimic是miRNA模拟物, 化学合成的成熟miRNA双链, 产品为冻干粉形式的即用型试剂;

inhibitor是miRNA抑制物, 化学合成的成熟miRNA互补单链, 产品为冻干粉形式的即用型试剂。

❖ 运输保存

产品以冻干粉的形式常温运输。收到产品后, 请于-20℃ ~ -80℃保存, 冻干粉可以稳定保存一年。使用前瞬时低速离心(建议速率1000rpm), 用RNase-free H₂O或灭菌ddH₂O配制成20μM储存液, 分装保存, 避免反复冻融(建议不超过5次)。

表 1: 20μM 储存液的配置方法

miRNA (nmol)	2.5	5	10	50
溶解体积 (ul)	125	250	500	2500

❖ 使用须知:

1) miRNA呈很轻的干膜状附在管壁上, 打开管子前先离心, 然后再慢慢打开管盖, 溶解时请加足量RNase-free H₂O或灭菌ddH₂O后盖上管盖, 震荡溶解。

2) 为避免外界因素(包括酶, 极端pH或者温度条件等)导致产品降解, 所有操作请严格遵循RNA操作规则。

3) 实验过程中, 产品最好于冰上放置, 使用完毕后请于-20℃ ~ -80℃小心保存。

❖ 细胞实验方法：

转染效率对于不同的细胞株和不同的转染试剂是不同的。我们仅以普舟基因高效转染试剂RNATrans为例说明转染方法。

为了降低细胞密度、试剂用量，转染效率等因素导致的孔间差异，保证实验的可靠性和可重复性,我们建议：

- 1) 转染实验中每个转染样品至少设置3个复孔；
- 2) 接种细胞时，每孔接种的细胞数量尽量保持一致，尽量使细胞平均分布。

❖ 温馨建议

1) 为了获得最佳转染结果，每一种细胞系转染miRNA的量都需要经过实验确定。如果您是首次转染您的细胞系，推荐尝试使用几个浓度梯度摸索，一般可在20-100nM范围内。

2) 在30-50%细胞汇合度时进行转染，一般在转染后24-72小时进行检测分析。客户可根据细胞生长速度，实验方案的不同灵活调整细胞密度。

3) 为了获得更好的结果，推荐使用Invitrogen的Opti-MEM培养基稀释RNATrans转染试剂和miRNA，进而形成复合物。

4) 可以使用荧光标记的miRNA帮助优化细胞系的转染条件。一旦确定了用来转染的最佳条件，可以在每一次实验时都带上荧光标记miRNA，作为转染效率的指示剂。

注：miRNA inhibitor 往往需要用到较大的用量才能观察到较好的抑制效果，相当于miRNA mimic的2~4倍用量，这可能与miRNA inhibitor竞争性抑制的作用机制及作用效率有关。因此，当使用推荐的转染浓度没有获得预期效果时，可适当选择更高的浓度（表3）或选择antagomir（无需转染试剂）进行实验。

➤ 转染步骤

以普舟基因高效转染试剂 RNATrans 转染 miRNA 于 24 孔板，转染浓度为 50nM 为例，其他规格容器转染请参考表 2。

1) 接种细胞

贴壁细胞：转染前24 h，在500 μ L培养基中接种 $0.5 - 2 \times 10^5$ 个细胞，使转染时细胞融合度为50 - 70%。（注：铺板时要将细胞消化完全混匀，避免细胞堆积生长）

悬浮细胞：转染前24 h，在500 μ L培养基中接种 $0.5 - 2 \times 10^5$ 个细胞，转染时细胞数量应在 $4 - 8 \times 10^5$ /孔。

2) 转染步骤

A. 用50 μ L Opti-MEM稀释miRNA，轻轻吹吸 3 - 5 次混匀。

B. 移液器轻轻混匀转染试剂，用50 μ L Opti-MEM稀释1.0 μ L RNATrans转染试剂，轻轻吹吸 3 - 5次混匀，室温下静置5 min。

C. 混合转染试剂和miRNA稀释液，轻轻吹吸 3 - 5 次混匀，室温下静置20 min。

D. 转染前，建议更换新鲜无抗培养基400 μ L/孔。

E. 转染复合物（100ul）加入到24孔细胞板中，共500 μ L/孔，轻摇细胞板使混合均匀。

F. 细胞板置于37℃、5% CO₂培养箱中培养18 - 48 hrs。

备注：转染4 - 6 hrs 后可换新鲜培养基，亦可补加新鲜培养基。

3) 效果检测：

miRNA mimic和inhibitor 作用效果往往通过功能方面检测，转染完成后24 ~ 72 小时均可进行检测，最佳检测时间与细胞类型及研究目的有关。以下为几种常用的miRNA效果检测方法：

A) 使用qPCR，基因芯片，新一代测序等方法检测靶基因mRNA转录水平，甚至全基因

表达图谱是否发生相应改变；

B) 使用Western Blot, 蛋白芯片等方法检测靶基因的蛋白水平是否发生相应改变；

C) 检测细胞功能（细胞增殖、细胞凋亡、细胞迁移等）是否发生相应变化；

D) 通过与miRNA靶基因双荧光素酶报告载体（我们可提供构建服务）共转来验证 miRNA mimic/inhibitor的作用

表2 使用RNATrans (puzon)转染 miRNA 产品用量参考

V1: 完全或不完全培养基; v2: Opti-MEM® I (无血清、无抗生素, 转染专用)

	每孔中总体积(v1+v2+v3)	终浓度	miRNA 产品	RNATrans/孔
96-well	100μl (50μl+25μl+25μl)	100nM	0.5μl	0.25μl
	100μl (50μl+25μl+25μl)	50nM	0.25μl	0.25μl
	100μl (50μl+25μl+25μl)	30nM	0.15μl	0.25μl
	100μl (50μl+25μl+25μl)	20nM	0.1μl	0.25μl
	100μl (50μl+25μl+25μl)	10nM	0.05μl	0.25μl
24-well	500μl (400μl+50μl+50μl)	100nM	2.5μl	1μl
	500μl (400μl+50μl+50μl)	50nM	1.25μl	1μl
	500μl (400μl+50μl+50μl)	30nM	0.75μl	1μl
	500μl (400μl+50μl+50μl)	20nM	0.5μl	1μl
	500μl (400μl+50μl+50μl)	10nM	0.25μl	1μl
12well	1mL (800μl+100μl+100μl)	100nM	5μl	2μl
	1mL (800μl+100μl+100μl)	50nM	2.5μl	2μl
	1mL (800μl+100μl+100μl)	30nM	1.5μl	2μl
	1mL (800μl+100μl+100μl)	20nM	1.0μl	2μl
	1mL (800μl+100μl+100μl)	10nM	0.5μl	2μl
6well	2mL (1500μl+250μl+250μl)	100nM	10μl	5μl
	2mL (1500μl+250μl+250μl)	50nM	5μl	5μl
	2mL (1500μl+250μl+250μl)	30nM	3μl	5μl
	2mL (1500μl+250μl+250μl)	20nM	2μl	5μl
	2mL (1500μl+250μl+250μl)	10nM	1μl	5μl

注：表中数据仅供参考，对于部分细胞类型的转染试剂用量可进一步优化。