

miRNA产品使用说明

RN: R10034.3

产品简介

- micron™ miRNA mimic是miRNA模拟物，化学合成的成熟miRNA双链，即用型；
- microff™ miRNA inhibitor是miRNA抑制物，化学修饰的成熟miRNA互补单链，即用型；
- micron™ miRNA agomir是特殊化学修饰的miRNA 激动剂，适用于细胞实验、动物实验，即用型；
- microff™ miRNA antagomir是特殊化学修饰的miRNA 拮抗剂，适用于细胞实验、动物实验，即用型。

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。

使用前瞬时离心，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（不超过5次）。

表1 20μM储存液的配置参考

miRNA(nmol)	0.25	0.5	1	2	5	20
溶解体积(μl)	12.5	25	50	100	250	1000

注：如需进行高内涵筛选试验，可选择miRNA Library。

使用前须知

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。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：

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，一般建议：

- 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，且细胞均匀分布。

1. 转染浓度

miRNA产品最佳工作浓度因不同的细胞类型及研究目的而异。锐博生物推荐的miRNA mimic初始浓度为50nM，miRNA inhibitor浓度为100nM，客户可根据实验具体情况优化转染浓度，优化的范围建议为10~200nM。

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的几倍用量，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。

2. 转染方法

以riboFECT™ CP Reagent 转染miRNA mimic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

a. 贴壁细胞：转染前一天，接种 1×10^5 细胞至含有500μl完全培养基的24孔板培养孔中，使转染时的细胞密度能够达到50~80%。

注：1) 不同细胞的生长速度不同，接种细胞的数量需依经验而定；2) 每孔接种的细胞数量尽量相同，使细胞均匀分布。

b. 悬浮细胞：

接种 1×10^5 – 5×10^5 个细胞至含有 500 μ l 完全培养基的 24 孔板。

2) 转染步骤

对于每个转染样品，请按以下步骤准备：

a. 稀释mimic：用 50 μ l 1X riboFECTTM CP Buffer (v1) 稀释 1.25 μ l 20 μ M miRNA mimic 储存液 (v2)，轻轻混匀，

室温孵育 5min。

b. 混合液制备：加入 5 μ l riboFECTTM CP Reagent (v3)，轻轻吹打混匀，室温孵育 0–15min。

注：1) 请不要振荡，溶液可能会有浑浊，但不会影响转染；2) 混合液可室温放置一段时间，但不宜超过 24h。

c. 将 riboFECTTM CP 混合液加入到 443.75 μ l 细胞培养基 (v4) 中，轻轻混匀。

注：混合液加入原细胞培养基，无需移除或更换。

d. (可选) 进行其他必要的特殊处理 (如加药处理)。

e. 将培养板置于适当的培养条件下培养 24–96h (培养时间与实验目的相关)。

表2 使用 riboFECTTM CP 转染 miRNA mimic 用量参考

v1: riboFECTTM CP Buffer (1X); v2: 20 μ M miRNA mimic 储存液; v3: riboFECTTM CP Reagent; v4: 细胞培养基

	mimic 终浓度	每孔终体积	1X Buffer(v1)	mimic (v2)	Reagent(v3)	培养基(v4)
96-well	100nM	100 μ l	12.5 μ l	0.5 μ l	1.25 μ l	85.75 μ l
	50nM	100 μ l	12.5 μ l	0.25 μ l	1.25 μ l	86.00 μ l
	30nM	100 μ l	12.5 μ l	0.15 μ l	1.25 μ l	86.10 μ l
	20nM	100 μ l	12.5 μ l	0.1 μ l	1.25 μ l	86.15 μ l
	10nM	100 μ l	12.5 μ l	0.05 μ l	1.25 μ l	86.20 μ l
24-well	100nM	500 μ l	50 μ l	2.5 μ l	5 μ l	442.50 μ l
	*	50nM	500 μ l	1.25 μ l	5 μ l	443.75 μ l
	30nM	500 μ l	50 μ l	0.75 μ l	5 μ l	444.25 μ l
	20nM	500 μ l	50 μ l	0.5 μ l	5 μ l	444.50 μ l
	10nM	500 μ l	50 μ l	0.25 μ l	5 μ l	444.75 μ l
12-well	100nM	1ml	100 μ l	5 μ l	10 μ l	885.00 μ l
	50nM	1ml	100 μ l	2.5 μ l	10 μ l	887.50 μ l
	30nM	1ml	100 μ l	1.5 μ l	10 μ l	888.50 μ l
	20nM	1ml	100 μ l	1 μ l	10 μ l	889.00 μ l
	10nM	1ml	100 μ l	0.5 μ l	10 μ l	889.50 μ l
6-well	100nM	2ml	250 μ l	10 μ l	25 μ l	1715.00 μ l
	50nM	2ml	250 μ l	5 μ l	25 μ l	1720.00 μ l
	30nM	2ml	250 μ l	3 μ l	25 μ l	1722.00 μ l
	20nM	2ml	250 μ l	2 μ l	25 μ l	1723.00 μ l
	10nM	2ml	250 μ l	1 μ l	25 μ l	1724.00 μ l

注：1) *：实验示例用量参考。2) 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。3) 转染质粒时，转染试剂用量可优化至 1 μ l (24孔板)。

3) 效果检测

miRNA mimic/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的miRNA有关。以下为几种常用的miRNA效果检测方法：

- 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；
- 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；
- 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；
- 通过靶基因siRNA来确认miRNA mimic/inhibitor的作用；
- 通过与miRNA靶基因双荧光素酶报告载体（锐博生物可提供构建服务）共转染验证miRNA mimic/inhibitor的作用。

表3 细胞实验miRNA mimic、inhibitor、agomir、antagomir用量参考

Reference	miRNA	Cell	mimic	inhibitor	agomir	antagomir*
Meister G, et al. <i>RNA</i> . 2004	miR-21	HeLa S3	40nM	120nM	N/A	N/A
Poy M, et al. <i>Nature</i> . 2004	miR-375	MIN6	200nM	200nM	N/A	N/A
Lim L, et al. <i>Nature</i> . 2005	miR-1, miR-124	HeLa	100nM	N/A	N/A	N/A
Chen J F, et al. <i>Nat. Genet</i> . 2006	miR-1, miR-133	C2C12	200nM	200nM	N/A	N/A
Schratt G, et al. <i>Nature</i> . 2006	miR-134	Primary neurons	10μM	20μM	N/A	N/A
Shan Y, et al. <i>Gastroenterology</i> . 2007	miR-122	Huh-7 WT, CNS3	50nM	N/A	N/A	50nM
Brian D, et al. <i>Mol Ther</i> . 2007	miR-206	HeLa, MDA-231, MCF-7	50nM	N/A	N/A	20~50nM
R Luthra, et al. <i>Oncogene</i> . 2008	miR-196a	Breast cancer	40nM	N/A	N/A	N/A
Zhu H, et al. <i>Biochem Pharmacol</i> . 2008	miR-27a, miR-451	A2780	100nM	N/A	N/A	100nM
Alla Musiyenko, et al. <i>J Mol Med</i> . 2008	miR-126, miR-126*	LNCaP	10~30nM	N/A	N/A	10~30nM
Jia Yu, et al. <i>PNAS</i> . 2008	miR-184, miR-205	HeLa, HEKs	10nM	N/A	N/A	1μM
Federica et al. <i>Cancer Res</i> . 2008	miR-221, miR-222	Me665/1	N/A	N/A	N/A	50~250nM
Relja Popovic, et al. <i>Blood</i> . 2009	miR-196b	bone marrow cells	N/A	N/A	N/A	100nM
Pascal Pineau, et al. <i>PNAS</i> . 2010	miR-221, miR-222	hepatocellular carcinoma-derived	N/A	N/A	N/A	100μM
Feng S, et al. <i>Nucleic Acids Res</i> . 2011	miR-191, miR-192	A549, HEK293, HeLa, H460, 95D	50nM	50nM	N/A	N/A
Xiaogang Wang, et al. <i>Nat Med</i> . 2012	miR-214	MC3T3-E1, hFOB	200μM	200μM	N/A	200μM
Li Y, et al. <i>Mol Carcinog</i> . 2012	miR-200c	Hela	50nM	100nM	N/A	N/A
Luo M, et al. <i>PLoS One</i> . 2012	miR-450a-3p	MEF	50nM	N/A	N/A	N/A
Jin C, et al. <i>FEBS Lett</i> . 2013	miR-21	HUVEC	50nM	100nM	N/A	N/A
Wang X, et al. <i>Nat Med</i> . 2013	miR-214	MC3T3-E1	N/A	N/A	200nM	200nM

*: 部分文献报道antagomir不用转染试剂

动物实验方法：

miRNA动物实验的体内环境复杂，实验周期长，对miRNA产品的稳定性提出了更高的要求。

miRNA动物实验方法主要分为两类，局部作用和全身作用。锐博生物推荐采用稳定性更好、可靠性更高的化学修饰miRNA agomir和antagomir进行动物实验，具体方案需要依据实验目的及条件而定（具体用量请参考表4）。

表4 动物实验agomir和antagomir用量参考

Reference	miRNA	Animal	Delivery	Doses	Volume	Injection Times	Detection
Min-Jie Ni, et al. PLOS ONE 2011	mi1-HongES2	7-10 days SD rat	cauda epididymis injection	4nmol per side	N/A	N/A	3 days after injection
Dong Li, et al. JBC 2011	miR-99a	nude mice	tumor mass injection	10nmol	0.1 ml per injection	every three days for two weeks	2-4 weeks after injection
Jin Hou, et al. Cancer Cell 2011	miR-199a/b-3p	nude mice	tumor mass injection	10nmol	0.1 ml per injection	once every three days for two weeks	2-4 weeks after injection
Kutzfeldt J, et al. Nature 2005	miR-122 miR-192	6-week-old mice	tail-vein injections	80 mg per kg body weight	0.2 mL per injection	1 to 3 consecutive days	24 h after the last injection
Jean Krutzfeldt, et al. Nucleic Acids Research 2007	miR-16	6-week-old mice	Intracerebral injection	~800 ng per mouse	0.2 ml per injection	a single injection	72 h after injection
Alessandra Care, et al. Nature Medicine 2007	miR-133	8-week-old mice	minipump implantation	80 mg per kg body weight	N/A	a single infusion	1 month after minipump implantation
Laura Fontana, et al. PLOS ONE 2008	miR-17-5p	6-week-old nude mice	intratumorally injection	0.2 ng per mouse	0.1 ml	three times per week for two weeks	2 weeks after the first injection
Thomas Thurn, et al. Nature 2008	miR- 21	10-12 weeks old mice	jugular vein catheter	80 mg per kg body weight	N/A	injected daily for three days	3 weeks after the first injection
Neri Mercatelli, et al. PLOS ONE 2008	miR-221 miR-222	6-week-old mice	intratumorally injection	1 ug of each antagomir	40 µl	at day 0, 5 and 9, for a injections per tumor	N/A
Ashutosh Dharap, et al. J Cereb Blood Flow Metab 2009	miR-145	rat	minipump implantation	totally 960 pmol each rat	48 µl	N/A	N/A
L.H. Xie H, et al. J Clin Invest 2009	miR-2861	6-week-old female mice	tail vein injection	80 mg/kg body weight	0.2 ml per injection	days 1 to 3 for 3 consecutive weeks	4 days, 3 weeks, and 6 weeks after the last injection
Bonaure A, et al. Science 2009	miR-92	mice	intravenous injection	8 mg per kg of body weight	0.2 ml per injection	at days 0, 2, 4, 7, 9 of the left coronary artery	14 days
Jie Ding, et al. Nature cell biology 2010	miR-151-5p	nude mice	transplantation	2x10 ⁶ cells transfected by antagomir	N/A	N/A	5 weeks after injection
Linfu Liang, et al. Hepatology 2010	miR-125b	6-8 weeks old nude mice	subcutaneously injection	2x10 ⁶ cells transfected by antagomir	N/A	N/A	4 weeks after injection
Mingfeng Shu, et al. Molecular Cancer 2011	miR-335	4-week-old nude mice	intratumorally injection	4 mg/ml	50 µl	every two days for 2 weeks	2 weeks after the first injection