

miRNA 产品使用说明书

产品描述

芊陌生物可为客户定制提供各种不同长度、不同形式的 miRNA mimic/inhibitor/ Agomir/ Antagomir, microRNA 序列来自 miRbase 数据库 (<https://www.mirbase.org/>)。

QM miRNA mimic 是 miRNA 模拟物, 化学合成的成熟 miRNA 双链, 即用型, 适用于细胞实验; 利用 QM miRNA mimics 模拟 microRNA 活性来研究 QMin-of-function 效应。

QM miRNA inhibitor 是 miRNA 抑制物, 化学修饰的成熟 miRNA 互补单链, 即用型, 适用于细胞实验; 利用 QM miRNA inhibitors 抑制 microRNA 活性来研究 Loss-of-function 效应。

QM miRNA agomir 是特殊化学修饰的 miRNA 激动剂, 适用于细胞实验、动物体内实验, 即用型; 属于 QM miRNA mimic 的升级产品, 与 miRNA mimics 相比, Agomir 与细胞膜亲和力更高, 特别适合动物体内实验, 并且在体内实验中具有更高的稳定性和过表达效果, 可采用全身注射或局部注射等多种方式给药, 操作简便。

QM miRNA antagomir 是特殊化学修饰的 miRNA 拮抗剂, 适用于细胞实验、动物体内实验, 即用型。属于 QM miRNA inhibitor 的升级产品, 与 miRNA inhibitor 相比, antagomir 与细胞膜亲和力更高, 特别适合动物体内干扰实验, 并且在体内实验中具有更高的稳定性和抑制效果, 可采用全身注射或局部注射等多种方式给药, 操作简便。

使用前须知

产品形式: 冻干粉(由于影响结晶形态的因素很多, 产品外观有些差异, 甚至形态无法用肉眼可见, 此为正常现象)

纯化方式: HPLC 纯化

运输条件: 常温运输

储存条件: 请于 -20°C ~ -80°C 条件下存放, 冻干粉可以稳定保存一年。

注意事项 1: miRNA 产品在操作过程中, 需注意避免 (核酸酶 RNAase, 温度, 极端 PH 等) 可能导致的产品降解。请遵循 RNA 操作规范, 带手套操作, ep 管, 移液枪和枪头等都要避免污染, 实验过程中, 产品最好于冰上放置。

注意事项 2: 使用前请瞬时离心 (在最大转速约为 4,000g 的低速条件下离心装有 miRNA 产品的 EP 管, 让 miRNA 聚集在试管的底部) 轻轻的打开管盖, 用 DEPC 水或者无 RNAase 水配制成 20μmol/L 的 miRNA mimic/inhibitor 储存液, 柔和地用移液枪吹打充分混匀 miRNA 储存液。分装保存于 -20°C ~ -80°C, 避免反复冻融 (不超过 5 次)。

QM miRNA mimic / inhibitor	3nmol	5nmol
DEPC 水	150ul	250ul

表 1 20μmol/L 的 miRNA 储存液的配置参考

注: 若搭配 QM-RNA Transfection Kit 转染试剂不得使用 PBS 或培养基稀释 miRNA

备注：1. miRNA mimic 保证序列正确、质量和纯度达标，在细胞转染效率能够达到 80%及以上的情况下，保证目标 miRNA 的 qPCR 方法能检测到目标 miRNA 上调显著性差异（与 mimic NC 对照比较）。由于 miRNA 靶基因调控因素较多，不保证其调控相关基因变化。

2. miRNA inhibitor/antagomir 保证序列正确、质量和纯度达标，但 miRNA inhibitor/antagomir 的作用原理属于竞争性结合目标 miRNA，并非改变 miRNA 的生成量（inhibitor/antagomir 对目标 miRNA 的结合并不一定会降解目标 miRNA，不同的 miRNA 各有不同，所以 qPCR 并不一定会检测到目标 miRNA inhibitor/antagomir 处理组相比 inhibitor/antagomir NC 组目标 miRNA 的显著下调），从而封闭目标 miRNA，目标 miRNA 被 inhibitor/antagomir 竞争性结合之后，就会导致大量的 miRNA 无法再去结合靶基因，从而实现对 miRNA 的 Loss-of-function 效应。其效果检测可通过检测靶基因的蛋白表达水平，或者通过萤光素酶报告系统。

3. miRNA agomir 保证序列正确、质量和纯度达标，但因为 agomir 本身是做了特殊的化学修饰了，修饰本身可能会影响 miRNA 的 qPCR 检测，所以相比 agomir NC 组，miRNA agomir 处理组，并不一定能够检测到目标 miRNA 的显著上调。miRNA agomir 可以通过 Northern Blot 检测 miRNA 表达。

4. mimic 需要用对应的 mimic NC, inhibitor 需要用对应的 inhibitor NC、agomir 需要用对应的 agomir NC, antagomir 需要用对应的 antagomir NC 作为阴性对照，阴性对照 NC 不可混用，因为 mimic/agomir 是双链 RNA，inhibitor/ antagomir 是单链 RNA。建议使用对应 NC 作为对照组，以排除实验可能因为应激而产生的假阳性结果。

miRNA mimic/inhibitor 的细胞转染步骤

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. 接种细胞时的每个孔的细胞密度，数量保持尽可能一致，且细胞均匀分布。

2. 转染实验每个转染处理组建议设置至少 3 个复孔；

3：芊陌生物推荐的 QM miRNA mimic 转染终浓度为 40nmol/L, QM miRNA inhibitor 转染终浓度为 80nmol/L 该浓度对于多数情况可以达到较为理想的 miRNA 过表达/抑制效果，不同类型的细胞以及研究目的的 miRNA mimic/inhibitor 的最佳转染终浓度各不相同。最佳转染效率建议通过调整 miRNA mimic/inhibitor 的用量（优化范围推荐 5~200nmol/L）来进行优化。

4：转染时的细胞密度应根据搭配使用的转染试剂，细胞生长速度、大小、后续检测时间等条件进行调整。

转染步骤示例：

以芊陌生物的 QM-RNA Transfection 转染试剂（转染试剂组成见表 2）转染 miRNA mimic（6 孔板，miRNA mimic 转染终浓度为 40nmol/L）为例，其他规格容器的试剂用量请参考表 3/4，若使用其它转染试剂，请参考对应转染试剂说明书。

芊陌生物的 QM-RNA Transfection Kit 转染试剂

QM-RNA Transfection Kit 转染试剂是一种专门用于小片段 RNA（siRNA /ASO / miRNA mimic/ miRNA inhibitor /piRNA / tRNA 等）的高效低毒转染试剂（不建议转染质粒），极具生物相容性，转染效率优异，细胞毒性小。该转染试剂转染操作方便，快捷，高效。

QM-RNA Transfection Kit 组成	100ul	0.5ml	1ml
QM-RNA Reagent	100ul	0.5ml	1ml
QM-RNA Buffer	1000ul	5ml	10ml

表 2 QM-RNA Transfection Kit 转染试剂成分组成及规格

注) QM-RNA Transfection Kit 转染试剂为常温运输，长期储存为 2~8℃保存，可稳定保存一年，不可冷冻，冷冻后会破坏 Reagent 组分的结构和性状，会极大的影响细胞转染效果。推荐转染

前细胞密度 50% ~80%为最佳。

1、细胞接种：

贴壁细胞：以 293T 细胞为例，接种 $\sim 0.4 \times 10^6$ 个细胞到含 2mL 完全培养基的六孔板培养孔中，使细胞转染时达到 50-80%细胞密度。

悬浮细胞：以 THP-1 细胞为例，接种 $\sim 0.5 \times 10^6$ 个细胞至含 2mL 完全培养基的六孔板培养孔中。

注) 1: 不同细胞初始接种数量依据不同的细胞大小，细胞类型和细胞生长速度，培养时间，实验目的相应调整，每个孔接种的细胞数量尽可能相同，且细胞均匀分布。

2: 悬浮细胞、免疫细胞、原代细胞本身的特性普遍比较难转染，可通过调整 miRNA mimic/inhibitor 用量以及转染试剂的用量，不同的转染试剂及尽可能规范实验操作等来尝试提高转染效果，如无明显改善可更换为电转方式或其他方法。

2、miRNA 转染

miRNA 预混液制备：取无菌无酶 EP 管一支，加入 46ul 的 QM-RNA Buffer 和 4ul 的 20umol/L 的 miRNA mimic 储存液，吹打混匀。

miRNA-QM 转染复合物制备：取 7.5uL 的 QM-RNA Reagent 加入到 miRNA 预混液的 EP 管中，移液枪充分吹打混匀 20 次以上，或者旋涡 2-3s。

注：a)转染复合物在室温下可稳定存放 8 小时，请勿将 miRNA-QM 转染复合物置于冷冻条件。

b) RNA/QM-RNA Reagent 的比例是 QM-RNA Transfection 转染试剂包封的关键因素，如需增减每孔 miRNA 用量，您可以按比例增加或减少加入细胞的 **miRNA-QM 转染复合物** 的体积。

将 **miRNA-QM 转染复合物** 加入到待转染的孔板的细胞培养基中，轻轻混匀。

逆行其他必要的特殊处理（可选，如加药处理等具体依据具体实验情况来确定）。

将培养板置于 37°C 的 CO₂ 培养箱中培养 24~96h（培养时间与实验目的相关，qPCR 一般为转染后 24-48h 收集细胞提取 RNA 检测 RT-qPCR；WB 一般为转染后 48-96h 收集细胞检测 WB）

试剂	孔板			
	96 孔(ul)	24 孔(ul)	12 孔板	6 孔(ul)
QM-RNA Buffer	2.3	11.5	23	46
20umol/L miRNA mimic 储存液	0.2	1	2	4
QM-RNA Reagent	0.38 或 0.75	1.9 或 3.8	3.8 或 7.5	7.5 或 15

表 3 终浓度 40nmol/L mimic 不同培养皿的推荐转染用量

试剂	孔板			
	96 孔(ul)	24 孔(ul)	12 孔板	6 孔(ul)
QM-RNA Buffer	4.6	23	46	92
20umol/L miRNA inhibitor 储存液	0.4	2	4	8
QM-RNA Reagent	0.75 或 1.5	3.8 或 7.5	7.5 或 15	15 或 30

表 4 终浓度 80nmol/L inhibitor 不同培养皿的推荐转染用量

注)提供 2 种不同的 QM-RNA Reagent 转染浓度, 具体浓度可根据不同的细胞摸索选择, 对于多数细胞通常按照低剂量 QM-RNA Reagent 用量即可达到理想的转染效果。

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, 最佳检测时间依据不细胞类型及研究的 miRNA 以及具体检测的内容指标密切相关。以下为几种常用的 miRNA 效果检测方法:

1. 使用 qRT-PCR, 基因测序等方法检测靶基因 mRNA 转录水平, 甚至全基因表达谱是否发生变化。检测时间点通常建议为转染后 24-48h 检测。

注: miRNA 也可能通过抑制翻译的机制直接影响靶基因的表达水平, mimic/inhibitor 对靶基因表达的影响往往需要进一步验证。

2. 使用 WB, 蛋白组学等方法检测靶基因的蛋白水平是否发生相应改变。检测时间点通常建议为转染后 48-96h 检测。

3. 检测细胞功能(细胞增殖、凋亡、迁移、周期等)是否发生相应变化。

4. 通过和 miRNA 靶基因双荧光素酶报告载体(芊陌生物可提供双荧光素酶报告基因质粒构建服务和 miRNA 靶点验证实验服务)共转来验证 miRNA mimic/inhibitor 的作用。

温馨提示: 如涉及到使用本公司产品发表文章请引用产品来源, QianMoBio Co. Ltd, Shanghai, China, 上海芊陌生物科技有限公司。对于引用注释本公司产品发表的 SCI paper, 联系销售或者本公司, 可获取对应的科研奖励金。