

# miRNA 产品使用说明

## miRNA 产品简介

**miRNA mimic** 是 **miRNA** 模拟物化学合成的成熟 **miRNA** 双链, 即用型

**miRNA inhibitor** 是 **miRNA** 抑制物化学修饰的成熟 **miRNA** 互补单链, 即用型

**miRNA agomir** 是特殊化学修饰的 **miRNA** 激动剂适用于细胞、动物实验, 即用型

**miRNA ant agomir** 是特殊化学修饰的 **miRNA** 拮抗剂适用于细胞、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 H<sub>2</sub>O 或灭菌 ddH<sub>2</sub>O, 配制成 20μM 储存液, 分装保存, 避免反复冻融 (不超过 5 次)。

表 1 20 μM 储存液的配置

miRNA	5 nmol	20 nmol
溶解体积	250 μl	1000 μl

注: 如需进行高内涵筛选试验, 可进行 **miRNA library**。

## 使用前须知

产品以冻干粉的形式提供, 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。

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, 且细胞在各孔的表面平均分布。

## 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。中实同创推荐的 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或选择 antagomir 进行实验。

## 2. 转染方法

以 Reagent 转染 miRNA mimic 于 24 孔板, 转染浓度为 50nM 为例, 其他规格容器的试剂用量请参考表 2, 若使用其它转染试剂, 请参考对应转染试剂说明书。

### 1) 接种细胞

a. 贴壁细胞: 以 HeLa 细胞为例, 接种  $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$  个细胞至含有适量完全培养基的 24 孔板培养孔中, 使转染时的细胞密度能够达到 30~50%。

b. 悬浮细胞: 以 THP1 细胞为例, 接种  $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$  个细胞至含有适量完全培养基的 24 孔板培养孔中。

注: 1) 不同细胞生长速度不同, 接种数量及密度需依据细胞类型, 培养时间, 实验目的而且 2 每孔接种的细胞数量应尽量相同, 使细胞均匀分布。

### 2) 转染

对于每个转染样品, 请按以下步骤准备:

a. 稀释 mimic: 用 30 $\mu$ l 1 $\times$ Buffer 稀释 1.25 $\mu$ l 20 $\mu$ M miRNA mimic 轻轻混匀。

b. 混合液制备: 加入 3 $\mu$ l Reagent, 轻轻吹打混匀, 室温孵育 0~15min。

注: 1) 请勿振荡, 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. 将混合液加入到无双抗完全培养基中, 轻轻混匀。

注: 混合液加入至原细胞培养基, 一般无需移除或更换, 但需依据客户具体实验情况而定。

d. 或者进行其他必要的特殊处理 (如加药处理)。

e. 将培养板置于 37 $^{\circ}$ C 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24~96h (培养时间与实验目的相关)。

表 2 转染 miRNA mimic 用量参考

	mimic 终浓度	每孔体积	培养基	Buffer	mimic	Reagent
96-well	100nM	100 $\mu$ l	92.90 $\mu$ l	6 $\mu$ l	0.5 $\mu$ l	0.6 $\mu$ l
	50nM	100 $\mu$ l	93.15 $\mu$ l	6 $\mu$ l	0.25 $\mu$ l	0.6 $\mu$ l
	30nM	100 $\mu$ l	93.25 $\mu$ l	6 $\mu$ l	0.15 $\mu$ l	0.6 $\mu$ l
	20nM	100 $\mu$ l	93.30 $\mu$ l	6 $\mu$ l	0.1 $\mu$ l	0.6 $\mu$ l
	10nM	100 $\mu$ l	93.35 $\mu$ l	6 $\mu$ l	0.05 $\mu$ l	0.6 $\mu$ l
24-well	100nM	500 $\mu$ l	464.50 $\mu$ l	30 $\mu$ l	2.5 $\mu$ l	3 $\mu$ l
	50nM	500 $\mu$ l	465.75 $\mu$ l	30 $\mu$ l	1.25 $\mu$ l	3 $\mu$ l
	30nM	500 $\mu$ l	466.25 $\mu$ l	30 $\mu$ l	0.75 $\mu$ l	3 $\mu$ l
	20nM	500 $\mu$ l	466.50 $\mu$ l	30 $\mu$ l	0.5 $\mu$ l	3 $\mu$ l
	10nM	500 $\mu$ l	466.75 $\mu$ l	30 $\mu$ l	0.25 $\mu$ l	3 $\mu$ l
12-well	100nM	1ml	929.00 $\mu$ l	60 $\mu$ l	5 $\mu$ l	6 $\mu$ l
	50nM	1ml	931.50 $\mu$ l	60 $\mu$ l	2.5 $\mu$ l	6 $\mu$ l
	30nM	1ml	932.50 $\mu$ l	60 $\mu$ l	1.5 $\mu$ l	6 $\mu$ l
	20nM	1ml	933.00 $\mu$ l	60 $\mu$ l	1 $\mu$ l	6 $\mu$ l
	10nM	1ml	933.50 $\mu$ l	60 $\mu$ l	0.5 $\mu$ l	6 $\mu$ l
6-well	100nM	2ml	1858.00 $\mu$ l	120 $\mu$ l	10 $\mu$ l	12 $\mu$ l
	50nM	2ml	1863.00 $\mu$ l	120 $\mu$ l	5 $\mu$ l	12 $\mu$ l
	30nM	2ml	1865.00 $\mu$ l	120 $\mu$ l	3 $\mu$ l	12 $\mu$ l
	20nM	2ml	1866.00 $\mu$ l	120 $\mu$ l	2 $\mu$ l	12 $\mu$ l
	10nM	2ml	1867.00 $\mu$ l	120 $\mu$ l	1 $\mu$ l	12 $\mu$ l

注：实验参考用量示例 对于部分细胞类型需要进一步优化

### 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：

- a. 使用 qRT-PCR，基因芯片，新一代测序等方法检测靶基因 mRNA 转录水平，甚至全基因表达谱是否发生变化。  
注：miRNA 可能通过抑制翻译的机制直接影响靶基因的蛋白表达水平，mimic/inhibitor 对靶基因表达的影响往往需要进一步验证。
- 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. 研究 miRNA mimic 对靶基因的影响可以以验证有效的 siRNA 作为阳性对照。
- e. 通过与 miRNA 靶基因双荧光素酶报告载体（中实基因可提供构建服务）共转来验证 miRNA mimic/inhibitor

#### 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，细胞移植和直接给药。中实同创推荐采用稳定性更好、可靠性更高的化学修饰 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 3。

#### FAQ

1. 如何检测 miRNA mimic、inhibitor、agomir、antagomir 的使用效果？对目的 miRNA 进行 qPCR 检测可以吗？

使用 mimic 后可以采用 qPCR 对 miRNA 进行过表达验证，但 inhibitor 不适用。因为从工作原理上讲，inhibitor 是与 miRNA 发生结合从而抑制了 miRNA 发挥作用，它并非改变了 miRNA 的生成。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。Agomir 与 antagomir 由于增加了化学修饰，可能会对 qRT-PCR 造成一定的影响，可能通过 qPCR 方法验证使用效果。agomir 可以通过 Northern Blot 检测 miRNA 表达，antagomir 可以通过检测 miRNA 的靶基因表达来验证其使用效果。

2. Mimic 与 inhibitor、agomir 与 antagomir 的阴性对照（NC）是否可以通用？一定要使用 NC 吗？

不能通用, 因为 mimic/agomir 是双链 RNA, inhibitor/antagomir 是单链 RNA。建议要使用 NC 作为对照组, 以排除可能因为应激而产生的假阳性结果。

表 3 动物实验 agomir 和 antagomir 用量参考

Reference	Agomir & Antagomir	Animal	Delivery	Doses	Detection
Jie Ding, <i>et al. Nat. Cell Biol.</i> 2010	hsa-miR-151a-5p antagomir	mice	intrahepatic injection with antagomir-151-5p treated GFP-labeled MHCC-LM3 cells	N/A	5 weeks after injection
Fei Wang, <i>et al. J. Cell. Biochem.</i> 2012	rno-miR-21-5p antagomir	rats	applied with the F-127 pluronic gel	0.24 mg/200 µl, 20% F-127 pluronic gel	21 days after injury
Tao Li, <i>et al. J. Urol.</i> 2012	hsa-miR-21-5p antagomir	mice	intratumoral injection	0.2 mg, 3 times per week for 2 weeks.	35 days after the first injection
Minfeng Shu, <i>et al. Mol. Cancer.</i> 2011	hsa-miR-335-5p antagomir	mice	intratumoral injection	0.2 mg, every two days for 2 weeks	3 weeks after the first injection
Yanjie Lu, <i>et al. Circulation.</i> 2010	mmu-miR328-3p antagomir	mice	tail vein injection	80 mg per kg body weight, 1 to 3 consecutive days	0-14 days after the first injection
Hui Li, <i>et al. J. Clin. Invest.</i> 2009	mmu-miR-2861 antagomir	mice	tail vein injection	80 mg per kg body weight, 1 to 3 consecutive days	4 days, 3 weeks and 6 weeks after the first injection
Xiaogang Wang, <i>et al. Nat. Med.</i> 2013	mmu-miR-214-3p antagomir	mice	tail vein injection with bone-targeting delivery system	10 µg per kg body weight, 1 to 3 consecutive days, or every two weeks in 6 weeks	2 weeks or one month after the last injection
Tao Wang, <i>et al. Am. J. Pathol.</i> 2012	mmu-miR-21a-5p antagomir	mice	dermis injection	16 µg per wound for one time	0-18 days after the first injection
Jian-Zhong Hu, <i>et al. J. Neurotrauma.</i> 2013	rno-miR-21-5p antagomir	rats	intrathecal injection	20 nmol/mL, 1 µL/h for 3 days	4 weeks after injection
Linhui Liang, <i>et al. Hepatology.</i> 2010	hsa-miR-125b-5p antagomir	mice	subcutaneous transplantation with antagomir-125b treated SK-Hep-1 cells	N/A	4 weeks after transplantation
Yanxin Chang, <i>et al. J. Hepatol.</i> 2013	hsa-miR-20a-5p antagomir	mice	subcutaneous or spleen transplantation with antagomir-20a treated CBC-SD cells	200 nM	2 weeks after transplantation
Meijuan Zhou, <i>et al. Carcinogenesis.</i> 2013	hsa-miR-365-3p antagomir	mice	subcutaneous transplantation with antagomir-365 treated A431 cells and intratumoral injection with antagomir-365	100 nM, treated for 24h; 2.5 pmol per tumor mass 3 times per week for two weeks	21 days after treatment
San-Jian Yu, <i>et al. Clin. Cancer Res.</i> 2013	hsa-miR-200a-3p antagomir	mice	tail vein injection with antagomir-200a treated MCF-7 cells	N/A	3 weeks after injection
Met Wang, <i>et al. Eur. J. Cancer.</i> 2013	hsa-miR-17-5p antagomir	mice	intratumoral injection	N/A	20 days after injection
Wang-Yu Cai, <i>et al. J. Cell Sci.</i> 2013	mmu-let-7a-5p agomir	mice	intramammary infusion	5 nmol every three days for 4 times	20 days after the first injection
CL Xu, <i>et al. Mol. Cancer Ther.</i> 2013	hsa-miR-100-5p agomir	mice	intratumoral injection	2 nmol every three days for 4 weeks	5 weeks after injection

