

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 antagonist 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°C~-80°C保存，冻干粉可以稳定保存一年。使用前瞬时离心，用于细胞实验时，用灭菌无酶水配制成 20 μM 储存液（配置参考见表 1），分装保存，避免反复冻融（不超过 5 次）。用于动物实验时，用生理盐水等实验动物等渗溶剂溶解至注射所需体积后使用。

表 1 20 μM 储存液的配置参考

miRNA mimic/inhibitor	5 nmol	20 nmol
灭菌无酶水	250 μL	1000 μL

注:miRNA mimic/inhibitor 需要的溶剂体积可由 mimic/inhibitor 的量除以拟溶解成的浓度获得,其它规格的 mimic/inhibitor 溶解为 20 μM 储存液也可以根据上表按比例计算得到所需的灭菌无酶水的体积。

使用前须知

- 1) 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，甚至无法用肉眼观察到，此为正常现象。
- 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 操作要求。
- 3) 开盖前瞬时离心，沿管壁轻柔加溶剂，于室温溶解半小时，并涡旋振荡数次促溶，完全溶解后及实验过程中，产品最好于冰上放置，使用完毕后请于-20°C~-80°C小心保存。
- 4) 寡核酸转染效率主要为细胞性质和转染方法所决定，需针对具体实验细胞选择合适的转染方法。
- 5) 使用过程请佩戴一次性手套等防护用品。
- 6) 本试剂仅供科研使用，不可用于体外诊断或治疗。

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可靠性和重复一般建议：

- 1) 可对转染实验中每个转染样品设置复孔；
- 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。锐博生物推荐的 miRNA mimic 初始浓度为 50 nM，miRNA inhibitor 浓度为 100 nM，客户可根据实验具体情况优化转染浓度，优化的范围分别建议为 10~100 nM 和 100~200 nM。

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，这可能跟 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 50 nM 为例，其他规格容器或 mimic/inhibitor 浓度的用量请参考表 2。若使用其它转染试剂或转染方法请参考具体的试剂或仪器说明。

注：转染成功是 mimic/inhibitor 发挥作用的前提，寡核酸转染效率主要为细胞性质和转染方法所决定，需要选择对实验细胞转染率高且毒性低的转染试剂和转染方法。

1) 接种细胞

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%。

注：1) 需根据细胞的增殖速度、对转染的毒性反应以及检测时间等调整转染时的细胞密度，除特定实验（如划痕实验等）外，一般以到检测时间点时细胞未完全长满为宜；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. 转染复合物配制：用 $30 \mu\text{L}$ $1 \times$ riboFECT CP Buffer (v2) 稀释 $1.25 \mu\text{L}$ $20 \mu\text{M}$ miRNA mimic (v3)，轻轻混匀；然后加入 $3 \mu\text{L}$ riboFECT CP Reagent (v4)，轻轻吹打混匀，室温孵育 0~15 分钟，制备成转染复合物。

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 24 小时。

表 2 使用 riboFECT CP 转染 miRNA mimic 用量参考

v1: 细胞培养基; v2: $1 \times$ riboFECT CP Buffer; v3: $20 \mu\text{M}$ miRNA mimic; v4: riboFECT CP Reagent

	mimic 终浓度	每孔体积	培养基(v1)	$1 \times$ Buffer (v2)	mimic (v3)	Reagent (v4)
96-well	100 nM	100 μL	92.90 μL	6 μL	0.5 μL	0.6 μL
	50 nM	100 μL	93.15 μL	6 μL	0.25 μL	0.6 μL
	30 nM	100 μL	93.25 μL	6 μL	0.15 μL	0.6 μL
	20 nM	100 μL	93.30 μL	6 μL	0.1 μL	0.6 μL
	10 nM	100 μL	93.35 μL	6 μL	0.05 μL	0.6 μL
24-well	100 nM	500 μL	464.50 μL	30 μL	2.5 μL	3 μL
	*	50 nM	465.75 μL	30 μL	1.25 μL	3 μL †
	30 nM	500 μL	466.25 μL	30 μL	0.75 μL	3 μL
	20 nM	500 μL	466.50 μL	30 μL	0.5 μL	3 μL
	10 nM	500 μL	466.75 μL	30 μL	0.25 μL	3 μL
12-well	100 nM	1 mL	929.00 μL	60 μL	5 μL	6 μL
	50 nM	1 mL	931.50 μL	60 μL	2.5 μL	6 μL
	30 nM	1 mL	932.50 μL	60 μL	1.5 μL	6 μL
	20 nM	1 mL	933.00 μL	60 μL	1 μL	6 μL
	10 nM	1 mL	933.50 μL	60 μL	0.5 μL	6 μL
6-well	100 nM	2 mL	1858.00 μL	120 μL	10 μL	12 μL
	50 nM	2 mL	1863.00 μL	120 μL	5 μL	12 μL
	30 nM	2 mL	1865.00 μL	120 μL	3 μL	12 μL
	20 nM	2 mL	1866.00 μL	120 μL	2 μL	12 μL
	10 nM	2 mL	1867.00 μL	120 μL	1 μL	12 μL

*: 本转染方法示例所用转染体系；

b. 将转染复合物逐滴加入到适量无双抗完全培养基 (v1) 的细胞中，轻轻混匀。

注：转染复合物加入至原细胞培养基中一般无需移除或更换，但亦可依据具体实验情况进行优化。

c. (可选) 进行其他必要的特殊处理 (如加药处理)。

d. 将培养板置于 37°C 的 CO_2 培养箱中培养 24~96 小时 (培养时间与实验目的相关)。

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 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。
- 通过与 miRNA 靶基因双荧光素酶报告基因载体、miRNA Sensor 双荧光素酶报告基因载体（锐博生物可提供构建服务）共转来验证 miRNA mimic/inhibitor 的作用。
- 使用 RT-qPCR，基因芯片，高通量测序等方法检测相关基因转录水平，甚至全基因表达谱是否发生变化。

注：miRNA 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 对靶基因转录水平不一定有直接影响。

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。锐博生物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（请参考表 4）。

相关产品

表 3 相关产品

产品编号	产品名称
C10511-05	riboFECT CP Transfection Kit(166T)
C10211-1 ^a	Bulge-Loop miRNA qRT-PCR Starter Kit (20T RT + 60T qPCR)
C10712-1 ^a	miDETECT A Track miRNA qRT-PCR starter kit (20T+ 20T+200T)
Variant ^b	Bulge-Loop miRNA qRT-PCR Primer Set
Variant ^b	miDETECT A Track miRNA Forward Primer
Variant ^b	miDETECT miRNA qRT-PCR Standard RNA
Variant ^b	miRNA文库

注：a：其它规格请见锐博生物官网 www.ribobio.com；b：根据 miRNA 不同或/和规格不同编号不同。

FAQ

1. 如何检测 miRNA mimic、inhibitor 的转染和实验效果？对目的 miRNA 进行 qPCR 检测可以吗？

转染 mimic 后可以采用 qPCR 对 miRNA 进行过表达验证，但 inhibitor 不适用。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 的表达，而 mimic 的过表达倍数也并不能直接判断 mimic 的转染率，所以并不能通过 RT-qPCR 检测目的 miRNA 的表达变化的方式反映 mimic、inhibitor 的转染效率及作用效果。Mimic 和 inhibitor 的转染率需要通过相同转染方法和条件下转染荧光转染对照（如 miR01104 micrON mimic NC #22 (5FAM) 或 miR02104 micrOFF inhibitor NC #22 (5FAM) 等试剂）的结果来判断，而作用效果可通过检测靶基因的蛋白表达水平，或者通过荧光素酶报告系统检测进行判断。agomir 由于增加了化学修饰，可能会对 qRT-PCR 造成一定的影响，不能通过 qPCR 方法验证使用效果，但可以通过 Northern Blot 检测 miRNA 表达。Antagomir 的作用原理与 Inhibitor 相同，其作用效果也是通过检测 miRNA 的靶基因蛋白表达来检测和判断。

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，而 mimic 与 agomir、inhibitor 与 antagomir 则修饰不同，需使用各自的 NC 作为对照组，以排除可能因为细胞或动物对寡核苷酸刺激而产生的假阳性结果。

表4 动物实验agomir和antagomir实验参考

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 mL 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 mg 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 GBC-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
Mei Wang, <i>et al. Eur. J. Cancer.</i> 2013	hsa-miR-17-5p & hsa-miR-20a-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
Chuanliang 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
Ping Wang, <i>et al. Mol. Cell. Biol.</i> 2013	Mmu-miR-329-3p	mice	intravitreal injection	5 µg	5 days after injection
Yang Sun, <i>et al. Cell Res.</i> 2013	mmu-miR-124-3p agomir	mice	tail vein injection	100 nmol/kg for 3 days	24 hours after the last injection