GenePharma

吉玛基因

www.genepharma.com

microRNA mimics
产品使用手册

上海电话：021-51320195　　E-mail：support@genepharma.com
苏州电话：0512-86668828　　E-mail：szsupport@genepharma.com
官网网址：www.genepharma.com

产　　品：microRNA mimics
纯化方式：HPLC纯化
产品形式：干粉
贮存条件：在-20℃或者-80℃
保 存 期：在-20℃或者-80℃长期存放

质量控制

PAGE 检测：产品是准确分子量大小且经过特殊化学分子修饰的双链 mimics 分子
HPLC 纯化：经过 HPLC 纯化并测定 miRNA mimics,纯度>95%

注意事项：

RNA oligo 在操作过程中，如果有外源的核酸酶存在，RNA oligo 容易发生降解 。在进行相关实验中，请带手套进行操作，尽量避免 RNAase 污染，试管，移液枪和 枪头都要避免污染 。收到产品后尽快储存在-20℃或-80℃环境中。

microRNA mimics的重悬

在最大转速为 4,000g 的低速条件下离心 EP 管，让 miRNA mimics 聚集在试管的底部。

1. 轻轻的打开管盖.
2. 1 OD加入DEPC水125 μl,配成20 μM的储备液
3. 柔和的用移液枪吹打储备液5-6 次
4. 根据具体用量情况分装，避免多次冻融
5. 在重新贮存的时候注意密封好EP 管
6. 贮存在-80°C ，以备使用

microRNA mimics

一、microRNA inhibitor介绍

miRNA agomir是根据 microRNA成熟体序列设计的双链小 RNA 分子，用于模拟内源性成 熟体 miRNA 序列 。agomir 包括一条与目标 miRNA 成熟体序列一致的序列，以及一条与 miRNA 成熟体序列互补的序列 。特异的 miRNA mimics 能够被导入到表达对应的 miRNA细胞中，模拟 microRNA 的作用，或者与构建有 miRNA 结合位点的双荧光素报告系统结合， 验证 miRNA 与靶基因之间的调控关系。

mRNA 表达水平分析

为了分析 miRNA 的上调水平，miRNA mimics 可以被转染进入细胞并通过 Northern blotting 检测，以及实时定量荧光 PCR 检测的方法进行检测。

靶基因表达水平分析

通过对转染 miRNA mimics 和阴性对照序列的细胞内 mRNA 靶基因进行实时定量荧光 PCR 检测和 western Blotting 检测，可以检测靶基因蛋白的表达水平，验证 miRNA 与靶基因之 间的调控关系。

miRNA 3'UTR 靶位点验证分析

通过将一个或多个预测的 miRNA3'UTR 结合靶位点构建到报告质粒上，并将 miRNA mimics 和报告质粒共转染细胞，mimics 可以抑制报告质粒上的报告基因，从而可以直接检验 mimics 和 miRNA 预测结合位点之间的作用关系。我们建议使用 miRNA mimics 阴性对照作为参照，阴性对照的实验浓度，转染条件与实验组相同。

二、转染程序

转染效率对不同的细胞株和不同的转染试剂是不同的。

最优的转染条件还是需要通过实验来确定。我们建议优化时的 miRNA mimics 的浓度范围可 以放宽至 1-100nM 之间。

培养皿类型	96 孔板	24 孔板	12 孔板	6孔板
转染试剂 [A]	0.3-1.0 μl	1-3 μl	2-4 μl	3-6 μl
microRNA mimics [B]	3 pmol	15 pmol	30 pmol	75 pmol
细胞密度 [C]	6000 cells/well	40,000 cells/well	80,000 cells/well	200,000 cells/well
每孔培养基体积	0.1 ml	0.5 ml	1.0 ml	2.5 mL

A：转染试剂的推荐量，根据您订购的试剂不同应做适当的调整。

B：所显示的添加量是 miRNA mimics 终浓度为 30nM 的量。由于最大 miRNA mimics 活性的量在不同细胞类型是有差异的，所以推荐您自行优化。

C：对细胞密度只是推荐值，不同的细胞株有一定的变化，主要看细胞的大小和生长情况，一 般我们推荐的细胞融合度在 30-70%为佳。

三、转染优化

优化转染效率是使得 miRNA mimics 活性最大化的关键因素之一，对每种转染试剂而言，首 先要确定一款合适的转染试剂，主要看从以下几点：

- 转染试剂的量
- miRNA agomir的量
- 转染时的细胞密度
- 转染时的操作顺序
- 细胞与转染试剂/siRNA复合物的接触时间