

miRNA 使用说明

miRNA 简介

miRNA (microRNAs) 是真核生物中广泛存在的一种长约 18 到 25 个核苷酸的小分子 RNA, miRNA 来自一些从 DNA 转录而来, 属于非编码 RNA, 通常通过与互补 mRNA 序列的 3'非翻译区 (3'-UTR) 结合来调控转录后的 mRNA 表达, 进而导致翻译抑制和基因沉默; 在动物中, 一个 miRNA 通常可以调控数十个基因, 对于基因表达调控、细胞周期、生物体发育时序等方面发挥重要作用。

产品介绍

生工生物专注 RNA 合成二十年, 开发了各种模拟物及抑制剂产品。mimic 与 agomir 是 RNA 双链, 模拟内源性成熟体 miRNA 序列, 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, 比单链更稳定; Inhibitor 与 antagomir 是 miRNA 成熟体的完全反向互补单链序列, 能特异地与内源性 miRNA 结合, 阻断 miRNA 与靶基因的作用。其中, agomir 与 antagomir 有 3 种修饰, 全链甲氧, 两端硫代, 3'端胆固醇修饰, 更能提高稳定性, 胆固醇还可以提高转染效率, 更容易进入细胞, 更适用于动物实验。产品具体如下表:

miRNA 产品表

名称	功能	单双链	修饰	适用对象
miRNA mimic	模拟 miRNA 高表达	双链	无修饰 (客户可根据需要自选)	细胞
miRNA inhibitor	竞争性抑制 miRNA 高表达	单链	无修饰 (客户可根据需要自选)	细胞
miRNA agomir	模拟 miRNA 高表达	双链	在反义链上进行 5'端两个硫代修饰, 3'端胆固醇修饰、4 个硫代修饰, 全链甲氧修饰。	细胞及动物
miRNA antagomir	竞争性阻断 miRNA 高表达	单链	与 miRNA 反向互补, 全链甲氧修饰, 5'端两个硫代修饰, 3'端胆固醇修饰、4 个硫代修饰。	细胞及动物

产品运输与保存

产品运输: 产品为干粉, 可以常温及带普通冰袋运输

质量控制: HPLC 纯化&质谱检测, 纯度>95%

贮存条件: 在-20℃ 或者-80℃

保存期: 干粉在-20℃ 6 个月, -80℃ 8-12 个月

使用前注意事项

与其它 RNA oligo 一样, 在操作过程避免 RNase 污染, 在进行相关试验中, 请带手套进行操作, 尽量用无 RNase 污染的试剂、试管、移液枪和枪头。收到产品后如暂时不用的话, 尽快贮存在 20℃或 -80℃冰箱中保存。使用时按以下步骤操作:

1. 把装有 RNA oligo 的 EP 管放在最大转速为 4000×g 的低速条件下离心 1min, 让 RNA oligo 聚集在试管的底部;
2. 轻轻的打开管盖;
2. 加入 DEPC 水, 如配成 20μM 的储备液, 5 nmol 的 RNA oligo 需要加入 250μL DEPC 水, 以此类推;

产品 nmol	0.5	1	2	5	10	配成母液浓度
溶液 (μl)	25	50	100	250	500	20μM (20pmol/μl)
溶液 (μl)	5	10	20	50	100	100μM (100pmol/μl)

3. 用移液枪轻轻吹打溶液 3-5 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, 并贴好标签备用;
6. 配制好工作溶液冻存在 -20 或 -80℃ 冰箱, 最好在 3 个月内用完。如 4℃ 保存 5 个工作日内用完。

产品运用

1. miRNA 靶基因相关作用

通过对转染 miRNA mimic/agomir、Inhibitor/antagomir 和阴性对照序列的细胞, 对 miRNA 靶基因 mRNA 转录水平是否发生变化进行实时定量荧光 PCR 检测, 用 western blotting 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。用于动物研究 miRNA 作用靶基因后基因功能及医药等方面研究。

2. 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

3. miRNA 与 3'UTR 靶位点作用分析

通过将一个或多个预测的 miRNA 3'UTR 结合靶位点构建到报告质粒上, 并将 miRNA mimic/agomir 和报告质粒共转染细胞, mimic/agomir 可以抑制报告质粒上的报告基因, 从而可以直接检验 miRNA mimic/agomir 和 miRNA 预测结合位点之间的作用关系。

重要提示: 本产品仅供科研使用, 禁止用于体外诊断与治疗

细胞实验

一般 miRNA mimic/inhibitor 用于细胞方面的实验, 可以使用和 siRNA 相同的参数通过转染细胞; miRNA agomir/antagomir 如用于细胞实验可以少用或不用转染试剂, 具体要根据自身细胞实验转染效率情况而定。细胞转染前一定要认真阅读所购买的细胞转染试剂说明书, 严格按说明书要求操作, 我们推荐 BBI 高效低毒 RNA 特异性转染试剂 RNATransMate (货号 E607402), 具有很好的转染效果, 具体操作参考说明书。inhibitor 是单链, 转染细胞后降解比 mimic 快, 另外与 inhibitor 竞争抑制作用机制有关, 使用量一般是 mimic 的 2-3 倍, 甚至更多, 具体根据结合细胞的耐受度及转染效率而定。

miRNA mimic/inhibitor 推荐使用量

细胞培养板	培养基(μl/孔)	mimic (/孔)	inhibitor (/孔)
96 孔板	100μl	0.5-3 pmol	1-10 pmol
48 孔板	200μl	1-5 pmol	2-15 pmol
24 孔板	500μl	2-15 pmol	5-30 pmol
12 孔板	1.0 ml	5-30pmol	10-60 pmol
6 孔板	2.0 ml	20-100 pmol	50-300 pmol
35 mm	2.0 ml	20-100pmol	50-300pmol
60 mm	5.0 ml	50-300 pmol	100-600 pmol

如果 miRNA mimic/inhibitor 转染细胞检测效果不好, 可以考虑用 agomir 与 antagomir, 不需要或少用转染试剂, 具体需要用荧光标记 NC 来进行转染效率预实验。miRNA mimic 可以使用和 siRNA 相同的参数通过转染或电转进入细胞。

对于大部分 miRNA 模拟物而言, 最大活性在转染后 24 小时候产生, 但是生物检测实验可以在转染后 24-72 小时内进行。如果转染后的细胞培养超过 24 小时, 我们建议更换新鲜的培养液以便获得更好的细胞活力。另外用 miRNA 抑制物 (inhibitor/antagomir) 研究分析内源 miRNA 功能时, 注意一点要选用 miRNA 表达相对较高的细胞系。

动物体内实验

miRNA agomir /antagomir 用于动物实验，可以通过动物局部注射或者尾静脉注射的方式，发挥局部性或者全身性特异高表达或抑制目 miRNA 的作用。给药方式的不同有很大的差异，体内实验 miRNA agomir/antagomir 给药方式：

静脉给药：适合心、肝、肾、肺、肿瘤组织等血流丰富的组织器官；

呼吸道给药：适合呼吸系统；

腹腔给药：适合腹腔和盆腔内脏器，胰、脾、肾、卵巢等；

颅内给药：适合中枢神研究；

局部给药：系统给药难以到达的部位，如表皮、皮下(肿瘤)、子宫腔等。例如可以利用癌细胞系建立皮下移植瘤裸鼠模型。

体内给药推荐剂量：

1. 局部给药：适应模型：大脑、肌肉、皮肤、眼睛、鼻腔、耳蜗、移植瘤、生殖器等局部组织

1) 注射体积和剂量：

agomir 推荐剂量：每次注射 2~10nmol；

antagomir 推荐剂量：每次注射 5~50nmol。

2) 注射时间：

以移植瘤为例，长至 5mm X5mm 大小时开始注射；重复注射 3 至 5 周，每三天注射一次。

2. 系统给药 适应循环系统（免疫系统）、作用于血流丰富的脏器（肝脏、心脏、肺脏、肾脏、脾脏）

1) 注射体积和剂量：

agomir 推荐剂量：每次注射 5~20nmol；

antagomir 推荐剂量：每次注射 30~100nmol。

2) 注射时间：

针对急性模型（作用时间小于一周），建议单次高剂量注射；

针对慢性模型（作用时间超过一周），建议中低剂量多次给药，每周注射 2~3 次加强作用效果。

注：以上数据仅供参考，规格科研工作者的研究情况不一样，作用的部位不同，并无统一剂量标准；建议广大科研工作者都参考已经发表的文献资料，结合自身的科研情况及实验的结果调整使用剂量，优化实验方案。以下是近期动物用药文献参考：

Reference	agomir & antagomir	Animal	Delivery	Doses	detection
Zhang et al., <i>Nat Commun.</i> 2023	hsa-miR-21-5p antagomir	mice	Tail vein injection (LNP 包裹)	5 mg/kg, 单次	注射后 3 天
Liu et al., <i>Adv Sci.</i> 2024	mmu-miR-155-5p antagomir	mice	Tail vein injection (外泌体递送)	10 mg/kg, 每 3 天一次, 持续 2 周	末次注射后 7 天
Wang et al., <i>J Extracell Vesicles.</i> 2022	hsa-miR-124-3p agomir	mice	Intranasal injection	20 µg/鼻孔, 连续 3 天	首次注射后 5 天
Chen et al., <i>Hepatology.</i> 2023	mmu-miR-122-5p antagomir	mice	Tail vein injection (GalNAc 偶联)	2 mg/kg, 单次	注射后 4 周
Li et al., <i>Circulation.</i> 2024	mmu-miR-133a-3p agomir	mice	Intramyocardial injection	10 µg/只, 单次	注射后 2 周
Sun et al., <i>Mol Cancer.</i> 2022	hsa-miR-10b-5p antagomir	mice	Intratumoral injection (PLGA 温敏凝胶)	0.5 mg/kg, 每周 2 次, 持续 3 周	末次注射后 1 周
Zhao et al., <i>J Neuroinflammation.</i> 2023	mmu-miR-146a-5p agomir	mice	Intracerebroventricular injection	1 nmol/只, 单次	注射后 14 天
Xu et al., <i>J Clin Invest.</i> 2023	mmu-miR-33-5p antagomir	mice	Tail vein injection (AAV 载体)	1×10 ¹¹ vg/只, 单次	注射后 6 周
Yang et al., <i>Sci Transl Med.</i> 2024	hsa-miR-23a-3p antagomir	mice	Subcutaneous injection (可注射水凝胶)	10 mg/kg, 单次	注射后 21 天