mimics/inhibitor 产品使用说明

产品信息

产品名称	miRNA mimics/inhibitor
存储及运输条件	常温运输 ； -20°C保存。
有效期	冻干粉-20°C保存，可以稳定保存一年。

产品简介

常规化学合成 mimics/inhibitor 为 21~23nt 的双链小分子 RNA，以冻干粉形态提供，开瓶即用，无需预处理。

运输保存

产品以冻干粉的形式常温运输。收货后，请于 -20°C 环境保存，在此条件下冻干粉的有效期可达 12 个月。使用前瞬时低速离心(建议速率 1000rpm)，用 RNase-free H_2O 或灭菌 ddH_2O 配制成 20μM 储存液，建议对储存液进行小量分装并避免超过 5 次的反复冻融。

表 1. 20μM 储存液的配置方法

mimics/inhibitor(nmol)	2.5	5	10	50
溶解体积(μl)	125	250	500	2500

使用须知

▲mimics/inhibitor 呈很轻的干膜状附在管壁上，务必先离心再开盖，溶解时请加足量 RNase-freeH_2O 或灭菌 ddH_2O 后盖上管盖，震荡溶解。

▲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，使用完毕后即刻 -20°C 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，质因生物建议：

▲转染实验中每个转染样品至少设置 3 个复孔；

▲转染实验分组设置：空白对照组（必需，不含转染试剂和 mimics/inhibitor)；阴性对照 mimics/inhibitor 组（必须)，转染试剂对照组（必须)；实验 mimics/inhibitor 组（必需)；阳性对照 mimics/inhibitor 组（可选)：荧光对照 mimics/inhibitor 组（可选)；

▲接种细胞时，每孔接种的细胞数量尽量保持一致，尽量使细胞在各孔的表面平均分布。

转染浓度

▲为了获得最佳基因阻断结果，每一种细胞系转染 mimics/inhibitor 的量都需要经过实验确定，如果您是首次转染您的细胞系，推荐尝试使用不同浓度的 RNA 转染试剂，并在 10-100nM 范围内改变 mimics/inhibitor 的浓度，以确定达到最佳基因阻断水平所需要的条件，高浓度的 mimics/inhibitor 可能具有细胞系依赖性。

▲在 30-50%细胞汇合度时进行转染。通常基因沉默分析至少要在转染后 24-72 小时进行。低密度转染细胞可以使转染和分析之间的间隙更长，从而使由于细胞过度生长造成的细胞活性损害减少到最低，根据靶基因的特性，高密度转染的细胞可能更加适合条件的优化。

▲不要在转染时的培养基中加入抗生素，因为这将会降低细胞转染的效率和导致细胞死亡。

▲为了获得更好的结果，可以使用 Invitrogen 的 Opti-MEM 低血清培养基在形成复合物前稀释 RNA 转染试剂和 mimics/inhibitor。可以使用荧光标记的 mimics/inhibitor control 帮助优化细胞系的转染条件，一旦确定了用来转染的最佳条件，可以在每一次实验都包括荧光标的 mimics/inhibitor control 作为转染效率的指示剂。

转染(以质因生物 ZY FectEasy RNA 转染试剂为例)

1.接种细胞

转染前一天将细胞接种到相应的培养板中，以转染时细胞汇合度达到 30-50%为宜，见表 2. 为了使用 RNA 转染试剂转染悬浮细胞取得最佳的转染效果，与常规培养条件相比，应在转染当天减少培养基体积接种细胞，可以使用半液转染法。对于不同规格的培养板，建议接种的细胞数量及完全培养基体积见表 3。

表 2. 转染前一天推荐接种细胞数（贴壁细胞）

	接种细胞数量	每孔表面积	培养基体积
96-well	5 000 ± 2 500	0.3 cm^2	0.2 mL
24-well	25 000 ± 10000	0.9 cm^2	0.5 mL
12-well	50000 ± 20 000	3.8 cm^2	1 mL
6-well	150 000 ± 50 000	9.4 cm^2	2 mL
6 cm 培养皿 / 25cm^2 培养瓶	400 000 ± 100 000	25-28 cm^2	5 mL
10 cm 培养皿 / 75cm^2 培养瓶	1 x 10^5 ± 250 000	75-78.5 cm^2	10 mL
14 cm 培养皿 / 175 cm^2 培养瓶	2 x 10^6 – 5 x 10^6	153-175 cm^2	20 mL

表 3. 在转染当天接种的悬浮细胞数量

	接种细胞数量	培养基体积
96-well	1 000 - 20 000	50 µl
24-well	100 000 – 200 000	150 µl
12-well	50 000 - 400 000	300 µl
6-well / 3.5 cm	500 000 - 2x10^5	800 µl

2.转染步骤

① 贴壁细胞

建议 mimics/inhibitor 浓度范围为 10 nM 至 100 nM，RNA 转染试剂用量与 mimics/inhibitor 浓度和培养皿规格进行匹配来提高转染效率。以 RNA 转染 mimics/inhibitor 于 24 孔板，转染浓度为 10 nM 为例，其他规格容器转染请参考表 4。

A. 将 0.25µl 20µM 的 mimics/inhibitor 双链体稀释到 100 µl 无血清培养基中或 Opti-MEM 中，用移液枪轻轻吹打 3-5 次混匀。

B. 向上述 100 µl 含 mimics/inhibitor 的培养基中加入 0.75 µl RNA 转染试剂。加入 RNA 转染试剂后立即涡旋振荡 10 秒钟，进行混匀。

C. 在室温下孵育 10 分钟，使 mimics/inhibitor 双链体和 RNA 形成转染复合物，孵育时间不要超过 30 分钟。

D. 在转染复合物形成期间，吸弃培养皿中原有的培养基，并在每孔中重新加入 0.4 mL 预热的新鲜含血清的完全培养基。

E. 将步骤 C 中孵育好的 100 µl 转染复合物加入到换液后的待转染孔中，一字法轻摇细胞板混合均匀每孔中培养基的最终体积为 500 µl，mimics/inhibitor 终浓度为 10 nM。

F. 转染后细胞板置于 37°C、5% CO_2 培养箱中培养。

G. 转染完成后 24~72 小时均可通过 qPCR 和 Western Blot（针对靶基因）进行 mimics/inhibitor 效果检测。

注：针对比较敏感的细胞，建议转染后 4-6h 进行一次换液。

表 4. 贴壁细胞的推荐转染条件

培养板规格	mimics/inhibitor 终浓度	mimics/inhibitor 物质的量/质量	完全培养基体积	无血清培养基体积	培养基总体积	20µM 母液使用量	RNA 转染试剂体积
96-well	10-100 nM	2-20 pmol/0.032-0.32 µg	150µl	50µl	200µl	0.1-1µl	0.2-3µl
24-well	10-100 nM	5-50 pmol/0.08-0.8 µg	400µl	100µl	500µl	0.25-2.5µl	0.5-7.5µl
12-well	10-100 nM	10-100 pmol/0.16-1.6 µg	800µl	200µl	1mL	0.5-5µl	1-15µl
6-well	10-100 nM	20-100 pmol/0.32-3.2 µg	1.8mL	200µl	2mL	1-10µl	2-30µl
6 cm	10-100 nM	50-500 pmol/0.8-8 µg	4.6mL	400µl	5mL	2.5-25µl	5-75µl
10 cm	10-100 nM	100-1000 pmol/1.6-16 µg	9.5mL	500µl	10mL	5-50µl	10-150µl

② **悬浮细胞**

针对悬浮细胞，为了达到较高的转染效率，建议使用 20 nM-100 nM 的高 mimics/inhibitor 浓度范围进行转染摸索，同时适当提高 RNA 转染试剂的使用量：各指标参考数据见表 5。以下步骤用于在 24 孔板转染 100nM mimics/inhibitor 双链体。

A. 将 1.25μl 20μM 的 mimics/inhibitor 双链体加入到 100μl 无血清培养基中或 Opti-MEM 中，移液枪轻轻吹打 3~5 次混匀。

B. 向上述 100μl 含 mimics/inhibitor 的培养基中加入 3.75μl RNA 转染试剂。立即涡旋振荡 10 秒钟，进行混匀。

C. 在室温下孵育 10 分钟，使 mimics/inhibitor 双链体和 RNA 转染试剂形成转染复合物，孵育时间不要超过 30 分钟。

D. 将步骤 C 中的 100μl 转染复合物加入到 150μl 含血清完全培养基的细胞悬液待转染孔中，一字法轻摇细胞板混匀，前后轻摇细胞板混合均匀。每孔中培养基的最终体积为 250 μl，mimics/inhibitor 终浓度为 100 nM，6h 后补 250 μl。

E. 转染后细胞板置于 37°C、5% CO2 培养箱中培养。

F. 转染完成后 24~72 小时均可通过 qPCR 和 Western Blot（针对靶基因）进行 mimics/inhibitor 沉默效果检测。

注:针对比较敏感的细胞，建议转染后 4-6h 进行一次换液。

表 5. 根据 mimics/inhibitor 浓度和培养板规格推荐使用的 RNA 转染试剂体积

培养板规格	mimics/inhibitor 终浓度	mimics/inhibitor 物质的量/质量	细胞悬液体积	无血清培养基体积	培养基总体积	20μM 母液使用量	RNA 转染试剂体积	6h 后补液体积
96-well	20-100 nM	2-10 pmol/0.032-0.16 μg	50μl	50μl	100μl	0.1-0.5μl	0.2-1.5μl	100μl
24-well	20-100 nM	5-25 pmol/0.08-0.4 μg	150μl	100μl	250μl	0.25-1.25μl	0.5-3.75μl	250μl
12-well	20-100 nM	10-50 pmol/0.16-0.8 μg	300μl	200μl	500μl	0.5-2.5μl	1-7.5μl	500μl
6-well	20-100 nM	20-100 pmol/0.32-1.6 μg	800μl	200μl	1mL	1-5μl	2-15μl	1mL
6 cm	20-100 nM	50-250 pmol/0.8-4 μg	2mL	500μl	2.5mL	2.5-12.5μl	5-37.5μl	2.5mL

3.疑难解答

问题	解决建议
较低的沉默效率	·增加每孔中 mimics/inhibitor 浓度
	·增加每孔中 RNA 转染试剂的量
	·检测转染 24h~96h 的不同时间点的沉默效率
	·用 Opti-MEM 稀释 mimics/inhibitor
	·确保贴壁细胞在转染当天汇合度达到 30-50%:对于小细胞和生长缓慢的细胞类型，每孔中接种约 2mL
	·确认所有试剂是否不含 RNase
	·确保 mimics/inhibitor 是高质量的(PAGE 纯化和脱盐)

	·确认 mimics/inhibitor 双链体的浓度和退火条件
	·将转染期间的培养基体积减少一半并低速离心培养板(180g，5min)。4h 后，加入 0.5 ml 培养基
细胞毒性	·通过在转染后 4 至 6 小时更换培养基或简单地向培养基中添加新鲜培养基，减少 RNA 转染试剂与 mimics/inhibitor 复合物与细胞的孵育时间
	·减少转染试验中使用 RNA 转染试剂的体积
	·核实沉默靶基因后是否影响细胞活力