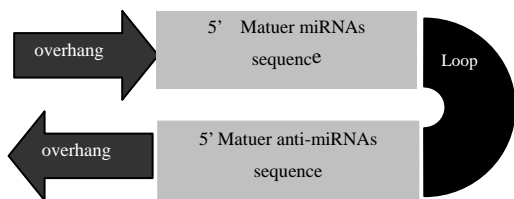
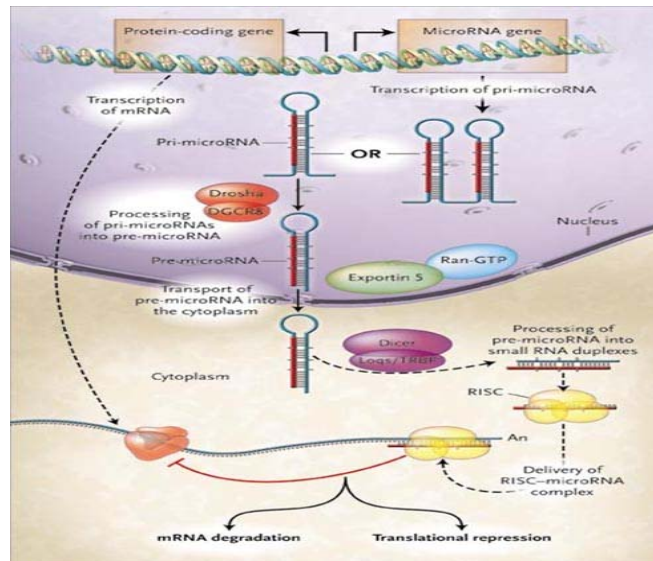


## GenePharma microRNA 过表达载体使用说明书

### GenePharma MicroRNA 载体简介

MicroRNA (miRNA) 是一类真核生物内源性的小分子单链 RNA, 通常长为 18~25nt, 能够通过和靶 mRNA 特异性的碱基配对结合, 引起靶序列降解或抑制其翻译, 从而对基因进行转录后的表达调控 (如右图所示)。GenePharma MicroRNA 载体利用 CMV 启动子可以在众多哺乳动物细胞中快速、高效、持续表达 pre-miRNA, 经过 Drosha (RNaseIII) 作用形成 small hairpin pre-miRNAs (约 70nt), 再过 Dicer 作用形成成熟的 microRNA (约 22nt), 作用靶 mRNA, 起到表达调控作用。



### GenePharma MicroRNA-neg-control 实验设计

在使用载体法针对某一 MicroRNA 进行过表达研究过程中, 通常会遇到如下几个问题: 实验对照组的确立、细胞转染条件的确定、基因表达效率的检测。

#### 1、实验对照组的确立

在一个完善的 MicroRNA 表达实验设计中, 必须考虑设立正确合理的实验对照组。通常, 这些对照组包括载体阴性对照组、转染试剂对照组。

载体阴性对照可以有两种, 一种是采用通用的阴性对照组, 在本试剂盒中包括了该对照所需的载体 (microRNA), 可以表达与目的基因序列无同源性的 microRNA 片段; 另一种是将目的 microRNA 的序列打乱后重新组合所得的阴性对照 (scrambled)。

对照组的设立对于 MicroRNA 表达研究是很有必要的, 您可以利用载体对照来确认 microRNA 实验中转染、RNA 提取和基因表达检测方法的可靠性。本试剂盒中包括 GenePharma MicroRNA-NC 过表达载体的对照, 该载体在导入细胞中后, 可以有效反应载体转染难易以及作为基因表达、RNA 提取、基因检测等系统参考。

#### 2、细胞转染条件的确定

使用 MicroRNA 载体转染细胞时, 为了选择合适的转染方法和确定转染效率, 通常采用报告基因来检测 DNA 的导入情况。最常用的报告基因是绿色荧光蛋白。上海吉玛公司提供的 MicroRNA 表达载体包含绿色荧光蛋白的表达框架, 转入细胞后可以表达绿色荧光蛋白, 用荧光显微镜或流式细胞仪可以很容易的确定转染效率。

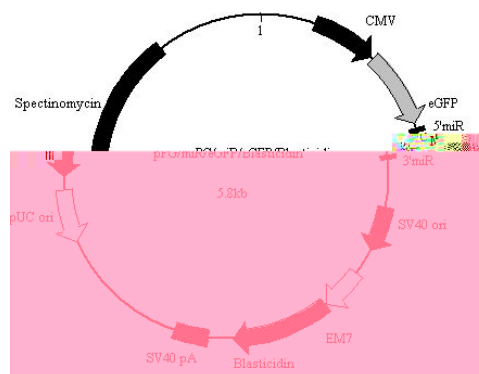
#### 3、MicroRNA 表达的检测

通常用两大类方法来检测 MicroRNA 表达效率, 一类方法是直接检测 MicroRNA 的变化水平, 常用的方法如 northern 杂交、芯片 (microarrays) 以及核糖核酸酶保护分析, 但这些传统的方法都需要用到标记探针与纯化的 RNA 进行杂交, 由于成熟的 miRNAs 及其靶体共享一段共同的靶序列, 而且目前的这些方法有无法通过大小将其分开, 因此很难专一识别成熟的 MicroRNA, 导致较高的背景信号。基于此, 吉玛公司开发出 Hairpin-it™ MicroRNAs qPCR Quantitation Kit, 可以对任何种 MicroRNAs 进行定量 PCR 检测, 另外我们也可以根据客户要求制定特殊服务。和另一类方法是通过检测目的基因的生物效应和细胞效应来间接的反映目的基因的表达变化, 这一类方法很多, 不同的基因有不同的检测方法。通常选用直接检测 MicroRNA 的变化情况, 可以很直观地反映基因的真实情况, 不过也有一部分研究人员通过检测细胞效应如细胞增殖速率等指标间接反映基因变化。

#### 4、GenePharma microRNA 过表达载体基本信息介绍

##### GenePharma microRNA 载体元件信息及用途

特征	用途
CMV promoter	高表达目的基因
EmGFP	利用荧光显微镜观察转染效果
Blasticidin resistance gene	可用来筛选稳定细胞系
Spectinomycin	筛选含有已经转化质粒的 E. coli
pUC origin	质粒可以在 E. coli 中进行高拷贝



上海吉玛制药技术有限公司 地址: 上海浦东张江高科技园区哈雷路 1011 号 电话: 021-51320195 传真: 021-51320295

苏州吉玛基因药物科技有限公司 地址: 苏州工业园区星湖街 218 号生物纳米园 A3 幢 416 室 电话: 0512-62956678 传真: 0512-62956679  
产品订购 [order@genepharma.com](mailto:order@genepharma.com) 技术支持 [support@genepharma.com](mailto:support@genepharma.com) 产品咨询 [service@genepharma.com](mailto:service@genepharma.com)

## 5、 GenePharma MicroRNA 实验操作

由于在 MicroRNA 表达实验设计中有多条件选择如试剂和细胞株等,在本实验操作中以 GenePharma MicroRNA-neg-control 为对照, RNAi-Mate(或 Lipofectamine™2000)为转染试剂, HeLa 细胞为实验细胞株, 按照上述条件分步阐述 MicroRNA 实验的操作过程。如果用户使用不同的细胞株和转染试剂, 可根据相应参考文献进行调整。

### 1 转染条件的确定



#### NOTE

您可选用表达绿色荧光蛋白直接来确定转染效率;



#### IMPORTANT

选用生理状态良好的细胞对提高转染效率很重要。DNA 的用量及其与转染试剂的比例可在推荐范围内适当调整。

- 1、 转染前一天, 接种  $0.4-1.0 \times 10^5$  细胞/孔至 24 孔板中, 加入  $500 \mu\text{l}$  含血清培养液,  $37^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养至 40-70% 融合。
- 2、 在  $50 \mu\text{l}$  Opti-MEM I 培养液或其它无血清培养液中加入  $0.5-0.8 \mu\text{g}$  DNA, 混匀。
- 3、 使用前轻轻混匀 RNAi-Mate 试剂, 切忌离心处理。用  $30 \mu\text{l}$  无血清的 DMEM 或 Opti-MEM, 或其他无血清培养基) 稀释  $1-4 \mu\text{g}$  RNAi-Mate 试剂 (可以分别设立 DNA/RNAi-Mate 的不同用量组, 通常 DNA 和 RNAi-Mate 的用量在 1: 2-1: 5 范围内, 针对不同的细胞需要不同的用量), 轻轻混匀, 室温放置 5 分钟。
- 4、 将稀释好的 DNA 和 RNAi-Mate 试剂混合, 定容到  $100 \mu\text{l}$ ; 轻柔混匀, 室温放置 30 分钟, 以便形成 DNA-Mate 复合物。
- 5、 将  $100 \mu\text{l}$  DNA/RNAi-Mate 复合物加到含有细胞和培养基的培养板的孔中, 来回轻柔摇晃细胞培养板, 使 DNA/RNAi-Mate 混合物均匀覆盖细胞。
- 6、 细胞在  $\text{CO}_2$  培养箱中  $37^\circ\text{C}$  温育 24h-48h 后, 进行转染后的其它检测步骤。如果细胞株比较敏感, 孵育 4-6 小时后, 除去复合物, 更换培养基。
- 7、 通过表达绿色荧光蛋白的 DNA 载体来检测细胞的转染效率, 细胞转染后 24-48 h 后, 使用荧光显微镜观察计数表达绿色荧光蛋白的细胞, 在明场观察计数同一视野中的总细胞数, 转染细胞率=荧光蛋白表达细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ 。或使用 DAPI 等染料染核后, 使用流式细胞仪进行计数, 然后计算转染效率。
- 8、 如果在转染条件摸索实验中没有找到较高效率的转染方法, 请更换转染方法和试剂。如无其他方法选择, 可以使用流式细胞仪将转染的细胞分选出来用于后续实验。如果无法分选细胞, 可以在计算 RNA 干扰抑制效率时去除转染效率的影响, 也可以使用抗生素对转染后的细胞进行初筛后再进一步检测抑制效率。

### 2 细胞的转染

- 1、 设定合理的实验组, 包括转染试剂对照 (mock transfection)、阴性对照(negative control)和目的基因实验组。
- 2、 按照前面实验确定的细胞接种量接种。 $37^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养至 40-70% 融合。
- 3、 按照前面实验确定的转染条件转染细胞。如果需要转染不同培养量的细胞, 试剂的用量可以根据相关参考进行相应的变化。
- 4、 转染后 24-48h 后, 收集细胞进行下一步的检测工作。通常, 目的基因在转染后 24-48h 内就会表现出表达, 但有一些蛋白比如稳定性较强、半衰期较长的蛋白在转染后含量降低比较缓慢, 所以需要延长检测时间。

### 3 稳定细胞系建立

- 1、 前一天, 准备健康细胞, 密度在 20%-40%。
- 2、 MicroRNA 表达载体和对照, 按照转染试剂推荐要求, 进行细胞转染, 6 小时后换成新鲜培养液, 培养过夜。
- 3、 第二天, 胰酶消化, 将细胞转入较大的培养瓶中 (如 6 孔板转到 10cm plates), 加入完全培养液并含有适当浓度的 Blasticidin。
- 4、 每 3-4 天更换含有适当浓度的 Blasticidin, 直到 Blasticidin 抗性克隆形成 (一般需要 11-14 天药物筛选)。
- 5、 挑取至少 10 个耐药克隆进行扩增。

### 4 基因抑制效率的检测

- 1、 在本公司的《RNAi 产品使用手册》(14 页-19 页) 中较详细地介绍了使用荧光定量 PCR 技术和 Western blot 方法检测目的基因表达变化的操作步骤和注意事项, 用户可以酌情选用。
- 2、 用户也可选用其他间接的方法 (如目的基因的生物学功能或细胞生物学特性的变化) 来检测目的基因的抑制情况。鉴于这方面的检测手段多种多样, 需要用户自己进行选择, 在此不再赘述。