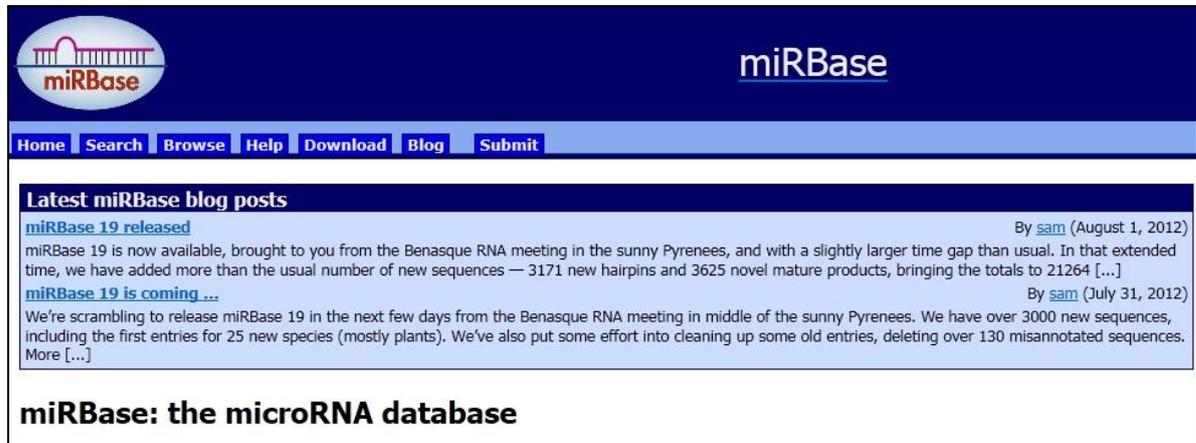


Mir 前体克隆步骤

1、首先进入 mirbase 网站 <http://www.mirbase.org/>

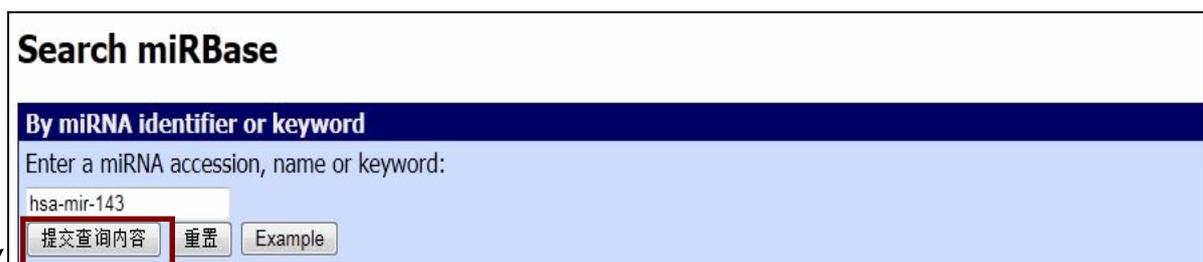


2、search 需克隆的 mir (以 has-mir-143 为例)

如下图找到工具栏的“search”按钮，单击进入：



在接下来弹出的对话框中输入 hsa-mir-143，单击“提交查询内容”



在弹出的画面中单击  即可获得 mir 所在的基因组信息。

3、获得 mir 前体基因组序列并克隆

克隆的时候一般往上下游推。如下图：上下游各 300bp，一般长一点短一点都可以，总长度 300bp 以上就差不多：



单击  即可获得 mir 前体基因组序列。

以此序列为模板，primer5 设计引物并加入酶切位点(设计引物时，最好将 mir 前体序列置于整个 PCR 目的产物的中部附近，不要太靠近 PCR 目的产物的末端)。

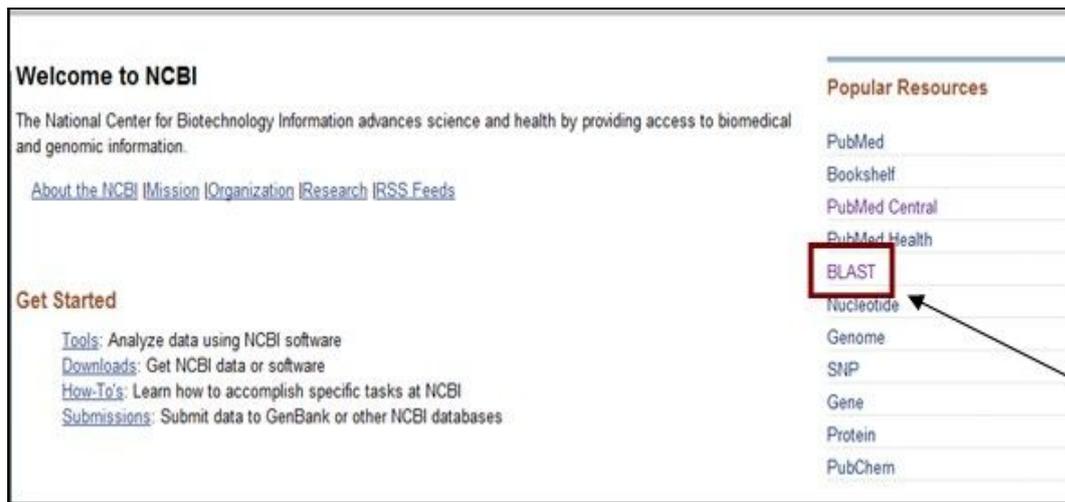
4、设计好的引物还可以在 NCBI 验证其准确性

以 hsa-mir-143 为例，设计好的引物如下：

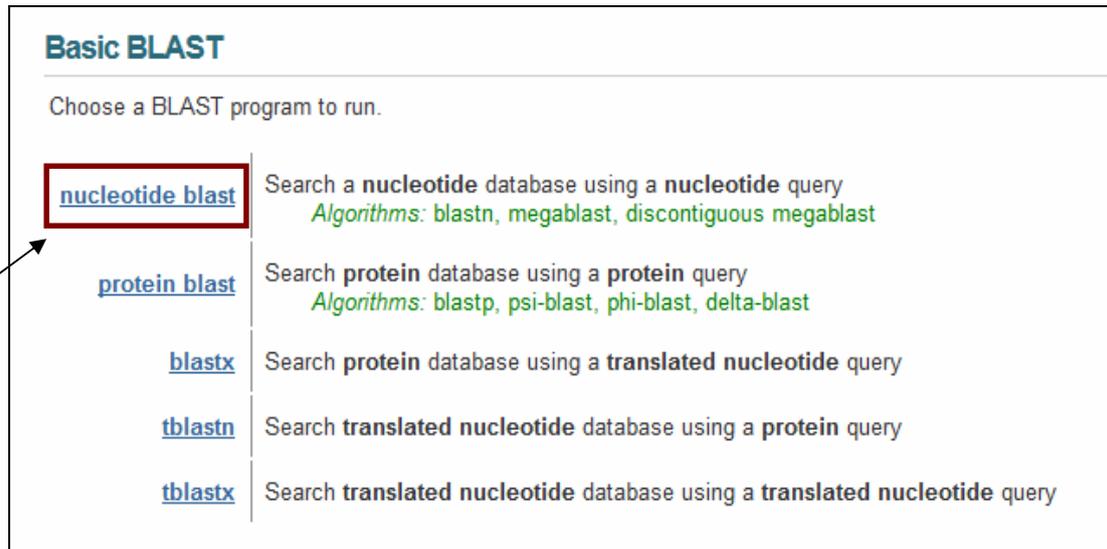
Forward: GGTCAAGGTTTGGTCCTGGGTGCTC

Reverse: AGGGTGCTGGGGAAATGCTAACGCC

首先进入 NCBI 网站首页



单击 **BLAST** 按钮，进入 Basic BLAST 页面



Basic BLAST

Choose a BLAST program to run.

nucleotide blast	Search a nucleotide database using a nucleotide query <i>Algorithms: blastn, megablast, discontinuous megablast</i>
protein blast	Search protein database using a protein query <i>Algorithms: blastp, psi-blast, phi-blast, delta-blast</i>
blastx	Search protein database using a translated nucleotide query
tblastn	Search translated nucleotide database using a protein query
tblastx	Search translated nucleotide database using a translated nucleotide query

单击 [nucleotide blast](#) 按钮，进入如下界面，并将上述设计好的引物输入方框内，如下图

选择 Somewhat similar sequences (blastn)

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) Clear Query subrange

GGTCAAGGTTTGGTCCTGGGTGCTC
AGGGTGCTGGGGAAATGCTAACGCC

From

To

Or, upload file 浏览...

Job Title

Enter a descriptive title for your BLAST search

Align two or more sequences

Choose Search Set

Database Human genomic + transcript Mouse genomic + transcript Others (nr etc.):

Human genomic plus transcript (Human G+T)

Exclude Models (XM/XP) Uncultured/environmental sample sequences

Entrez Query

Enter an Entrez query to limit search

Program Selection

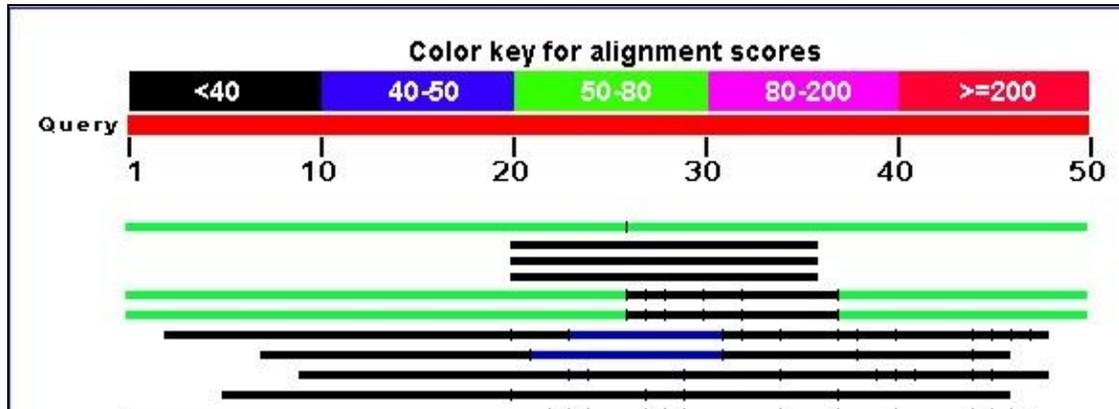
Optimize for Highly similar sequences (megablast)

More dissimilar sequences (discontiguous megablast)

Somewhat similar sequences (blastn)

BLAST Search database Human G+T using Blastn (Optimize for somewhat similar sequences)

单击 **BLAST** 按钮：如下图所示，第一个全绿色的是与上述引物完全匹配的基因组，其余颜色均不完全匹配。



这时只要查询这个对应的基因组是否为 hsa-mir-143 前体序列即可。