GenePharma

miRNA/siRNA Company

MiR-Up™ agomir 产品使用手册

吉玛基因股份有限公司

GenePharma miR-up agomir Product Information Sheet

产品	Mir-upTM agomir
目录号	B06001
标签号	
规格	2 OD
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	1 年，在-20℃或者-80℃
质量控制	
PAGE 检测	产品是准确分子量大小且经过特殊化学修饰的双链 agomir 分子。
HPLC 纯化	经过 HPLC 纯化并测定 miRNA agomir 的 纯度>95%
注意事项	RNA oligo 在操作过程，如果有外源的核酸酶存在，RNA oligo容易发生降解。在进行相关试验中，请带手套进行操作，尽量用无RNAase污染的试剂，试管，移液枪和枪头。收到产品后尽快贮存在–20°C 或–80°C环境中。
MicroRNA agomir 的重悬	在最大转速为 4,000 X g 的低速条件下离心 EP 管，让 miRNA agomir 聚集在试管的底部。 1.轻轻的打开管盖. 2.1 OD加入DEPC水125 ul,配成20uM的储备液 3.柔和的用移液枪吹打储备液 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 6.贮存在-80°C，以备使用

吉玛基因

MicroRNA agomir Product

MicroRNA agomir 介绍

agomir 是根据 microRNA 成熟体序列设计，经过特殊标记与化学修饰的双链小 RNA 分子，是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 MicroRNA agomir 能够被导入到表达对应 microRNA 的细胞内，模拟 microRNA 的作用，或者与构建有 miRNA 结合位点的双荧光素酶报告系统结合，验证 miRNA 与靶基因之间的调控关系。

miRNA 表达水平分析

为了分析 miRNA 的上调水平，miRNA agomir 可以被转染入细胞并通过 Northern blotting 检测 以及实时定量荧光 PCR 检测的方法进行功能验证。

靶基因表达水平分析

通过对转染 miRNA agomir 和阴性对照序列的细胞内 miRNA 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。

miRNA3’UTR 靶位点验证分析

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 agomir 和报告质粒共转染细胞，agomir 可以抑制报告质粒上的报告基因，从而可以直接检验 miRNA agomir 和 miRNA 预测结合位点之间的作用关系。我们建议使用 miRNA agomir 阴性对照作为参照，阴性对照的实验浓度，转染条件应与实验组相同。

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 miRNA agomir 的浓度范围可以放宽至 1-100nM 之间。

	96 孔板	24 孔板	12 孔板	6 孔板
转染试剂 [A]	0.2-0.6 ul	0.5-2 ul	1-3 ul	2-5ul
microRNA agomir	3 pmol	15 pmol	30 pmol	75pmol
Cell density [C]	6000 cells/well	40,000 cells/well	80,000 cells/well	200,000cells/well
Final volume per well	0.1 ml	0.5 ml	1.0 ml	2.5ml

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 agomir 终浓度为 30nM 的量。由于最大 miRNA agomir 活性的量在不同的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的状况，一般来说我们推荐细胞融合度在 30-70％为佳。

吉玛基因

转染优化

优化转染效率是使得 miRNA agomir 活性最大化的的最关键的一个因素之一，对每种转染试剂而言，首先要确定一款最合适的转染试剂，主要看从以下几点着手处理：

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

体内实验指南

miRNA agomir 可以通过动物局部注射或者尾静脉注射的方式，发挥在局部或者全身特异性高表达目的 miRNA 的作用。agomir 的剂量随给药方式的不同有很大的差异。一般可参考给药方案如下：

体内实验 miRNA agomir 和 antagomir 系统给药用量参考：

建议每次给药量：

agomir 5－80ug/g 体重；

小鼠每次给药量(体重为 15-20g)：

agomir 200nmol（一般需注射 3 次）。

有效到达靶部位的给药途径：

静脉给药(6 周龄小鼠，45－150ug，连续注射 3 天，最后一次注射 24h 后检测)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

1）瘤体达到 4mm*4mm 时开始注射

2）将 agomir 溶解于经高压灭菌的磷酸缓冲液或者 10%葡萄糖溶液或生理盐水中；

3)每次注射范围为 1-10nmol（0.5-40D），连续 2－4 周，每周 2 次，第一次注射 2－4 周后检测。

4）单次注射量需要视肿瘤组织的大小而定，注射体积一般为 30ul～100ul；

5)一般需要在瘤组织中进行多点注射，在肿瘤组织中均匀注射 3-4 个位置。

6）注射完成后进行实验结果评价。

修饰方式：agomir 仅在反义链上进行化学修饰，3’端胆固醇修饰，5’端两个硫代修饰，3’端 4 个硫代修饰，反义链全碱基甲基化修饰。

hsa-miR-137 agomirs

sense : 5' UUAUUGCUUAAGAAUACGCGUAG 3'

antisense: 5' AsCsGCGUAUUCUUAAGCAAUAsAsUsUs-Chol- 3'

吉玛基因