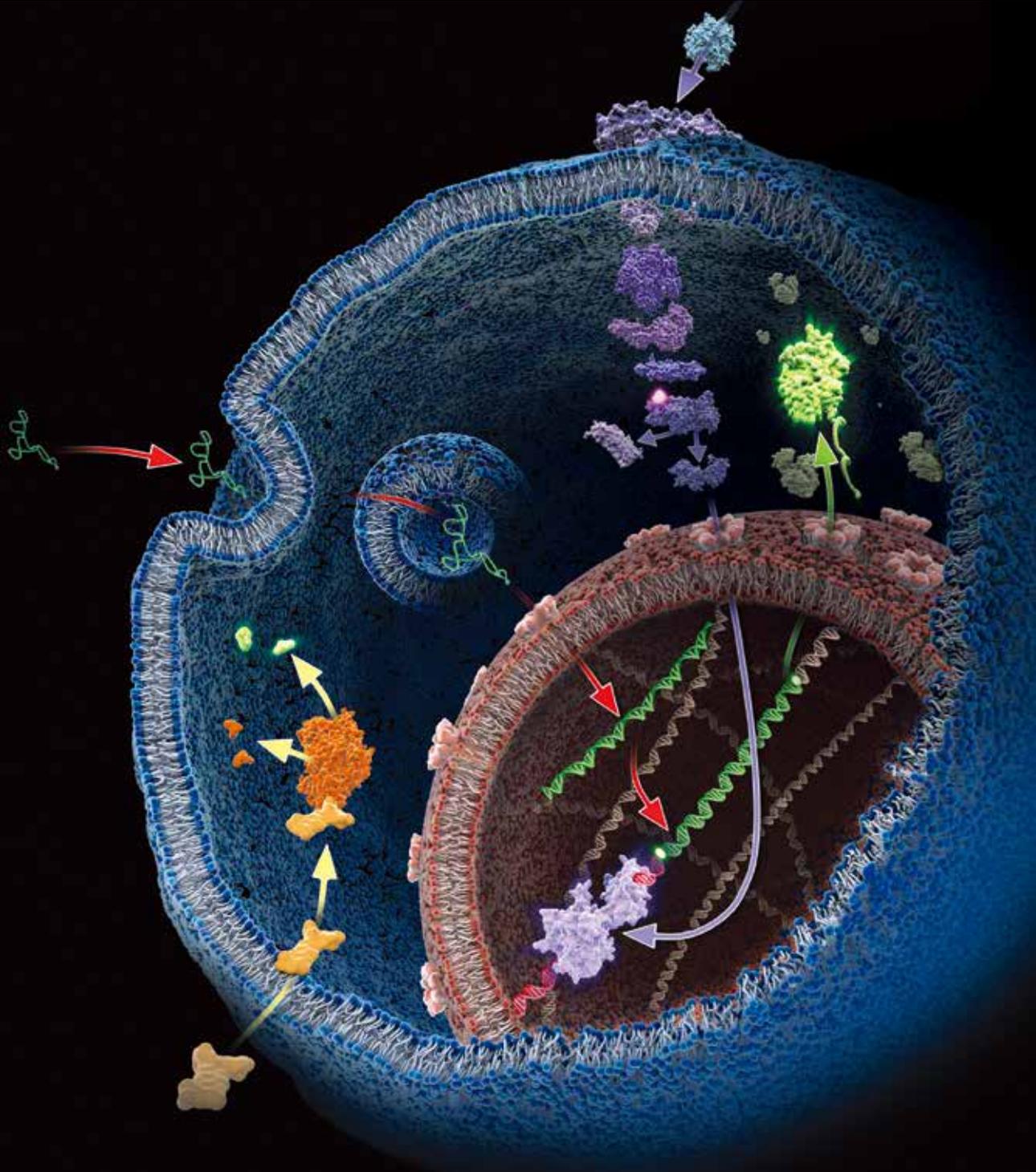


miRNA及siRNA研究技术

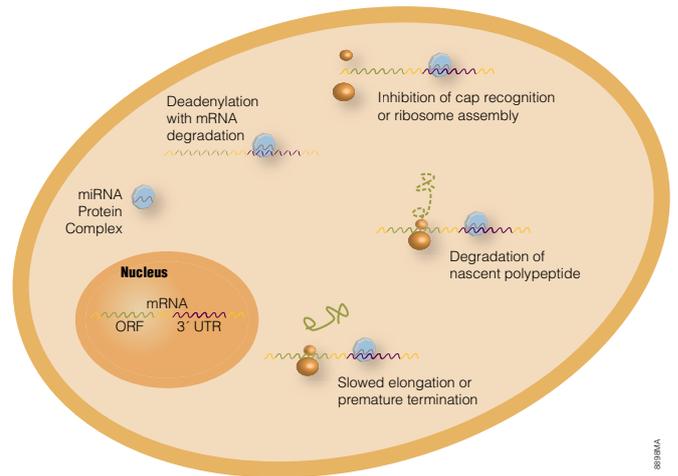
—— Promega pmirGLO技术平台



miRNA 研究背景

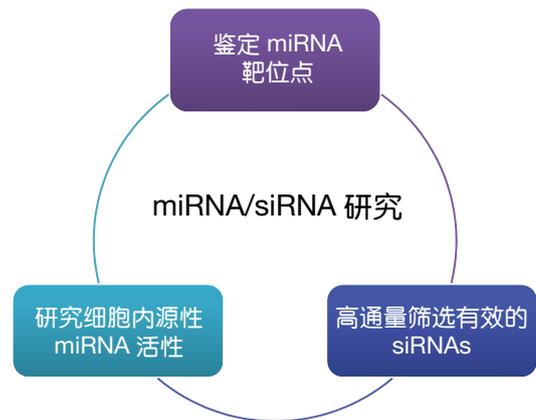
miRNA 研究背景

microRNA(miRNA) 广泛存在于真核细胞中，是内源性的具有调控功能的非编码 RNA，大小长约 17~24 个核苷酸，能够形成 RNA 诱导的沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC)，主要通过碱基互补配对的方式结合靶 mRNA 的 3' 非翻译区 (UTR) 的种子序列 (miRNA 中介导靶序列结合的 2-7 个核苷酸组成的小片段区域称为“seed sequence”种子序列)，根据互补程度的不同降解靶 mRNA 或者阻遏靶 mRNA 的翻译，使靶基因沉默。



miRNA 研究方向

miRNA 参与各种各样的调节途径，包括发育、病毒防御、造血过程、器官形成、细胞增殖和凋亡等等。但到目前为止，只有一小部分 miRNA 生物学功能得到阐明。更多的 miRNA 功能还尚待研究。通常一个 miRNA 分子可以结合多个靶 mRNA，一个靶 mRNA 可以被多个 miRNA 结合，只结合一个 miRNA 无法充分抑制转录，通常需要多个 miRNA 结合至同一靶序列。由于 miRNA 作用的多样性和复杂性，造成了对 miRNA 功能研究平台有更高的要求。



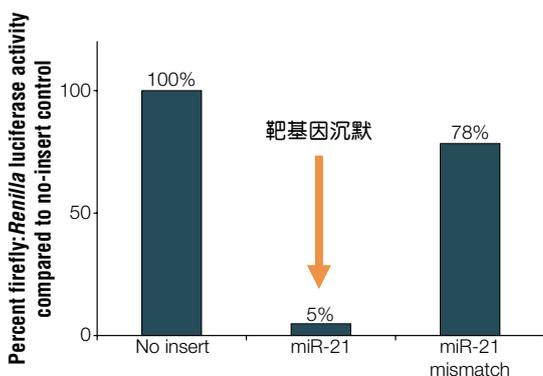
miRNA 研究思路举例

通过预测网站进行预测，预测结合靶基因的可能 miRNA

RNA 或蛋白检测验证靶基因与 miRNA 表达水平存在负相关

报告基因法细胞水平研究确认位点

pmirGLO 报告基因检测



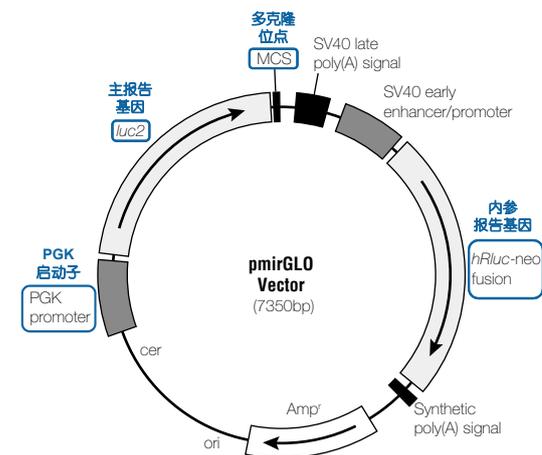
pmirGLO 报告基因检测技术：应用灵敏的专利萤光素酶技术，帮助您在细胞水平验证 miRNA 的功能

pmirGLO 技术原理及产品信息

pmirGLO 报告基因检测技术：是由 pmirGLO 载体，检测试剂及配套相关产品组成的完整解决方案。

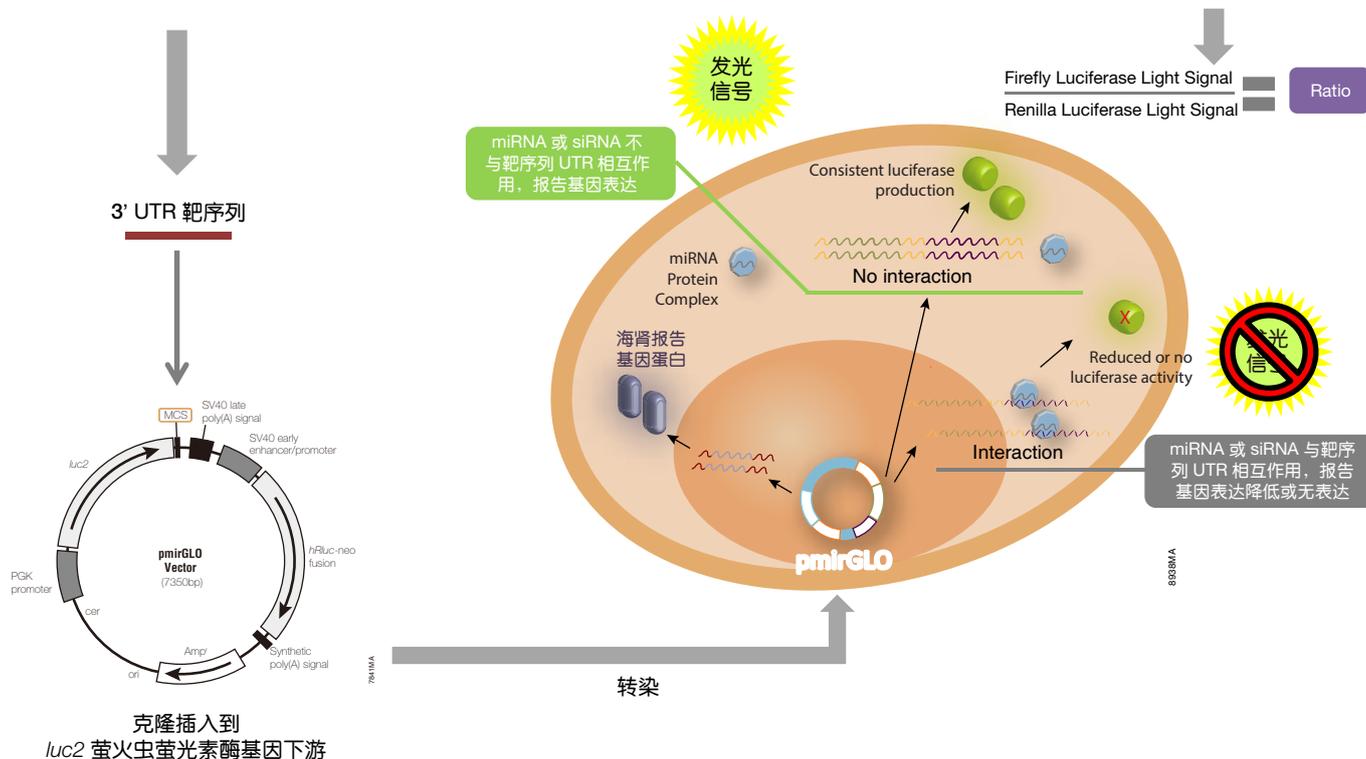
特点：

- 专为 miRNA 研究设计
- 细胞水平的验证方法：更能说明 miRNA 与其靶序列或靶基因的作用。
- 新型萤光素酶报告基因检测法：一个载体带有两个报告基因。无需再共转染两个载体。萤火虫萤光素酶作主报告基因，海肾萤光素酶作内参报告基因。
- 强度适中的组成型启动子：萤火虫萤光素酶基因上游带有 PGK 启动子，表达水平中等，反应更灵敏，可用于内源性 miRNA 活性的检测
- 携带新霉素抗性：可用于建立稳转细胞株。



Cat.#	载体	骨架	靶标报告基因	内参基因	靶标 / 内参启动子
E1330	pmirGLO	pGL4	luc2	hRluc-neo fusion	PGK/SV40

操作流程：



筛选有效的 miRNA 或 siRNA

Novel MicroRNA Reporter Uncovers Repression of Let-7 by GSK-3 β

Rong Guo, Kotb Abdelmohsen, Patrice J. Morin, Myriam Gorospe

PLOS ONE, June 2013; 8: 1-11

■ **应用载体:** pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector

■ **应用检测试剂:** Dual-Luciferase[®] Reporter Assay system

■ **研究目的:** let-7 microRNA 家族被认为是一类肿瘤抑制因子，可通过结合到 Ras 和 HMGA2 等蛋白 mRNA 的 3'-UTR 来下调这些肿瘤形成相关蛋白的表达。在卵巢癌中存在 let-7 的下调，而在小鼠肺癌和乳腺癌模型中过表达 let-7 可以抑制肿瘤生长。

为了系统性研究细胞中调控 let-7 生成的机制，需要建立一种快速筛选系统来对细胞内的 let-7 进行定量。作者建立了一套基于 pmirGLO 载体的快速、高度灵敏的 let-7 报告基因检测系统。利用该系统可以快速鉴定出影响 let-7 活性水平的信号通路，揭示 let-7 的调控机制。

■ **研究思路:**

● 利用 pmirGLO 报告基因载体建立快速筛选 let-7 活性的检测系统

根据文献，细胞内多种 mRNA 的 3'-UTR 上含有 let-7 的结合序列，利用 pmirGLO 载体构建了 6 个带有不同 let-7 靶位点 (let-7 target site, LCS) 的质粒。将这些载体分别转染到两种卵巢癌细胞系 UCI-101 和 BG-1 中，通过检测过表达的 let-7 对萤火虫萤光素酶报告基因表达的下调水平，来筛选出一个抑制程度最强的 let-7 靶位点质粒 (pmirGLO-let7) 用于后续研究。

人源细胞中存在 9 种成熟的 let-7 miRNA，将这 9 种 let-7 分别在 BG-1 细胞中过表达后再转染 pmirGLO-let7 质粒，发现 9 种 let-7 对萤火虫萤光素酶的表达均有抑制，说明该质粒能够有效应用于监测细胞中整体的 let-7 水平。

● 利用转染 pmirGLO-let7 质粒的 UCI-101 和 BG-1 细胞筛选激酶抑制剂以寻找卵巢癌细胞中调控 let-7 水平的信号通路

利用 pmirGLO-let7 质粒检测了 Screen-WellTM 激酶抑制剂库中的 80 种化合物对 let-7 活性的影响，发现加入化合物 Kenpaullone 能够明显降低萤火虫萤光素酶的活性，说明该化合物能提高细胞内 let-7 的水平。该化合物是 GSK-3 β 的抑制剂。

● 利用 GSK-3 β siRNA 进一步验证 GSK-3 β 与细胞内 let-7 水平的相关性

GSK-3 β siRNA 下调细胞内 GSK-3 β 的表达后，pmirGLO-let7 载体上萤火虫萤光素酶的活性降低，与上述抑制剂实验结果吻合，同时 BG-1 细胞的存活率下降。下调 GSK-3 β 的表达后通过 RT-qPCR 直接检测到细胞中 let-7 miRNA 表达升高。说明 GSK-3 β 可特异性下调 let-7 的表达。

● 研究 GSK-3 β 下调 let-7 表达的机制

文献报道结肠癌细胞中沉默 GSK-3 β 触发的细胞死亡与 p53 表达上调有关。作者在 BG-1 细胞发现了同样的结果。沉默 GSK-3 β 引起的 pmirGLO-let7 载体上萤火虫萤光素酶活性的降低，在同时沉默 p53 后能够得到部分恢复。利用 p53^{+/+} 和 p53^{-/-} 的 HCT116 细胞，进一步检测 GSK-3 β 对 pmirGLO-let7 载体上萤火虫萤光素酶活性的影响，发现只有在正常表达 p53 的细胞中才能观察到 GSK-3 β 沉默引起的萤光素酶表达的下调。这些结果均支持 GSK-3 β 是通过降低 p53 的水平来下调 let-7 的表达的。

■ 详细实验方法与数据结果详见文献。

研究细胞内源性 miRNA 活性

Transforming growth factor- β 1 selectively inhibits hepatocyte growth factor expression via a micro-RNA-199-dependent posttranscriptional mechanism

Ognoon Mungunsukh and Regina M. Day

Molecular Biology of the Cell, July 2013; 24:2088-2097

- **应用载体:** pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector
- **应用检测试剂:** Dual-Luciferase[®] Reporter Assay system
- **研究目的:** 肝细胞生长素 (Hepatocyte growth factor, HGF) 是由间叶细胞分泌的一种多功能内源性的修复因子, 可促进正常组织再生, 抑制成纤维化形成等。NK2 是 HGF 的一种选择性剪切的亚型, 作用是拮抗 HGF 的抗成纤维化功能。转化生长因子 - β 1 (Transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 会抑制 HGF 的表达, 而不抑制 NK2 的表达。本文的目的是为了研究 TGF- β 1 选择性抑制 HGF 的机制。
- **研究思路:**
 - 根据文献报道 TGF- β 1 抑制细胞内 HGF 表达, 而不影响 NK2, 通过 RT-PCR 检测 HGF 和 NK2 的 mRNA。
 - 根据数据库检索, miR-199 可以识别 HGF 的 3'-UTR。检测 TGF- β 1 处理 HLFb 细胞后是否会改变 miR-199 表达量。
 - 分别把 HGF 和 NK2 的 3'-UTR 克隆到 pmirGLO 载体中, 转染到 HLFb 细胞中, 用 pre-miR-199 联合处理, 检测萤光素酶表达, 确认 pre-miR-199 的识别位点。
 - 对 HGF 3'-UTR 突变, 克隆到 pmirGLO 载体中, pre-miR-199 处理, 确认 pre-miR-199 是否特异识别 HGF-3'UTR。
 - 应用 anti-miR-199a 和 TGF- β 1 联合处理 HLFb 细胞, 检测 HGF 表达量, 确认 TGF- β 1 是否通过 miR-199 选择性抑制 HGF 表达。
- 详细实验方法与数据结果详见文献。

鉴定 miRNA 靶位点

The miR200 Family of MicroRNAs Regulates WAVE3-dependent Cancer Cell Invasion

Khalid Sossey-Alaoui, Katarzyna Bialkowska, and Edward F. Plow

J. Biol. Chem., Nov 2009; 284: 33019-33029

- **应用载体:** pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector
- **应用检测试剂:** Dual-Luciferase[®] Reporter Assay system
- **研究目的:** 已有的研究结果证明 miRNA 可以参与抑制或促进肿瘤的生长, 如 miR-200 家族参与癌症的侵袭和转移过程中由上皮组织向间充质过渡的过程; 作者之前的研究发现 WAVE3 蛋白参与细胞的运动和迁移, WAVE3 蛋白与乳腺癌的进展加重密切相关。WAVE3 蛋白表达与 miR-200 水平之间可能存在联系。
- **研究思路:**
 - 数据库或软件搜索, 研究 WAVE3 mRNA 上是否有 miR-200 家族的结合位点。
 - 在细胞中检测, WAVE3 RNA 水平和 miR-200 表达水平间是否存在负相关。
 - 使用 pmirGLO 报告基因载体验证 WAVE3 mRNA 上的 miR-200 结合位点。
 - 功能研究: 验证 miR-200 对细胞侵袭特性的影响。
- 详细实验方法与数据结果详见文献。

应用文献列表

1. miR-124a is required for hippocampal axogenesis and retinal cone survival through Lhx2 suppression.
Rikako Sanuki, Akishi Onishi, Chieko Koike, Rieko Muramatsu, Satoshi Watanabe, Yuki Muranishi, Shoichi Irie, Shinji Uneo, Toshiyuki Koyasu, Ryosuke Matsui, Yoan Chérasse, Yoshihiro Urade, Dai Watanabe, Mineo Kondo, Toshihide Yamashita & Takahisa Furukawa
[Nature Neuroscience 2011,14, 1125–1134](#)
应用产品:
 - pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector
2. NEW PLAYERS, OLD TRICKS: Abstract 121: Novel epigenetic mechanisms of resveratrol regulation of PTEN/Akt pathway in prostate cancer.
Swati Dhar, Kun Li, Steven J. Dias, and Anait S. Levenson
[Cancer Res., Apr 2012; 72: 121.](#)
应用产品:
 - pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector
 - Dual-Luciferase[®] Reporter Assay system
3. miR-1247 Functions by Targeting Cartilage Transcription Factor SOX9.
Aida Martinez-Sanchez and Chris L. Murphy
[J. Biol. Chem., Oct 2013; 288: 30802 - 30814.](#)
应用产品:
 - pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector
 - Dual-Glo[®] Reporter Assay system
4. Biogenesis of mammalian microRNAs by a non-canonical processing pathway
Mallory A. Havens, Ashley A. Reich, Dominik M. Duelli, and Michelle L. Hastings
[Nucleic Acids Res., May 2012; 40: 4626 - 4640.](#)
应用产品:
 - pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector
 - Dual-Glo[®] Reporter Assay system
 - GoScript[™] Reverse Transcriptase
5. MicroRNAs are critical regulators of tuberous sclerosis complex and mTORC1 activity in the size control of the *Xenopus* kidney
Daniel Romaker, Vikash Kumar, Débora M. Cerqueira, Ryan M. Cox, and Oliver Wessely
[PNAS, Apr 2014; 111: 6335 - 6340.](#)
应用产品:
 - pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector
 - Dual-Luciferase[®] Reporter Assay system
6. EBV and human microRNAs co-target oncogenic and apoptotic viral and human genes during latency
Kassandra J Riley, Gabrielle S Rabinowitz, Therese A Yario, Joseph M Luna, Robert B Darnell, and Joan A Steitz
[EMBO J., May 2012; 31: 2207 - 2221.](#)
应用产品:
 - pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector
 - Dual-Luciferase[®] Reporter Assay system

产品列表

操作	产品	目录号	规格
载体克隆	pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector	E1330	20µg
	Restriction Enzymes	请咨询 Promega	请咨询 Promega
	T4 DNA Ligase	M1801	100u
		M1804	500u
T4 DNA Ligase (HC)	M1794	500u	
细胞转染	PureYield™ Plasmid Miniprep System	A1222	250prep
		A1223	100prep
	ViaFect™ Transfection Reagent (DNA 转染)	E4981	0.75ml
		E4982	2x 0.75ml
E4983		0.2ml	
Cell Viability Assays	请咨询 Promega	请咨询 Promega	
检测试剂	Dual-Luciferase® Reporter Assay System	E1910	100 assays
		E1960	1,000 assays
		E1980	1,000 assays
检测仪器	GloMax® Discover System	GM3000	请咨询 Promega

■ 其他相关产品

操作	产品	目录号	规格
逆转录	GoScript™ Reverse Transcription System	A5000	50 reactions
		A5001	100 reactions
qPCR	GoTaq® qPCR Master Mix	A6001	200 X 50µl reactions
		A6002	1,000 X 50µl reactions



更多相关信息及市场活动信息请浏览
www.promega.com

普洛麦格（北京）生物技术有限公司
北京市东城区北三环东路 36 号环球贸易中心 B 座 907-909
电话：010-58256268 免费电话：800 810 8133(固定电话)
网址：www.promega.com
印刷日期：2015.5



欢迎关注 Promega 官方微信