

miR-UpTM agomir

产品使用手册



一、产品简介

miR-Up™ agomir是根据miRNA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，用于模拟内源性成熟体miRNA序列。agomir正义链是miRNA的成熟体序列，反义链是与miRNA成熟体反向互补序列。将agomir导入到细胞内，可以实现目的miRNA的过表达，从而验证miRNA的相关功能；或与构建有miRNA结合位点的双荧光素酶报告载体共转染，通过荧光信号变化，验证miRNA与靶基因之间的调控关系。

二、产品信息

产品名称	miR-Up™ agomir
目录号	B06001
规格	2OD-30000OD
纯化方式	HPLC
产品形式	干粉
贮存条件	-20℃或-80℃
保存期	6个月（-20℃或-80℃条件下）
换算关系	1OD≈40ug≈2.5nmol
注意事项	RNA产品在操作过程中易受外界因素（酶，极端pH或温度等）影响导致降解，请严格遵循RNA操作规则。溶解分装后请在-20℃或-80℃条件下小心保存。
储备液配制	1.低速瞬时离心（转速<4000xg），将agomir聚集在试管底部； 2.轻轻打开管盖，轻柔加入DEPC水，缓慢吹吸多次混匀，配制储备液： ★细胞实验可以配置20μM储备液（1OD agomir+125μL DEPC水）； ★动物实验根据agomir用量和注射体积用生理盐水来配置需要的浓度。 3.根据使用情况分装，避免反复冻融； 密封好EP管，-80℃条件贮存，以备使用。



三、使用方法

(一) 细胞实验方法:

1. 接种细胞

提前8-16小时将细胞接种于培养板中，使转染时的细胞处于对数生长期，细胞密度达到50%左右。

培养器皿	每孔表面积 (cm ²)	每孔培养基的体积 (mL)	贴壁细胞接种密度	悬浮细胞接种密度
96孔板	0.3	0.1	$2.5\sim7.5\times10^3$	$2\sim5\times10^4$
24孔板	2	0.5	$1.5\sim3.5\times10^4$	$1\sim2.5\times10^5$
12孔板	4	1	$3\sim7\times10^4$	$2\sim5\times10^5$
6孔板	10	2	$1\sim2\times10^5$	$0.4\sim1\times10^6$
60mm	20	4	$3\sim5\times10^5$	$1\sim2.5\times10^6$
100mm	60	10	$0.75\sim1.25\times10^6$	$2\sim5\times10^6$

注:

- (1) 不同细胞生长速度不同，接种数量及密度需依据细胞类型，培养时间，实验目的而定。
- (2) 为了降低由于实验操作带来的误差，保证实验结果的可重复性，建议每个样品设置3个复孔，或一组实验重复3次。
- (3) 细胞铺板时，尽量保证每孔细胞数量一致，并将细胞均匀铺于孔底。对于孔径较小不易混匀的孔板，建议先用培养基重悬并混匀细胞，再行铺板。

2. 转染（以 siRNA-mate plus 转染试剂为例）

➤ siRNA/miRNA 预混液制备



取 Buffer 8.5 μ L 置于无菌无酶 EP 管中，加入 15pmol siRNA/miRNA（若 siRNA 原液浓度 20 μ M，取 0.75 μ L），吹打混匀，即得 siRNA/miRNA 预混液。

注：

- （1）请确保 siRNA 原液的溶剂为无酶水，且浓度不低于 10 μ M。
- （2）不得使用 PBS 或培养基稀释 siRNA/miRNA 原液，请确保稀释得到的 siRNA/miRNA 预混液浓度为 1.5pmol/ μ L（1.5 μ M）左右。

➤ RNA/plus 复合物制备

向上述 EP 管中，按每管 siRNA/miRNA 预混液加入 1.5 μ L（或 3 μ L）plus 转染试剂，立即用移液枪吹打数十次进行混匀，即得 RNA/plus 复合物。

注：

RNA/plus 复合物尽快加入到细胞中。如特殊情况，在室温条件下存放不要超过 8 小时，请勿将 RNA/plus 复合物置于冷冻条件。

➤ 加样

将制得的 RNA/plus 复合物加至细胞中，轻轻晃动 24 孔板使分散均匀（前后和左右方向各晃动十多次）。放回培养箱中培养，根据实验安排进行后续实验。

注：

培养基是完培，可以含有双抗和血清

3. 效果检测

miR-UpTM agomir 转染 24 小时可以定量检测 miRNA 变化。转染完成后 24~72 小时内可进行功能实验检测，最佳检测时间与细胞类型及 miRNA 特性有关，推荐几种常见的 agomir 效果检测方法：

- ① miRNA 表达水平变化：qRT-PCR，基因芯片等方法。
- ② 靶基因蛋白质翻译水平变化：Western Blot，蛋白芯片等方法；
- ③ 细胞功能变化：细胞增殖、细胞凋亡、细胞迁移等；
- ④ agomir 与靶基因双荧光素酶报告载体（吉玛公司可提供构建服务）共转验证结合作用；



相关产品推荐：

产品编号	产品名称
G04026	siRNA-Mate plus转染试剂（100uL）
G04008	GP-transfect-Mate转染试剂（100μL）
E17002	miRNA引物套装
E17003	miRNA引物探针套装
E01006	染料法Hairpin-it miRNAs qRT-PCR定量试剂盒
E01011	探针法Hairpin-it miRNAs qRT-PCR定量试剂盒
E22001	染料法Hairpin-it miRNAs定量和U6校准qRT-PCR定量试剂盒
E22006	探针法Hairpin-it miRNAs定量和U6校准qRT-PCR定量试剂盒

（二）动物实验方法

miR-UpTM agomir 更适合在动物实验中使用。相比于 miRNA mimic，经过特殊化学修饰的 miR-UpTM agomir 具有更高的稳定性和细胞透过率，可以在复杂的动物体内环境中能保持更长时间的活性，同时在没有转染试剂的情况下，也可以克服细胞膜等障碍进入靶细胞中发挥作用。作用效果可维持数周时间。

1. 相关产品比较

产品名称	功能	作用时间	转染试剂	应用模型
microRNA mimics	模拟高表达miRNA	1周	需要	细胞
microRNA inhibitor	竞争性抑制miRNA	1周	需要	细胞
miR-Up TM agomir	模拟高表达miRNA	2周	不需要	细胞/动物
miR-Down TM antagomir	竞争性或特异性抑制内源miRNA	2周	不需要	细胞/动物

上海电话：021-51320195 E-mail: support@genepharma.com
 苏州电话：0512-86668828 E-mail: szsupport@genepharma.com
 官网网址：www.genepharma.com



B028A-V003-20240229

2. 实验方法参考

miR-Up™ agomir 的使用剂量随实验目的和给药方式的不同具有较大差异，无法建立统一标准。吉玛公司结合已发表文献和客户高分文章相关资料信息分析，总结出以下两套常用实验方案供研究人员参考，建议根据推荐剂量结合实验目的通过预实验优化实验方案。

① 局部注射给药

适用于大脑、肌肉、皮肤、眼睛、鼻腔、耳蜗、移植瘤、生殖器等局部组织及系统给药难以到达的部位，如表皮、皮下（肿瘤）、子宫腔等。

以移植瘤原位注射为例：

➤ 注射剂量

a. 肿瘤原位注射 agomir 常用的注射体积为 **50μL**，可根据肿瘤体积优化注射范围，建议 **20~100μL**；

b. 对于体积较小的肿瘤，为了防止注射后反流现象的发生，可选择低剂量注射，具体注射体积可通过预实验测试，推荐在构建好的移植瘤上注射灭菌 PBS 或生理盐水探索最佳注射剂量。

➤ 溶液配制

a. agomir 推荐使用剂量：每次注射 1-10nmol（0.4-4OD）；

b. 以 10nmol（4OD）一管 agomir 冻干粉为例，低速瞬时离心将 agomir 干粉沉降在管底，加入 50μL RNase free 水配制成储备液；

c. 如实验组设置 5 只裸鼠，用量为 1nmol/只，则取 25μL 每管分装冻存在 -80℃，尽量让解冻的试剂一次用完，避免反复冻融；

d. 使用时，取一管储备液，加入 225μL 无菌 PBS 或生理盐水进行稀释，取 50μL 在瘤体内进行多点注射，一般可注射 3-4 处。

➤ 给药频率

a. 推荐裸鼠移植肿瘤体积达到 4mm*4mm 时开始注射给药，具体肿瘤体积可根据实验目的自行选择；

b. 首次注射之后，每 3 天注射一次，重复注射 2~4 周，具体注射频率和时长需要根据实验设计自行安排；

c. 注射后每天测量肿瘤体积，绘制生长曲线。

d. 给药处理结束后，取肿瘤组织进行 IHC、qPCR、WB 等实验检测处理效果。

上海电话：021-51320195

E-mail: support@genepharma.com

苏州电话：0512-86668828

E-mail: szsupport@genepharma.com

官网网址：www.genepharma.com



B028A-V003-20240229

② 系统注射给药

一般以尾静脉注射为主，适用于循环系统（免疫系统）及血流丰富的器官（如心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏）。

➤ 注射剂量

- a. 尾静脉注射，6-8 周龄小鼠，每次注射 100~200 μ L/只；
- b. agomir 推荐剂量：5~50nmol（2-20OD）/只。

➤ 溶液配制

为避免稀释后的 agomir 反复冻融，建议干粉溶解后一次用完（可以用生理盐水溶解）。如果不能用完，将干粉高浓度溶解（用 DEPC 水溶解）后，按照小鼠的数量和每只小鼠实际使用量进行分装冻存，解冻后用生理盐水稀释，一次用完，不要再次冻融。

例如，注射剂量为 10nmol/200 μ L/只，一管 agomir 冻干粉 10nmol（4 OD），只需将干粉离心沉降后加入 200 μ L 无菌 PBS 或生理盐水进行稀释后注射。

➤ 给药频率

对于短时作用模型（作用时间<1 周），建议单次高剂量注射；

对于长时作用模型（作用时间>1 周），建议中低剂量多次给药，每周注射 2~3 次维持作用效果。

3. 应用案例

① 动物应用案例一：

The Journal of Clinical Investigation（IF：19.456） | Platelet-derived miR-223 promotes a phenotypic switch in arterial injury repair

实验目的：探究 miR-223 在股动脉损伤后体内调节 Pdgfr β 表达和内膜增生的作用

动物模型：血小板 miR-223 KO 股动脉丝损伤小鼠模型【经 3 道直径 0.15 mm 的血管成形术导丝造成股总动脉腔内损伤】

实验分组：miR-223 KO 损伤及未损伤小鼠分别随机分为 3 组【WT、agomiR-NC、agomiR-223】

给药方式：股动脉血管周围注射

给药剂量：2.5nmol miRNA/100 μ L 30% pluronic 凝胶/只

给药频率：注射 1 次



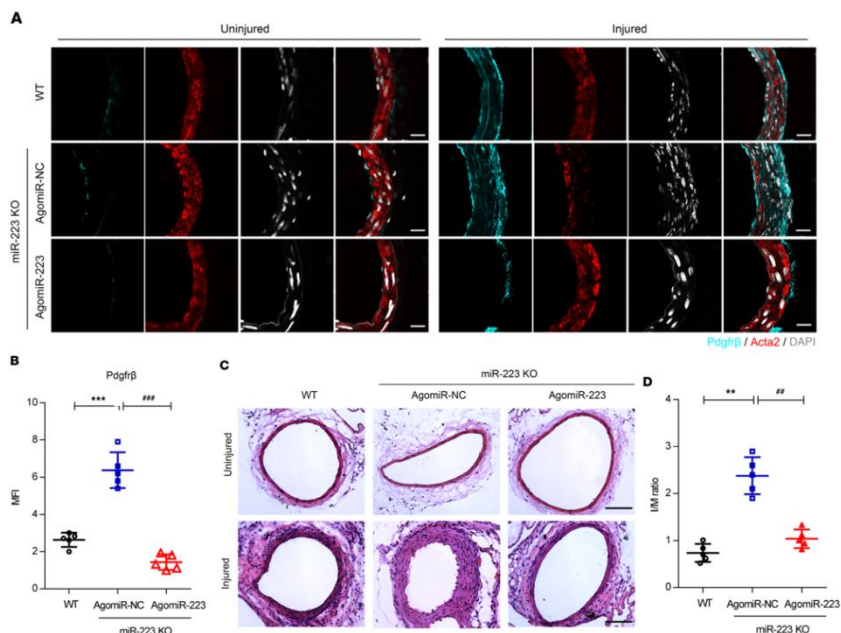


Fig.1 miR-223 在体内股动脉损伤后调节 Pdgfrβ 表达和内膜增生^[1]

损伤后 4 周，用 AgomiR-NC 或 AgomiR-223 处理 WT 小鼠和 miR-223 KO 小鼠，未损伤或损伤股动脉中 Pdgfrβ 的代表性免疫荧光（A）、Pdgfrβ 的表达统计（B）、小鼠股动脉连续横断面 H&E 染色（C）及 I/M 比值的形态计量学测量（D）。

② 客户应用案例二：

EXPERIMENTAL AND MOLECULAR MEDICINE (IF: 12.153) | MiR-1224-5p modulates osteogenesis by coordinating osteoblast/osteoclast differentiation via the Rap1 signaling target ADCY2

实验目的：（F2）探究 miR-1224-5p 在骨重塑中的作用；（F3）探究 miR-1224-5p 在衰老病理条件下的功能



动物模型：（F2）9 周龄小鼠；（F3）18 周龄小鼠

实验分组：（F2-3）小鼠随机分为 3 组，antagomiR-1224-5p、antagomiR-1224-5p、control（PBS）

给药方式：（F2）尾静脉注射；（F3）腹腔注射

给药剂量：（F2-3）15 μ g/10g 体重

给药频率：（F2-3）每 3 天一次，持续 6 周

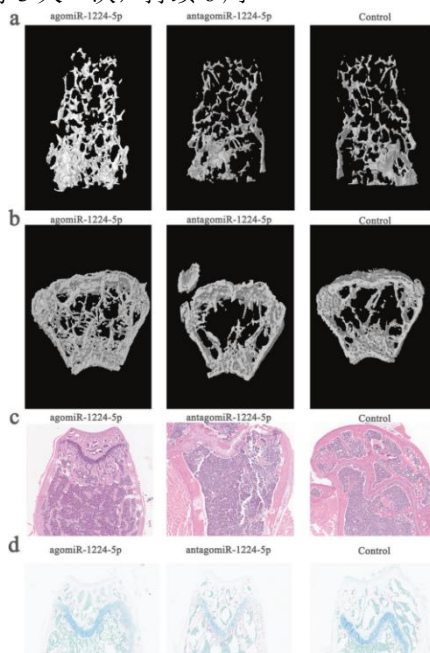


Fig.2 过表达 miR-1224-5p 会增加年轻成年小鼠的骨量^[3]

（A-B）代表性股骨远端 MicroCT 重建。agomiRNA-1224 组小梁明显增高。（C）HE 染色股骨远端脱钙切片。agomiRNA-1224 组骨小梁明显变粗、有序、增多。（D）股骨远端切片 TRAP 染色。agomiRNA-1224 组 TRAP 阳性细胞明显少于对照组和 antagomiRNA-1224 组。



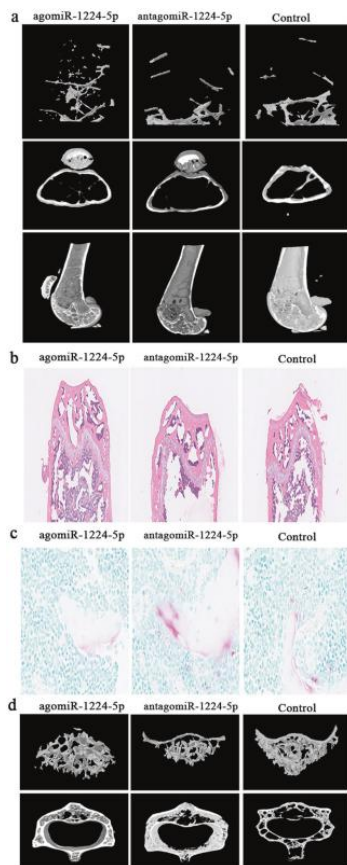


Fig.3 过表达 miR-1224-5p 导致老年成年小鼠骨形成^[3]

(A) 具有代表性的股骨远端 MicroCT 重建。agomiRNA-1224 组小梁明显增高。(B) HE 染色脱钙股骨远端切片。agomiRNA-1224 组骨小梁明显变粗、有序、增多。(C) 股远端切片 TRAP 染色。agomiRNA-1224 组 TRAP 阳性细胞明显少于对照组和 antagomiRNA-1224 组。(D) 具有代表性的 (4um) MicroCT 重建。



四、已发表高分文献：

- [1] Chen L, Yu C, Xiong Y, Chen K, Liu P, Panayi AC, Xiao X, Feng Q, Mi B, Liu G. Multifunctional hydrogel enhances bone regeneration through sustained release of Stromal Cell-Derived Factor-1 α and exosomes. *Bioact Mater*. 2022 Aug 12;25:460-471.
- [2] Zeng Z, Xia L, Fan X, Ostricker AC, Yarovsky T, Su M, Zhang Y, Peng X, Xie Y, Pi L, Gu X, Chung SK, Martin KA, Liu R, Hwa J, Tang WH. Platelet-derived miR-223 promotes a phenotypic switch in arterial injury repair. *J Clin Invest*. 2019 Mar 1;129(3):1372-1386.
- [3] Hu C, Zhen Y, Ma Z, Zhao L, Wu H, Shu C, Pang B, Yu J, Xu Y, Zhang X, Wang XY, Yi H. Polyamines from myeloid-derived suppressor cells promote Th17 polarization and disease progression. *Mol Ther*. 2023 Feb 1;31(2):569-584.
- [4] Zhang S, Wang X, Chen G, Tong L, Dai T, Wang L, Zhu L, Zhang H, Du D. CircRNA Galnt16 sponges miR-335 to ameliorate stress-induced hypertension through upregulating Lig3 in rostral ventrolateral medulla. *Redox Biol*. 2023 Aug;64:102782.
- [5] Yao W, Xu L, Jia X, Li S, Wei L. MicroRNA-129 plays a protective role in sepsis-induced acute lung injury through the suppression of pulmonary inflammation via the modulation of the TAK1/NF- κ B pathway. *Int J Mol Med*. 2021 Jul;48(1):139.
- [6] Shao J, Cao J, Wang J, Ren X, Su S, Li M, Li Z, Zhao Q, Zang W. MicroRNA-30b regulates expression of the sodium channel Nav1.7 in nerve injury-induced neuropathic pain in the rat. *Mol Pain*. 2016 Oct 19;12:1744806916671523.
- [7] Liu Y, Zhang Y. Hsa_circ_0134111 promotes osteoarthritis progression by regulating miR-224-5p/CCL1 interaction. *Aging (Albany NY)*. 2021 Aug 19;13(16):20383-20394.
- [8] Ding Y, Wang L, Zhao Q, Wu Z, Kong L. MicroRNA-93 inhibits chondrocyte apoptosis and inflammation in osteoarthritis by targeting the TLR4/NF- κ B signaling pathway. *Int J Mol Med*. 2019 Feb;43(2):779-790.
- [9] Zhang J, Rong L, Shao J, Zhang Y, Liu Y, Zhao S, Li L, Yu W, Zhang M, Ren X, Zhao Q, Zhu C, Luo H, Zang W, Cao J. Epigenetic restoration of voltage-gated potassium channel Kv1.2 alleviates nerve injury-induced neuropathic pain. *J Neurochem*. 2021 Feb;156(3):367-378.
- Su S, Shao J, Zhao Q, Ren X, Cai W, Li L, Bai Q, Chen X, Xu B, Wang J, Cao J, Zang W. MiR-30b Attenuates Neuropathic Pain by Regulating Voltage-Gated Sodium Channel Nav1.3 in Rats. *Front Mol Neurosci*. 2017 May 5;10:126.

