

A hand is shown holding a nautilus shell, which is a natural example of a logarithmic spiral. The shell is held between the thumb and index finger, with the rest of the hand visible in the lower left. The background is a dark, textured grey. The text 'MicroRNA Research Products' is overlaid on the shell in a bold, orange font.

# MicroRNA Research Products

What is found?

## 目 录

microRNA 与 Ago 亚科蛋白 .....	3,4
<hr/>	
1. 产品系列概述 .....	5
2. Ago 免疫沉淀法概述	
Ago 免疫沉淀法的特点 1 富集 RISC 中的成熟 microRNA.....	6
Ago 免疫沉淀法的特点 2 富集与 RISC 结合的靶标 mRNA.....	7
Ago 免疫沉淀法的特点 3 富集与血液中游离 Ago 蛋白结合的 microRNA.....	8
3. 抗 Ago 单抗系列	
免疫沉淀·免疫印迹 功能 .....	9
4. microRNA Isolation Kit 系列试剂盒概述 .....	11
4-1. MagCapture™ microRNA Isolation Kit (磁珠型) .....	11
MagCapture™ microRNA Isolation Kit, Human Ago2.....	12
MagCapture™ microRNA Isolation Kit, Mouse Ago2.....	13
MagCapture™ microRNA Isolation Kit, Ago1- 4.....	13
MagCapture™ microRNA Isolation Kit, Protein G.....	15
4-2. microRNA Isolation Kit (硅胶珠型) .....	16
microRNA Isolation Kit, Human / Mouse Ago1.....	16
microRNA Isolation Kit, Human Ago2.....	16
microRNA Isolation Kit, Mouse Ago2.....	16
microRNA Isolation Kit, Human Ago3.....	16
5. Total RNA 提取 .....	17
5-1. microRNA Extractor® SP Kit.....	17
5-2. ISOGEN® II .....	18
5-3. ISOGEN® 和 ISOGEN®-LS.....	18
6. miRNA 电泳分析相关试剂 .....	19
7. 用户参考文献 .....	19

# microRNA与Ago亚科蛋白

microRNA 是一种由约 22 个核苷酸组成的小分子非编码 RNA，它作为指导分子能在转录后水平上调节基因的表达，承担各种生命机能 (Ref.1)。人和小鼠体内编码了 1,000 种以上的 microRNA，近年来，全世界都在积极推进新 microRNA 的功能研究以及疾病相关 microRNA 的探索。另外，有研究发现，microRNA 不仅存在于细胞内，还存在于血液等体液中，microRNA 作为癌症等疾病的临床诊断标记分子引起了各界的关注 (Ref.2)。

细胞中经过多个步骤而成熟化的 microRNA，与被称为 **RNA 诱导沉默复合体 (RNA-induced silencing complex, RISC)** 的蛋白复合体的主要组成因子——**Ago 亚科蛋白** 结合后，又与靶标 mRNA 结合并降解靶标 mRNA，或者通过抑制翻译来调控基因的表达 (图 1) (Ref.3,4,5)。Ago 亚科是一组具有 PAZ 结构域和 PIWI 结构域的蛋白 (图 2)，人体内存在 4 种 Ago 蛋白 (hAgo1-hAgo4)，其表达量各不相同，但无处不在 (图 3) (Ref.6)。其中表达量最多的是 Ago2，主要分布于细胞质中 (图 4)，具有切断靶标 mRNA 的 Slicer 活性，因此在 microRNA 通路中担任主要角色 (Ref.7, 8, 9,10,11,12,13)。通过对应抗体的免疫沉淀法结合此类 Ago 蛋白，能回收被 RISC 捕获的 microRNA 和 microRNA 的靶标 mRNA，这种方法是解释 microRNA 各项功能的必要手段 (Ref.14,15,16,17,18,19, 20, 21)。

富士フイルム和光純薬株式会社 (下文简称 FUJIFILM Wako) 提供用于人和小鼠各种 Ago 亚科蛋白的单克隆抗体系列产品，使用了上述抗体的免疫沉淀法 miRNA 提取试剂盒系列，以及 microRNA 和靶标 mRNA 的克隆试剂盒等。我们可以利用这些工具综合地分析细胞或组织中 RISC 所含的 microRNA 和 mRNA，还可用于分析血液中的与 Ago 结合的 microRNA。

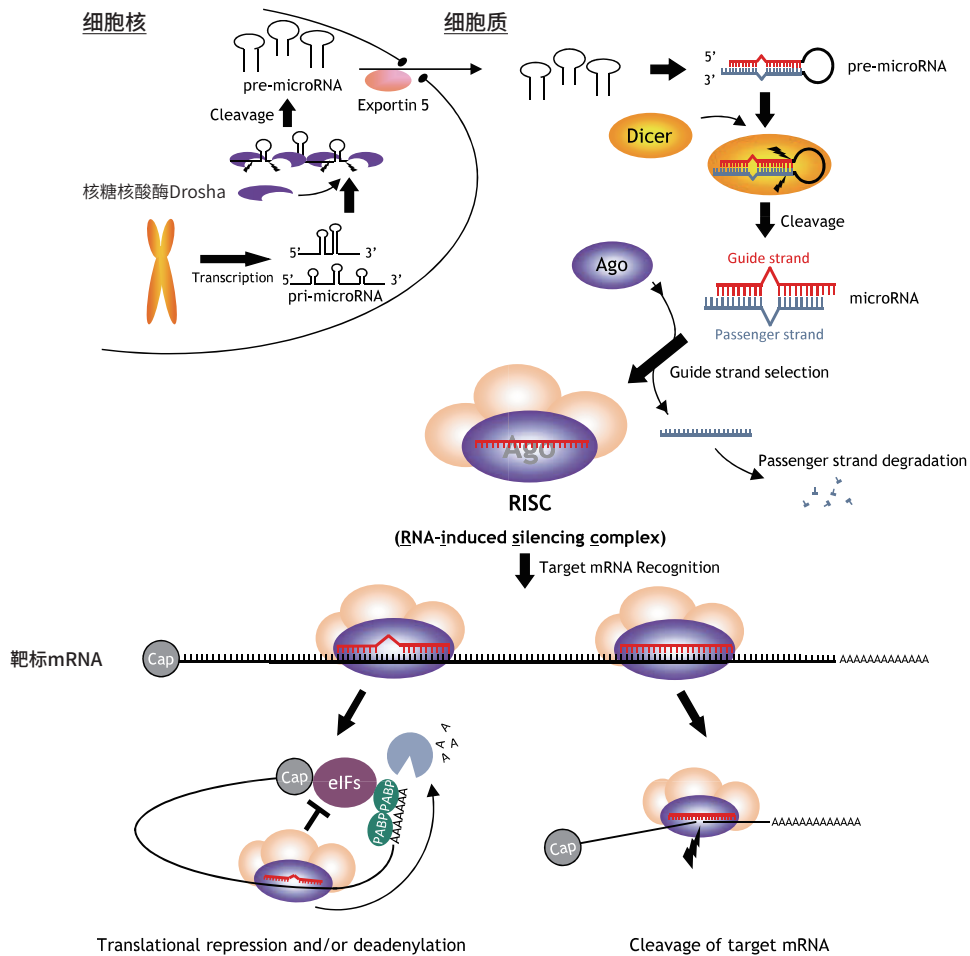


图1. RNA沉默的分子机制

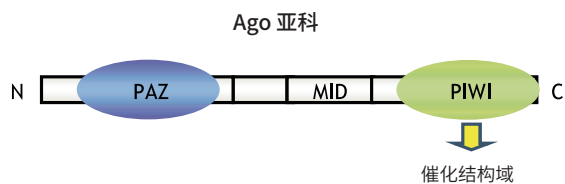


图2. PAZ域与PIWI域

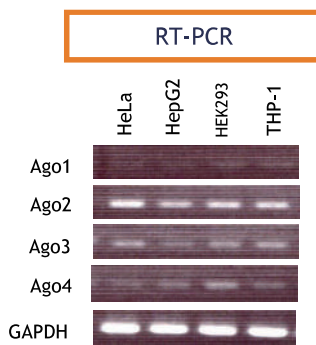
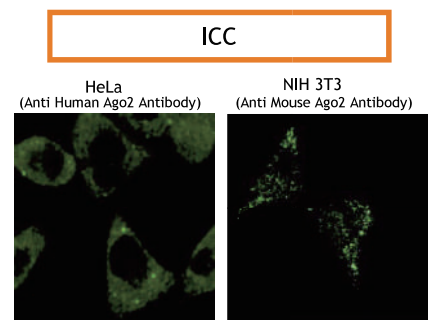


图3. hAgo1-hAgo4的表达比较



数据提供: 慶応義塾大学 塩見春彦教授

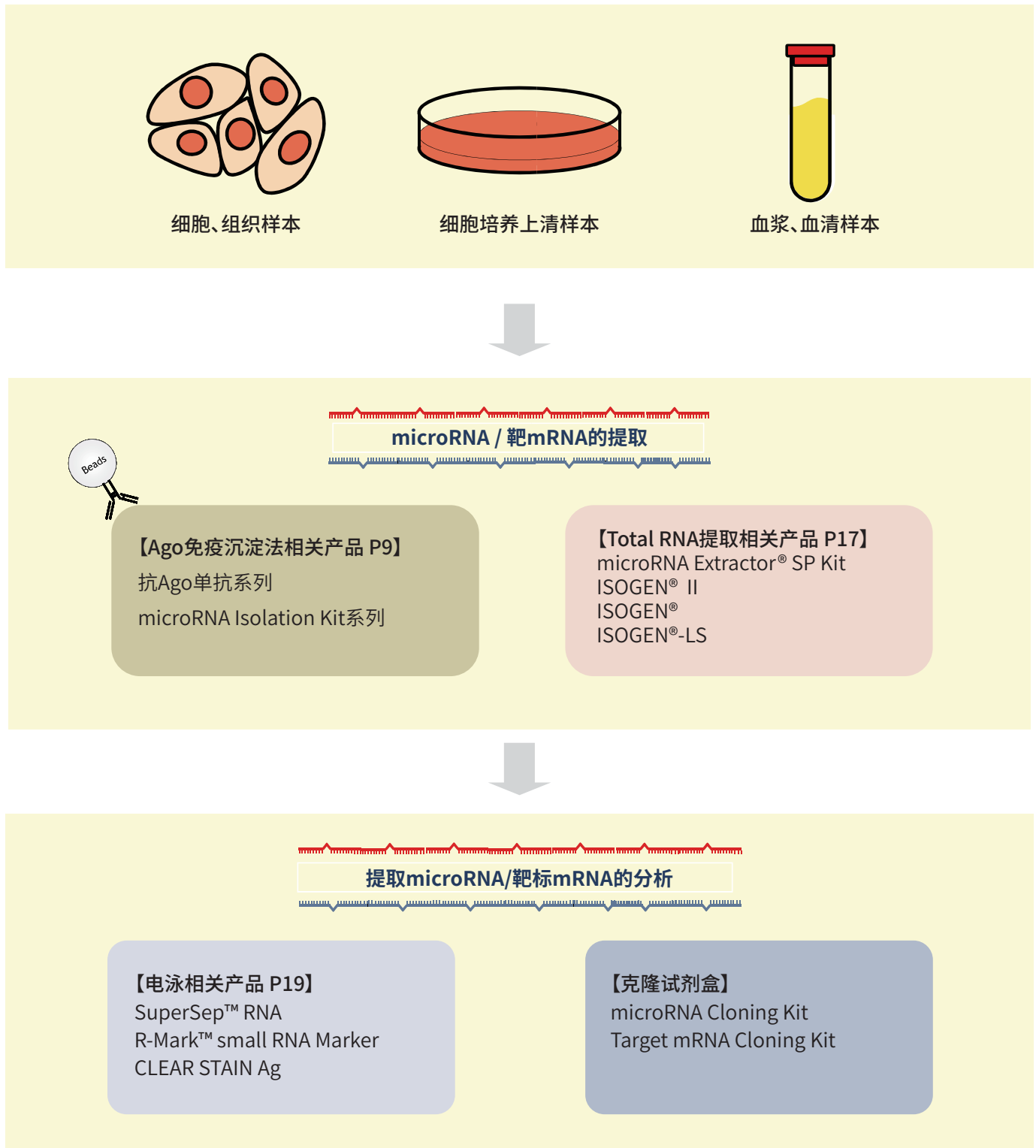
图4. Ago2的分布

## References

1. Bartel DP: MicroRNA:genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004, 116:281-297.
2. Cortez MA, Calin GA : MicroRNA identification in plasma and serum: a new tool to diagnose and monitor diseases. *Expert Opin Biol Ther* 2009, 9:703-711
3. Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ: An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 2000, 404:293-296.
4. Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, Kobayashi R, Hannon GJ: Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* 2001, 293:1146-1150.
5. Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R: Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 2005, 123:631-640.
6. Sasaki T, Shiohama A, Minoshima S, Shimizu N: Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome. *Genomics* 2003, 82:323-330.
7. Pillai RS, Artus CG., Filipowicz W: Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis. *RNA* 2004, 10:1518-1525.
8. Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T: Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 2004, 15:185-197.
9. Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L, Hannon GJ: Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 2004, 305:1437-1441.
10. Song JJ, Smith SK, Hannon GJ, Joshua-Tor L: Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 2004, 305:1434-1437.
11. Meister G, Tuschl T: Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 2004, 431:343-349.
12. Hutvagner G, Zamore PD: A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 2002, 297:2056-2060.
13. Yekta S, Shih IH, Bartel DP: MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* 2004, 304:594-596.
14. Beitzinger M, Peters L, Zhu JY, Kremmer E, Meister G: Identification of human microRNA targets from isolated Argonaute protein complexes. *RNA Biol* 2007, 4:76-84.
15. Karginov FV, Conaco C, Xuan Z, Schmidt BH, Parker JS, Mandel G, Hannon GJ: A biochemical approach to identifying microRNA targets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007, 104:19291-19296.
16. Easow G, Teleman AA, Cohen SM: Isolation of microRNA targets by miRNP immunopurification. *RNA* 2007, 13:1198-1204.
17. Hendrickson DG, Hogan DJ, Herschlag D, Ferrell JE, Brown PO: Systematic identification of mRNAs recruited to Argonaute2 by specific microRNAs and corresponding changes in transcript abundance. *PloS ONE* 2008, 3:e2126.
18. Landthaler M, Gaidatzis D, Rothballer A, Chen PY, Soll SJ, Dinic L, Ojo T, Hafner M, Zavolan M, Tuschl T: Molecular characterization of human Argonaute-containing ribonucleoprotein complexes and their bound target mRNAs. *RNA* 2008, 14:2580-2596.
19. Chi SW, Zang JB, Mele A, Darnell RB: Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA-mRNA interaction maps. *Nature* 2009, 460:479-486.
20. Wang WX, Wilfred BR, Hu Y, Stromberg AJ, Nelson PT: Anti-Argonaute RIP-Chip shows that miRNA transfections alter global patterns of mRNA recruitment to microribonucleoprotein complexes. *RNA* 2009 Dec.30.
21. Hayashida Y, Nishibu T, Inoue K, Kurokawa T: A useful approach to total analysis of RISC associated RNA . *BMC Res Notes* 2009, 2:169.

# 1. 产品系列概述

FUJIFILM Wako 提供适用于人和小鼠各种 Ago 亚科蛋白的单抗、以这些抗体的免疫沉淀法 (Ago IP 法) 为原理的 microRNA Isolation Kit 系列、从样本中简易提取 total RNA 的 ISOGEN® 以及 microRNA Extractor® SP Kit 等产品, 能按需从各种样本中提取含有 microRNA 的组分。



## 2. Ago免疫沉淀法概述

FUJIFILM Wako (富士フイルム和光純薬株式会社) Ago亚科蛋白miRNA相关产品系列 (物种:人,小鼠):

- Ago亚科蛋白单克隆抗体
- 免疫沉淀法miRNA提取试剂盒 (磁珠型/硅胶珠型)

利用上述产品进行实验有以下3个优势 (P6、P7、P8), 这是一般的total RNA提取所不具备的。

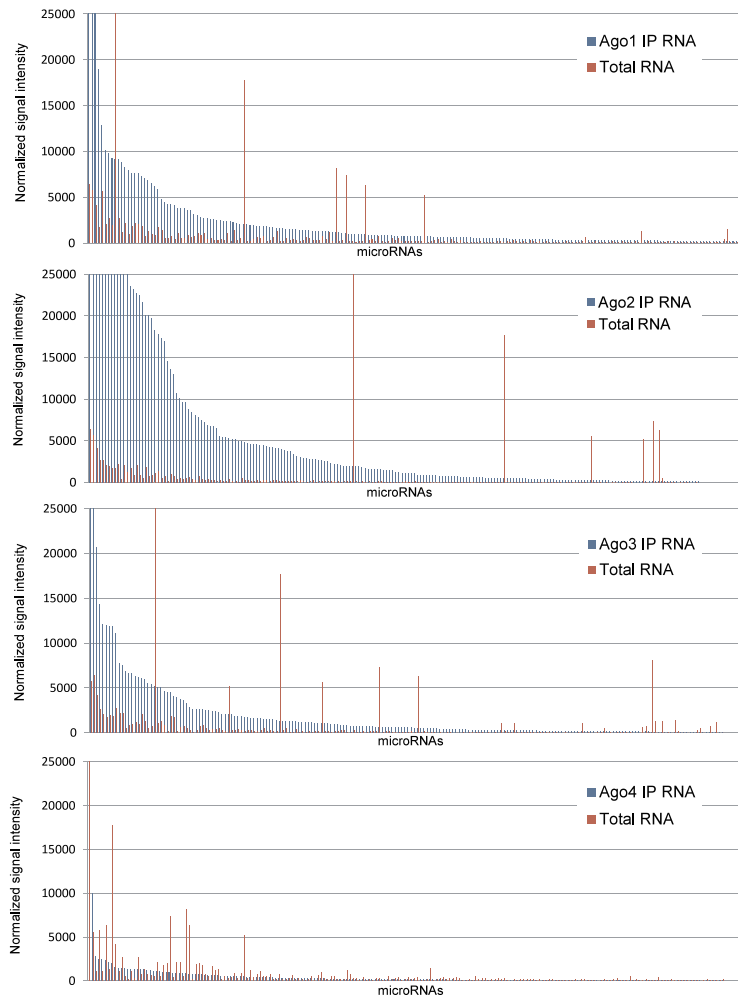
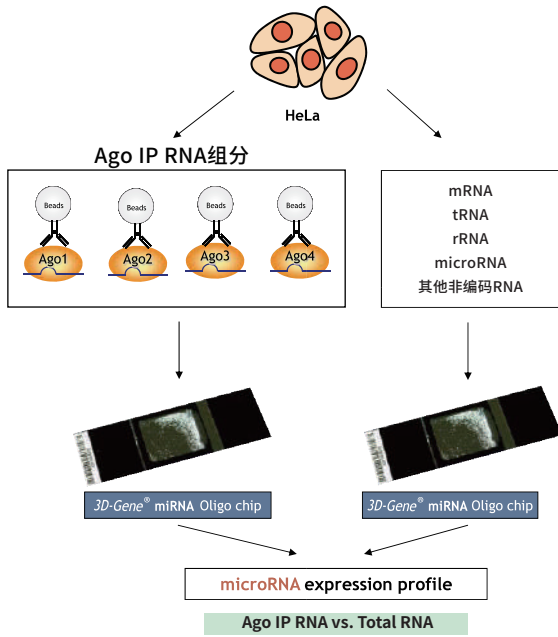
### 特点1

### 富集RISC中的成熟microRNA

利用Ago IP法获得的RNA组分中富集了被RISC捕获的成熟体microRNA, 因此, 在微阵列检测或新一代序列分析中能提高microRNA的检测灵敏度, 抑制其他RNA的非特异信号。

#### 例 HeLa细胞的Ago IP RNA组分与total RNA组分的组群比较

在HeLa细胞中使用特异性识别Ago亚科蛋白 (Ago1, 2, 3, 4) 的单抗, 利用微阵列检测分析, 比较进行免疫沉淀后的RNA (Ago IP RNA组分) 和使用ISOGEN® (AGPC法) 制备的total RNA组分中含有的microRNA组群 (图1)。结果发现, 富集于各种Ago IP RNA比total RNA组分中的microRNA组分更多 (Ago4 IP RNA组分除外), 检测到的信号也更强 (图2)。另外, total RNA中未被RISC捕获的microRNA在total RNA中信号强烈, 但在Ago IP RNA组分中几乎检测不到。



## 特点2

## 富集与RISC结合的靶标mRNA

利用Ago IP法获得的RNA组分中富集了microRNA的靶标mRNA,所以能在分析靶标mRNA时可采用cDNA克隆、qPCR、微阵列检测和NGS(二代测序)等方法。

### 例 富集肝脏特异性microRNA(miR-122)的靶标mRNA

向miR-122低表达的肝癌细胞株HepG2细胞导入人工合成的miR-122或对照的荧光素酶siRNA(Luc siRNA),从各组细胞中以抗人Ago2单抗(4G8)制备得到Ago2 IP RNA,同时以ISOGEN制备total RNA。以qPCR比较各个细胞所含的Ago2 IP RNA和total RNA中miR-122的靶标mRNA(Aldo A mRNA是miR-122靶标之一,以GAPDH内参作校正)表达量(图1)。

结果表明,在miR-122转染细胞中,total RNA组分中的Aldo A mRNA表达量会因RISC分解的影响而减少,但在Ago2 IP RNA组分中它又会富集并增加(图2)。

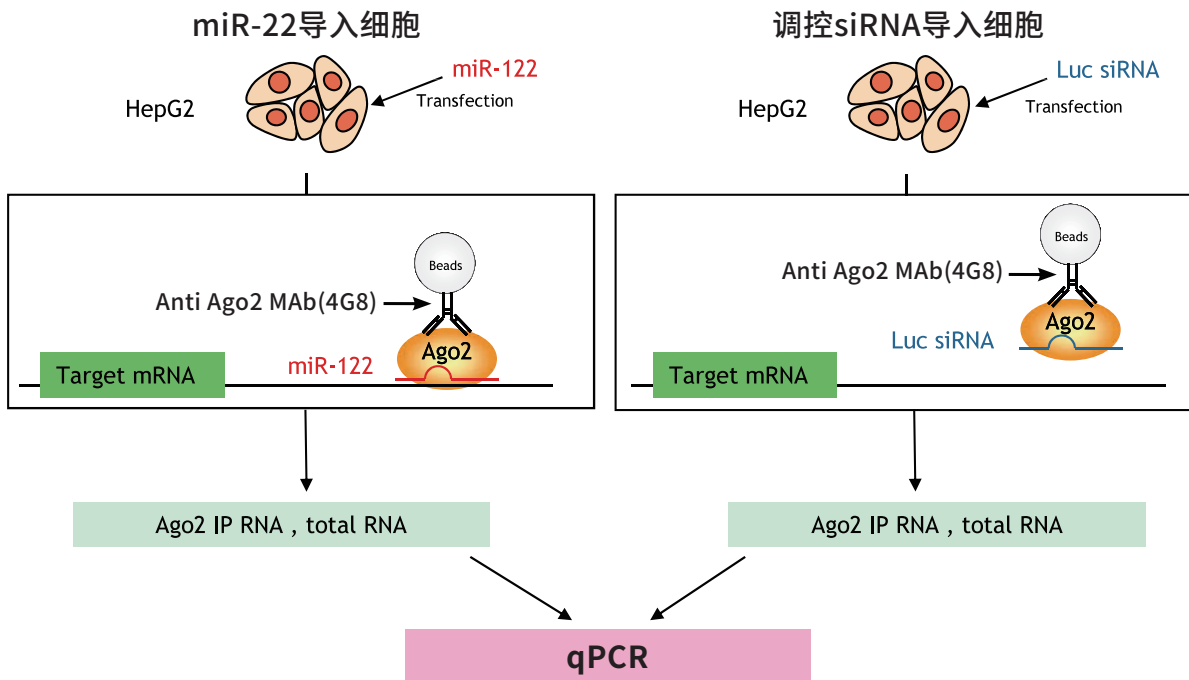


图1. 实验流程

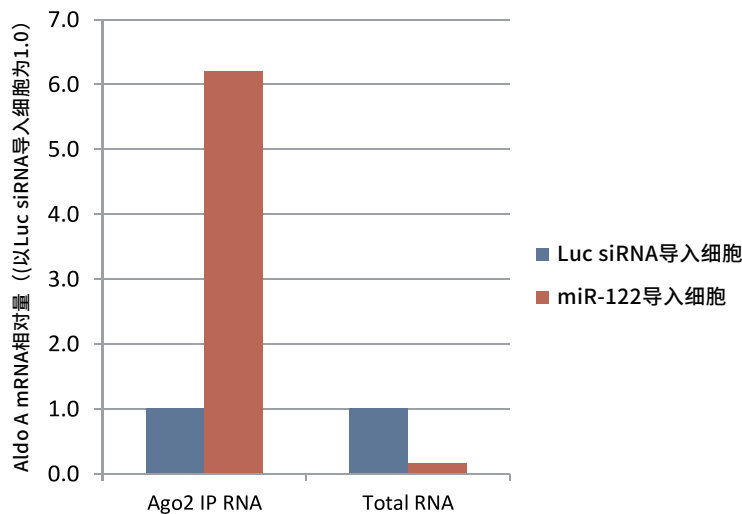


图2. qPCR比较Aldo A mRNA表达量

### 特点3

### 富集与血液中游离Ago蛋白结合的microRNA

血液中含有外泌体内含型microRNA、HDL结合型microRNA和Ago蛋白结合型microRNA。通过Ago免疫沉淀法,能特异性分离Ago蛋白结合型microRNA,并能运用于开发新的生物标记物。

#### 例1 从人血浆中分离Ago2蛋白结合型microRNA

运用qPCR(Ct值),比较用抗Ago2单抗(4G8)从健康人的混合血浆中免疫沉淀的Ago2 IP RNA和用microRNA Extractor® SP Kit提取total RNA中所含的microRNA(任意12种)(图1)。

结果显示,大部分total RNA中的microRNA也存在于Ago2 IP RNA组分中。其中,miR-22和miR-92a高度富集于Ago2 IP RNA组分中(Ago2 IP RNA相对于total RNA的Ct值较低)(图2)。

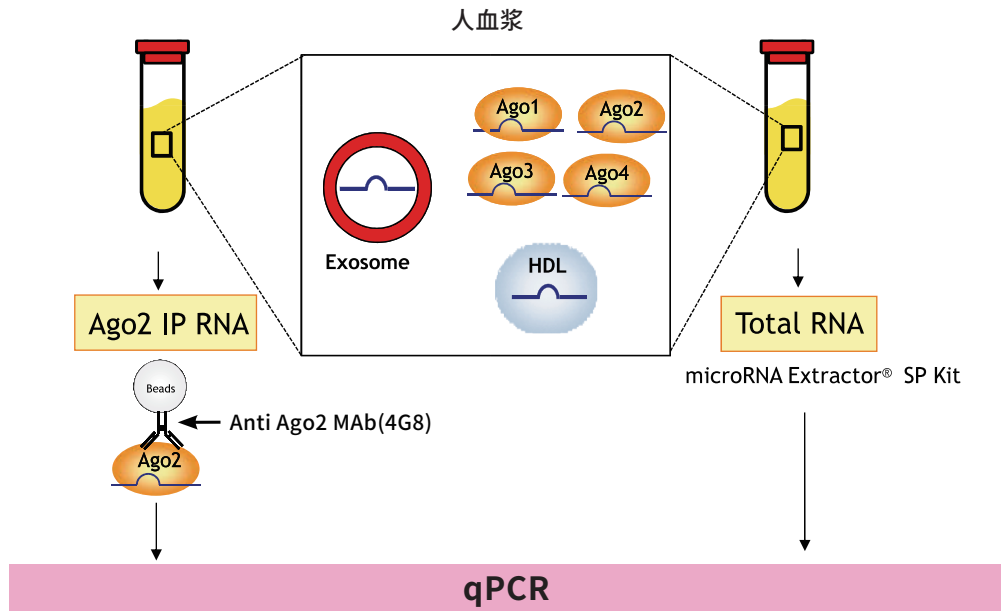


图1. 实验流程

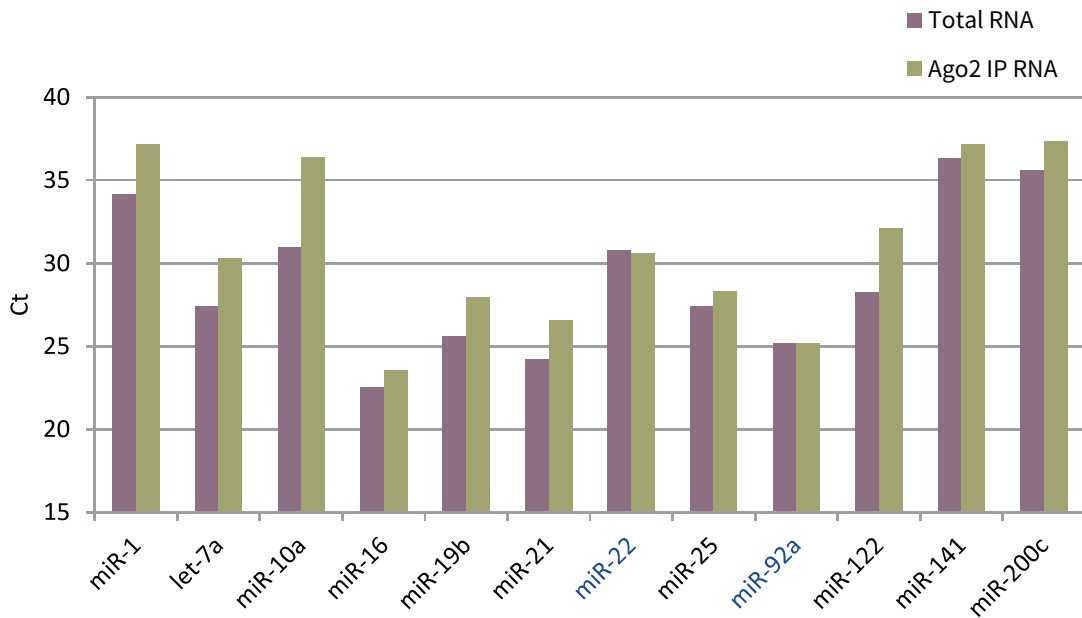


图2. qPCR比较microRNA量(Ct值)



## 例2 从健康人混合血浆中分离各种Ago结合型microRNA

运用qPCR进行绝对定量, 比较用抗Ago1单抗(2A7)、抗Ago2单抗(4G8)、抗Ago3单抗(1C12)和抗Ago4单抗(2G7)从健康人pool血浆中免疫沉淀得到的各种RNA(Ago1, 2, 3, 4 IP RNA)所含的microRNA(miR-92a、miR-122)(图1)。结果发现, 血浆中的Ago2 IP RNA组分和其他Ago IP RNA组分都含有microRNA, 肝脏特异性miR-122高度富集于Ago3 IP RNA组分中(图2)。

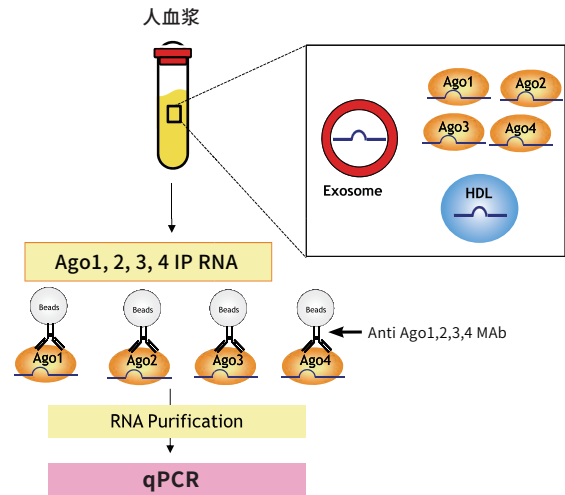


图1. 实验流程

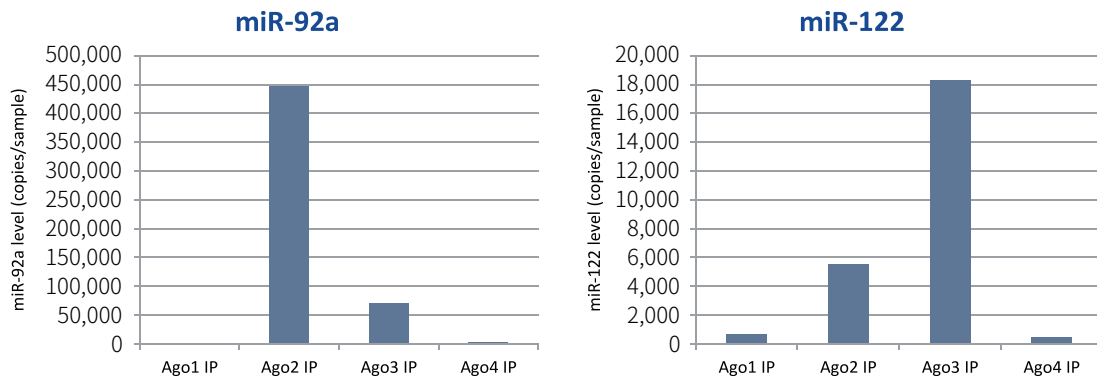


图2. qPCR比较各个Ago IP RNA组分中的microRNA量

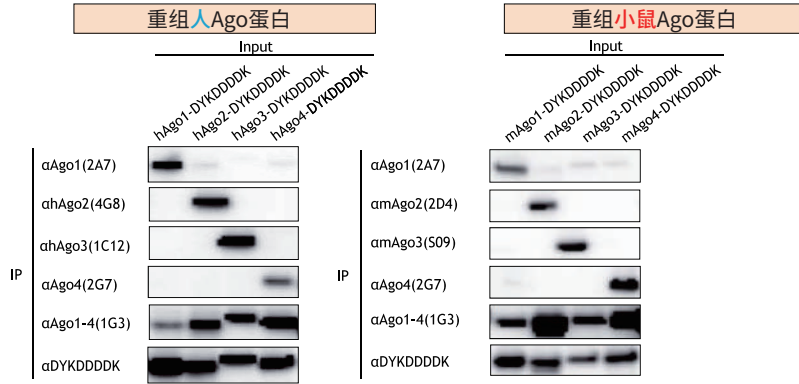
## 3. 抗Ago单抗系列

FUJIFILM Wako有识别人和小鼠各种Ago亚科蛋白的小鼠源单抗, 供免疫沉淀与免疫印迹检测(Western Blotting)实验用。免疫沉淀用抗体能与人和小鼠样本中各种Ago亚科蛋白产生特异性免疫共沉淀, 从而提取结合了各种Ago蛋白的microRNA。另外, 可以通过免疫印迹用抗体检测出免疫沉淀所提取的蛋白。

抗原	交叉性	产品编号	产品名称	克隆号	亚型	用途
Ago1	人、小鼠	015-22411	抗Ago1, 单抗(2A7)	2A7	IgG <sub>2a-k</sub>	IP, ICC, RIP
		018-22401	抗Ago1, 单抗(1F2)	1F2	IgG <sub>2a-k</sub>	WB
Ago2	人	011-22033	抗人Ago2, 单抗	4G8	IgG <sub>1</sub>	IP, WB, ICC, RIP
		015-22031				
	小鼠	014-22023	抗小鼠Ago2, 单抗	2D4	IgG <sub>1</sub>	IP, WB, ICC, RIP
Ago3	人	018-23241	抗人Ago3, 单抗(1C12)	1C12	IgG <sub>1</sub>	IP, RIP
		010-23821	抗Ago3, 单抗(6-107)	6-107	IgG <sub>1-k</sub>	WB
	小鼠	012-25503	抗小鼠Ago3, 单抗(S09)	S09	IgG <sub>1-k</sub>	IP, RIP
		013-25491	抗小鼠Ago3, 单抗(S011)	S011	IgG <sub>1-k</sub>	WB
		019-25493				
Ago4	人、小鼠	019-24751	抗Ago4, 单抗(2G7)	2G7	IgG <sub>2b</sub>	IP, RIP
		012-24741	抗Ago4, 单抗(2B2)	2B2	IgG <sub>1</sub>	WB
Ago1-4	人、小鼠	012-25581	抗Ago1-4, 单抗(1G3)	1G3	IgG <sub>1</sub>	IP, WB
		018-25583				
		016-25584				

## 重组Ago蛋白的免疫沉淀

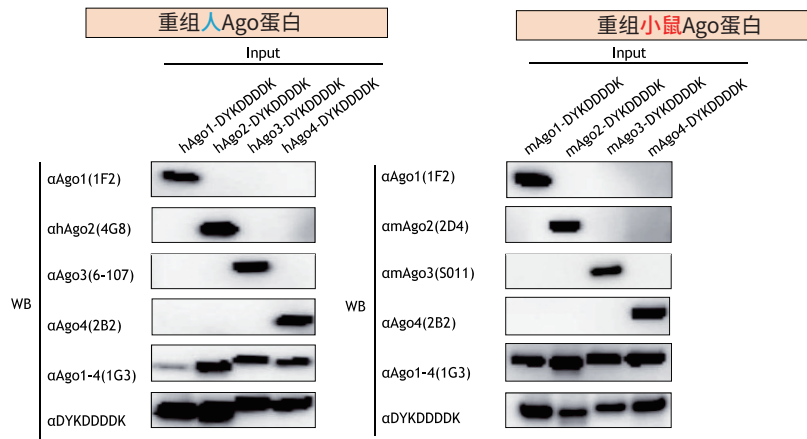
用人和小鼠的重组Ago蛋白 (C端与DYKDDDDK标签融合) 评估抗体的免疫沉淀能力。抗Ago1、Ago2、Ago3、Ago4抗体分别能特异性免疫沉淀对应的重组Ago蛋白, 而抗Ago1-4抗体能免疫沉淀所有Ago亚科蛋白。



【检测】一抗: 抗DYKDDDDK抗体 (1E6) 二抗: 抗小鼠IgG、过氧化物酶结合

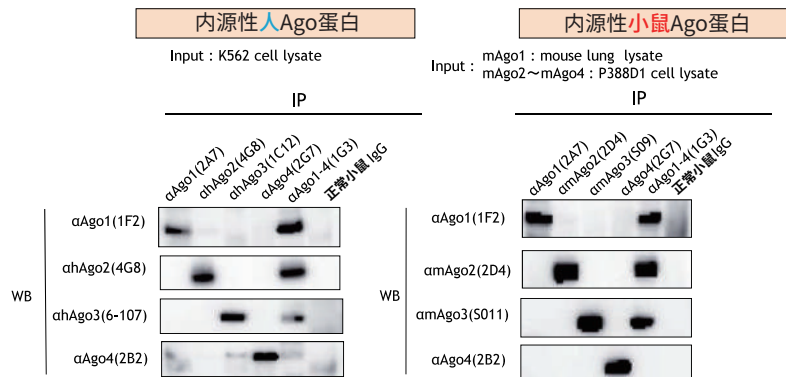
## 重组Ago蛋白的免疫印迹检测

用人和小鼠的重组Ago蛋白 (C端与DYKDDDDK标签融合) 评估抗体的免疫印迹检测能力。结果显示, 抗Ago1、Ago2、Ago3、Ago4抗体分别能特异性检测出对应的重组Ago蛋白, 而抗Ago1-4抗体能检测所有Ago亚科蛋白。



【检测】一抗: 各种抗Ago单抗 二抗: 抗小鼠IgG、过氧化物酶结合

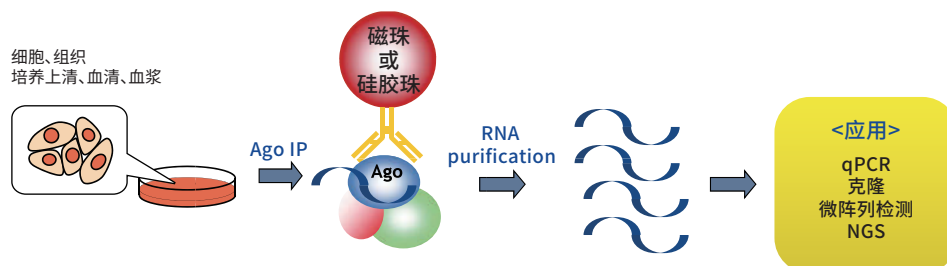
## 内源性Ago蛋白的免疫沉淀与免疫印迹检测



【检测】一抗: 各种抗Ago单抗 二抗: 抗小鼠IgG、过氧化物酶结合

## 4. microRNA Isolation Kit系列

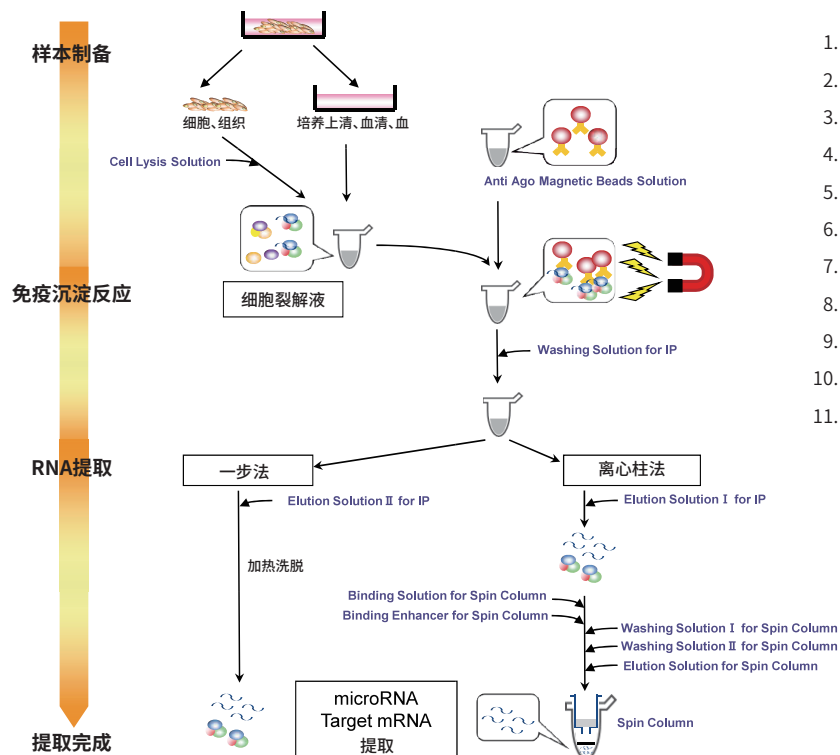
FUJIFILM Wako提供能使从Ago 免疫沉淀到RNA 提取等一系列实验操作简化的microRNA Isolation Kit系列。使用本系列试剂盒能简便地从人和小鼠的细胞或组织中提取Ago蛋白结合的microRNA以及靶mRNA, 还能从培养上清、血清、血浆中提取游离Ago蛋白结合的microRNA。所提取到的RNA可以应用于qPCR、微阵列检测、NGS等下游实验。本系列包括采用磁珠的MagCapture™ microRNA Isolation Kit, 以及采用了硅胶珠法的microRNA Isolation Kit。



### 4-1. MagCapture™ microRNA Isolation Kit (磁珠法)

本产品包括含抗人Ago2抗体 (4G8)、抗小鼠Ago2抗体 (2D4)、抗Ago1-4抗体 (1G3) 固相化磁珠这三种试剂盒, 以及第四种——能结合任意抗体的Protein G磁珠。上述试剂盒全部采用磁珠法, 可进行简易的免疫沉淀操作并获得良好的重复性。免疫沉淀后提取的RNA可进一步使用离心柱纯化, 获得高纯度的RNA; 若使用含有抗Ago抗体固定化磁珠的3种试剂盒, 也可使用一步法更加简便地提取RNA (备注: RNA与磁珠不分离)。

#### 操作示意图



#### 试剂盒组成 (例: Human Ago2, 10次用)

1. Anti-Human Ago2 Magnetic Beads Solution 600μL×1瓶
2. Cell Lysis Solution 20mL×1瓶
3. Washing Solution for IP 40mL×1瓶
4. Elution Solution I for IP 500μL×1瓶
5. Elution Solution II for IP 500μL×1瓶
6. Binding Solution for Spin Column 2mL×1瓶
7. Binding Enhancer for Spin Column 100μL×1瓶
8. Washing Solution I for Spin Column 3mL×1瓶
9. Washing Solution II for Spin Column 4mL×1瓶
10. Elution Solution for Spin Column 1mL×1瓶
11. Spin Column/Collection Tube 10瓶

产品编号	产品名称	使用抗体克隆号	对应物种	对应样本	提取RNA	IP B/F分离法	RNA提取法
295-74001	MagCapture™ microRNA Isolation Kit, Human Ago2	4G8	人、猴、狗	细胞/组织 血清/血浆	microRNA	磁力分离	离心柱法
297-74201	MagCapture™ microRNA Isolation Kit, Mouse Ago2	2D4	小鼠、大鼠、狗		靶标mRNA		
293-74801	MagCapture™ microRNA Isolation Kit, Ago 1-4	1G3	人、猴、狗、小鼠、大鼠	microRNA	一步法		
299-74401	MagCapture™ microRNA Isolation Kit, Protein G	随意选择	根据使用的抗体而定	细胞/组织	根据使用的抗体而定		一步法

### 提取人细胞株中的microRNA

通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (银染), 检测使用本品 (MagCapture™ microRNA Isolation Kit, Human Ago2) 从人K562细胞 ( $1 \times 10^7$  cells) 中提取的microRNA (图1)。结果显示, 本系列试剂盒可提取得到高纯度的microRNA。通过qPCR对miR-92a进行定量, 比较使用本品和硅胶珠型产品 (microRNA Isolation Kit, Human Ago2) 提取的microRNA量 (图2)。本系列试剂盒的离心柱法具有几乎与硅胶珠法相同的microRNA提取能力, 而且一步法的microRNA提取能力比硅胶珠法更好。

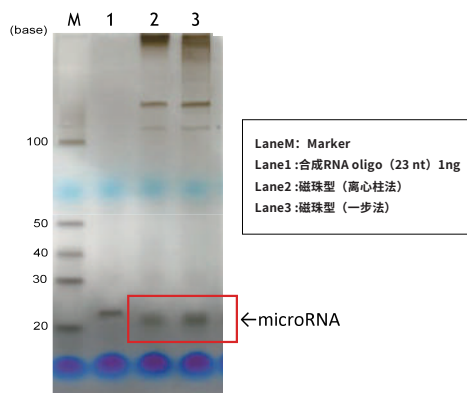


图1. 对从人K562细胞中提取的microRNA的进行银染检测

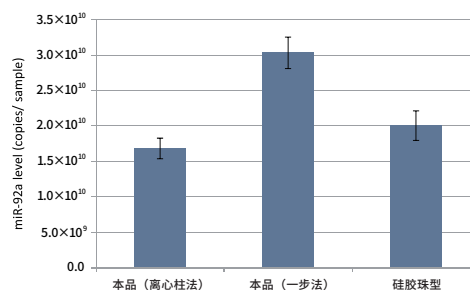


图2. 比较从人K562细胞中提取的microRNA量

### 提取人血浆中的游离Ago2蛋白结合microRNA

以qPCR对miR-92a进行定量, 比较使用磁珠型MagCapture™ microRNA Isolation Kit, Human Ago2和硅胶珠型产品从200μL健康人混合血浆中提取的microRNA量。结果发现, 本试剂盒中的离心柱法具有几乎与硅胶珠型产品相同的microRNA提取能力, 而且一步法的microRNA提取量比硅胶珠型高 (图3)。

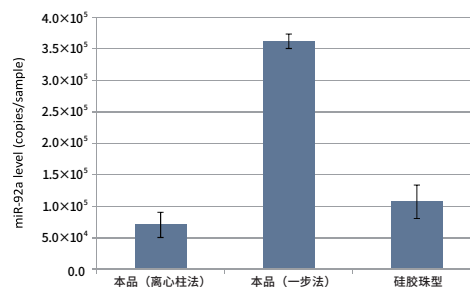


图3. 比较从人血浆中提取的microRNA量

### 提取microRNA的靶标mRNA

向miR-122低表达的肝癌细胞株HepG2细胞 ( $5 \times 10^5$  cells) 导入人工合成的miR-122或调控的荧光素酶siRNA (Luc siRNA), 提取了分别用磁珠型MagCapture™ microRNA Isolation Kit, Human Ago2和硅胶珠型产品制备的Ago2 IP RNA, 以及用ISOGEN® 制备的total RNA。运用qPCR法比较各种RNA中含有的miR-122量 (图4) 与其靶标mRNA (Aldo A mRNA是miR-122靶标之一, 以GAPDH内参作校正) 量 (图5)。与硅胶珠型产品一样, 本品提取的RNA中富集了miR-122和Aldo A mRNA, 因此, 可以利用本品提取microRNA的靶标mRNA。另一方面, 用ISOGEN® 制备的total RNA中的Aldo A mRNA会随着miR-122的增加而分解并减少。

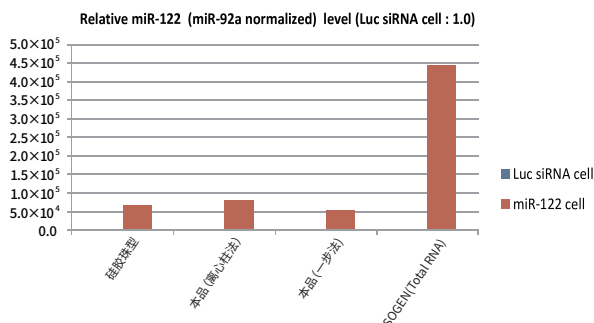


图4. miR-122提取量的比较

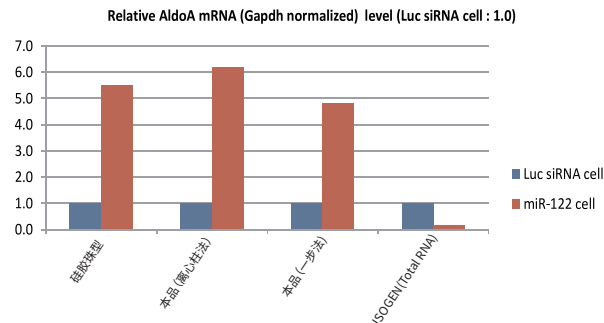


图5. 靶标mRNA提取量的比较

## MagCapture™ microRNA Isolation Kit, Mouse Ago2 使用例子 (小鼠)

### 从小鼠细胞株中提取microRNA

通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(银染),检测用本试剂盒(MagCapture™ microRNA Isolation Kit, Mouse Ago2)从小鼠P388D1细胞( $2 \times 10^7$  cells)中提取的microRNA(图1)。结果显示,本品能提取出高纯度的microRNA。另外,以qPCR法对miR-92a进行定量,比较使用硅胶珠型产品(microRNA Isolation Kit, Mouse Ago2)提取到的microRNA量(图2)。结果发现,本品的离心柱法具有与硅胶珠型产品几乎同样的microRNA提取能力,而一步法的microRNA提取能力比硅胶珠型产品更好。

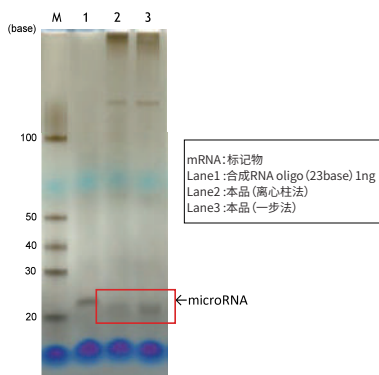


图1. 对从小鼠P388D1细胞中提取的microRNA的进行银染检测

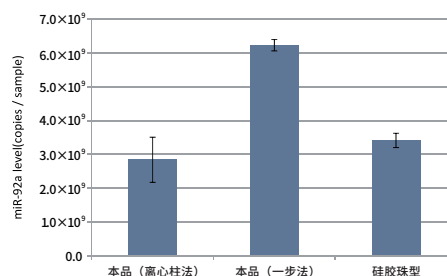


图2. 比较从小鼠P388D1细胞中提取的microRNA量

### 从大鼠血浆中提取游离Ago2蛋白结合microRNA

通过qPCR对miR-92a进行定量,比较使用本品以及硅胶珠型产品从200 $\mu$ L大鼠血浆中提取到的microRNA量。本品的离心柱法具有与硅胶珠型产品几乎同样的microRNA提取能力,而一步法的microRNA提取能力比硅胶珠型产品更好(图3)。

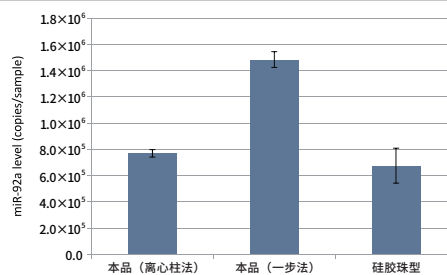


图3. 比较大鼠血浆中提取的microRNA量

## MagCapture™ microRNA Isolation Kit, Ago 1-4 使用例子 (人)

### 提取Ago1-4结合microRNA

用各种Ago1、Ago2、Ago3、Ago4特异性抗体进行微阵列检测分析免疫沉淀后HeLa中的各个RNA组分,结果显示,Ago2中捕获了大量miR-22和miR-16,而Ago1、Ago3、Ago4中则捕获了大量的miR-1260b和miR-4286(表1)。分析结果验证了我们可以利用MagCapture™ microRNA Isolation Kit, Ago1-4,从Ago1、Ago3、Ago4中提取硅胶珠型产品难以提取的大量microRNA。使用本品和硅胶珠型产品提取HeLa细胞( $1 \times 10^7$  cells)中的microRNA,以miR-92a作为内部标准,通过qPCR检测miR-22、miR-1、miR-1260b、miR-4286的提取量。结果发现,Ago1、Ago3、Ago4中miR-1260b、miR-4286的提取量比硅胶珠型产品更高(图1)。因此,本品不仅能提取Ago2中的microRNA,还能从Ago1、Ago3、Ago4中提取硅胶珠型产品难以提取的大量microRNA。

Name	信号强度				信号比		
	Ago1 IP	Ago2 IP	Ago3 IP	Ago4 IP	Ago2/Ago1	Ago2/Ago3	Ago2/Ago4
hsa-miR-22	3521.4	21696.5	3771.2	292.4	6.16	5.75	74.20
hsa-miR-16	6886.3	28527.2	5013.4	582.5	4.14	5.69	48.97
hsa-miR-1260b	2060.3	540.9	1270.6	1977.9	0.26	0.43	0.27
hsa-miR-4286	678.8	202.4	2019.2	471.2	0.30	0.10	0.43

表1. 微阵列检测分析结果

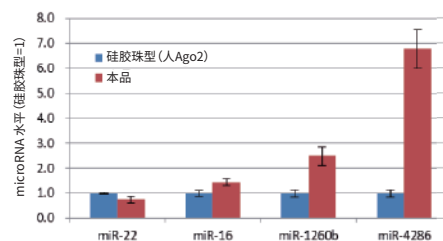


图1. 比较从HeLa细胞中提取的各种microRNA量

## 提取人和小鼠细胞株中的microRNA

以qPCR对miR-92a进行定量,比较用本品和硅胶珠型产品 (microRNA Isolation Kit, Human Ago2或Mouse Ago2) 从人K562细胞 ( $1 \times 10^7$  cells) 及小鼠P388D1细胞 ( $2 \times 10^7$  cells) 中提取的microRNA量。结果显示,本品可提取和硅胶珠型产品相同甚至更多的microRNA (图2, 3)。

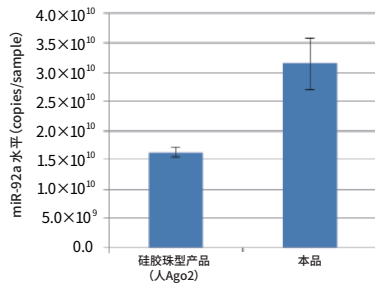


图2. 比较从人K562细胞中提取的microRNA量

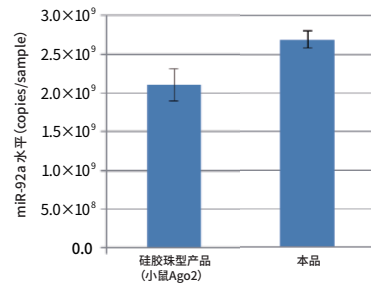


图3. 比较从小鼠P388D1细胞中提取的microRNA量

## 提取人和大鼠血浆中的游离Ago结合microRNA

以qPCR对miR-92a进行定量,比较用本品和第一代产品 (microRNA Isolation Kit, Human Ago2或Mouse Ago2) 从200 $\mu$ L人以及大鼠血浆中提取的microRNA量。结果显示,本品可提取和硅胶珠型产品相同甚至更多的microRNA (图4, 5)。

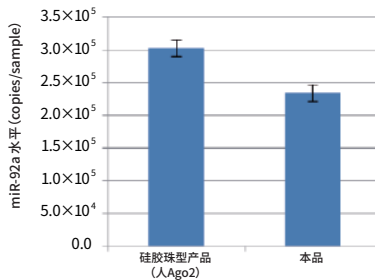


图4. 比较从人血浆中提取的microRNA量

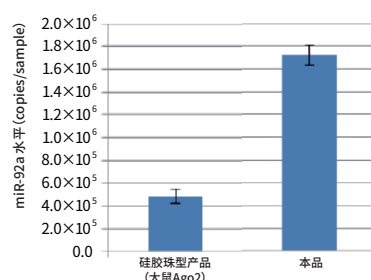


图5. 比较从大鼠血浆中提取的microRNA量

## 提取各种动物细胞株中的microRNA

以qPCR对miR-92a进行定量,检测用MagCapture™ microRNA Isolation Kit, Human Ago2、Mouse Ago2、Ago1-4从  $2 \times 10^6$  cells的K562细胞 (人)、COS-7细胞 (猴)、MDCK细胞 (狗)、P388D1细胞 (小鼠)、SCC-131细胞 (大鼠) 中提取的免疫沉淀组分中的microRNA量,和用ISOGEN® 从各种细胞中提取的total RNA组分中的microRNA量。通过比较各种免疫沉淀所得到的RNA组分中的miR-92a量和total RNA组分中的miR-92a量的相对值,表明本品适合提取上述全部细胞中的microRNA (图6)。

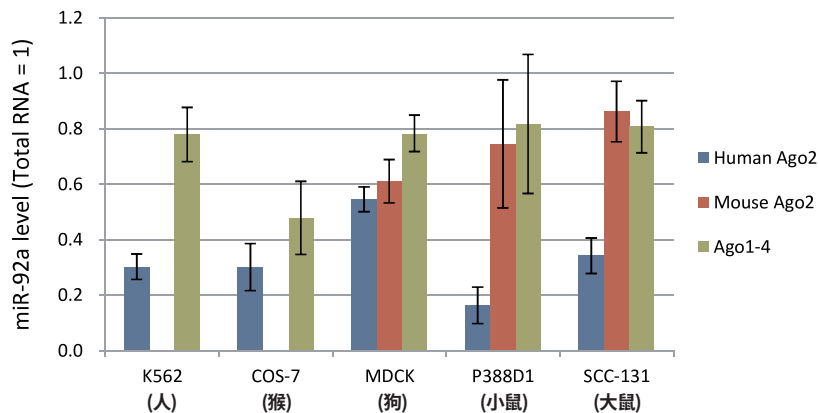
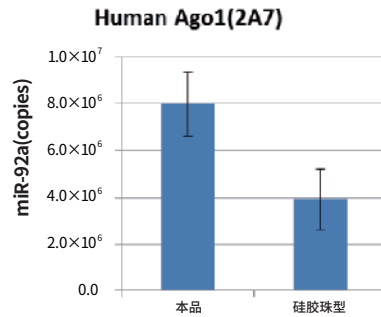


图6. 比较从各种动物细胞中提取的microRNA量

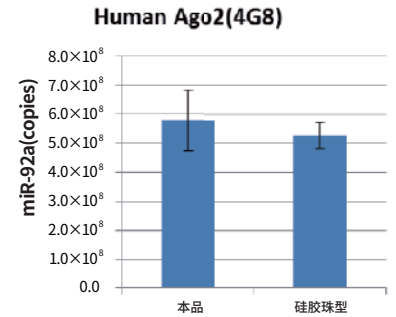
提取人和小鼠细胞株中的microRNA(与硅胶珠型产品的比较)

以 qPCR 法对 miR-92a 进行定量, 比较用本品 (MagCapture™ microRNA Isolation Kit, Protein G) 和抗 Ago1 抗体 (2A7)、抗人 Ago2 抗体 (4G8)、抗人 Ago3 抗体 (1C12) 从人 K562 细胞 ( $1 \times 10^7$  cells) 提取的 microRNA 量, 和用硅胶珠型产品 (microRNA Isolation Kit, Human/Mouse Ago1、Human Ago2、Human Ago3) 提取的 microRNA 量 (图 1,2,3)。另外, 以 qPCR 对 miR-92a 进行定量, 比较用本品和抗小鼠 Ago2 抗体 (2D4) 从小鼠 P388D1 细胞 ( $2 \times 10^7$  cells) 中提取的 microRNA 量, 和用硅胶珠型产品 (microRNA Isolation Kit, Mouse Ago2) 提取的 microRNA 量 (图 4)。结果发现, 本品与任意抗 Ago 抗体结合使用, 能比硅胶珠型产品提取到更多的 microRNA。



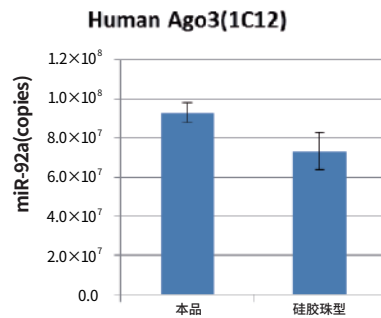
本品: 配合抗 Ago1 抗体使用  
硅胶珠型产品: microRNA Isolation Kit, Human/Mouse Ago1

图1. 比较结合了抗Ago1抗体时的microRNA提取量



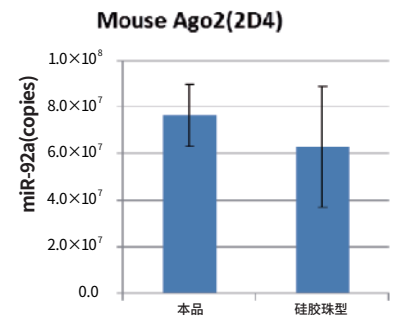
本品: 配合抗人 Ago2 抗体使用  
硅胶珠型产品: microRNA Isolation Kit, Human Ago2 (292-66701)

图2. 比较结合了抗人Ago2抗体时的microRNA提取量



本品: 配合抗人 Ago3 抗体 (1C12) 使用  
传统产品: microRNA Isolation Kit, Human Ago3 (297-70301)

图3. 比较结合了抗人Ago3抗体时的microRNA提取量

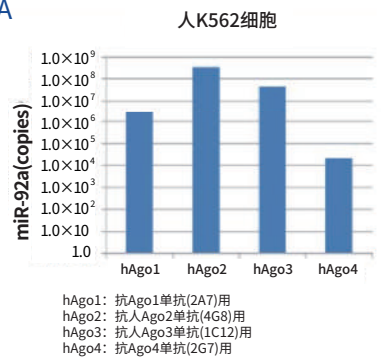


本品: 抗小鼠 Ago2 抗体 (2D4) 用  
传统产品: microRNA Isolation Kit, Mouse Ago2 (292-67301)

图4. 比较结合了抗小鼠Ago2抗体时的microRNA提取量

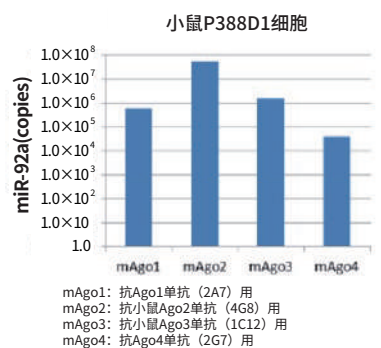
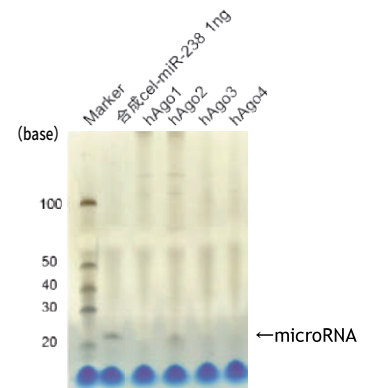
提取人与小鼠细胞株中各种Ago蛋白结合microRNA

通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和 qPCR, 对本品和抗 Ago1 抗体 (2A7)、抗人 Ago2 抗体 (4G8)、抗人 Ago3 抗体 (1C12)、抗 Ago4 抗体 (2G7) 从人 K562 细胞 ( $1 \times 10^7$  cells) 中提取的 miR-92a 表达量进行检测(图 5)。另外, 通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和 qPCR (miR-92a 量), 检测用本品和抗 Ago1 抗体 (2A7)、抗小鼠 Ago2 抗体 (2D4)、抗小鼠 Ago3 抗体 (S09)、抗 Ago4 抗体 (2G7) 从小鼠 P388D1 细胞 ( $2 \times 10^7$  cells) 中提取的 microRNA 量(图 6)。结果表明, 本品与任意的抗 Ago 抗体组合使用, 能提取与各种 Ago 结合的 microRNA。



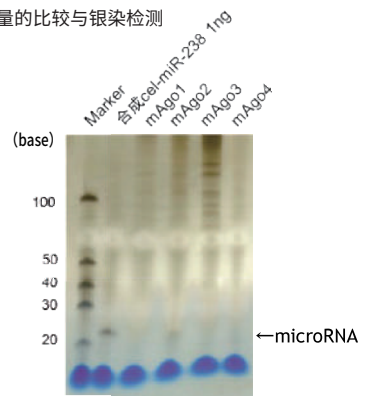
hAgo1: 抗Ago1单抗(2A7)用  
hAgo2: 抗人Ago2单抗(4G8)用  
hAgo3: 抗人Ago3单抗(1C12)用  
hAgo4: 抗Ago4单抗(2G7)用

图5. 从人K562细胞中提取的microRNA量的比较与银染检测



mAgo1: 抗Ago1单抗 (2A7) 用  
mAgo2: 抗小鼠Ago2单抗 (4G8) 用  
mAgo3: 抗小鼠Ago3单抗 (1C12) 用  
mAgo4: 抗Ago4单抗 (2G7) 用

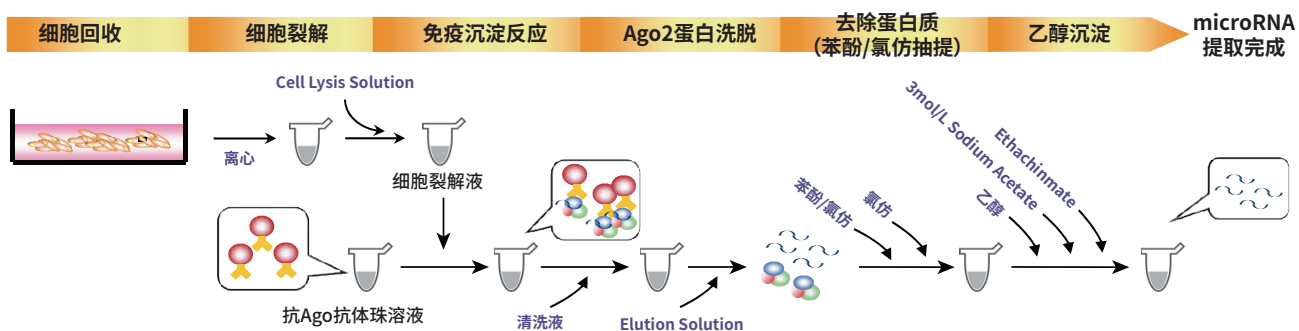
图6. 从小鼠P388D1细胞中提取的microRNA量的比较与银染检测



## 4-2. microRNA Isolation Kit (硅胶珠型)

microRNA Isolation Kit 抗 Ago 抗体固定珠子具有非特异吸附性低的特征，它采用二氧化硅基聚合物珠粒，以离心为基础进行免疫沉淀操作。在从免疫沉淀后的硅胶珠中提取 RNA 的步骤时，采用苯酚 / 氯仿提取 (P/C 法) 及乙醇沉淀来提取 RNA。FUJIFILM Wako 推出含有固定了抗 Ago1 抗体 (2A7)、抗人 Ago2 抗体 (4G8)、抗小鼠 Ago2 抗体 (2D4)、抗人 Ago3 抗体 (1C12) 的硅胶珠的 4 种试剂盒。

### 操作示意图



### 试剂盒组成 (以Human Ago2为例, 10次用)

- |  |                         |                           |                         |
|--|-------------------------|---------------------------|-------------------------|
| 1. Anti-Human Ago2 Antibody Beads Solution | 500 $\mu$ L $\times$ 1瓶 | 4. Ethachinmate           | 30 $\mu$ L $\times$ 1瓶  |
| 2. Cell Lysis Solution                     | 50 mL $\times$ 1瓶       | 5. 3 mol/L Sodium Acetate | 400 $\mu$ L $\times$ 1瓶 |
| 3. Elution Solution                        | 500 $\mu$ L $\times$ 1瓶 |                           |                         |

产品编号	产品名称	使用抗体克隆号	对应物种	对应样本	提取RNA	IP B/F分离法	RNA提取法
291-70201	microRNA Isolation Kit, Human/Mouse Ago1	2A7	人、小鼠	细胞/组织	microRNA 靶标mRNA	离心	P/C 法 (苯酚/氯仿法)
292-66701	microRNA Isolation Kit, Human Ago2	4G8	人、猴、狗				
292-67301	microRNA Isolation Kit, Mouse Ago2	2D4	小鼠、大鼠				
297-70301	microRNA Isolation Kit, Human Ago3	1C12	人				

### 试剂盒使用实例

用 microRNA Isolation Kit, Human Ago2 通过 Urea-PAGE 分离从三种  $5 \times 10^6$  cells 的人培养细胞株 (HeLa、HepG2、HEK293), 和小鼠培养细胞株 (P388D1) 中提取的 microRNA 组分, 再进行银染 (311-03961、CLEAR STAINAg、20 tests) 检测。结果表明能从人培养细胞中特异性提取 microRNA (图 1)。以同样的银染试剂, 检测用 microRNA Isolation Kit, Mouse Ago2 从  $5 \times 10^6$  cells 的人培养细胞 (HeLa) 和啮齿动物培养细胞株 (P388D1、CHO、PC-12) 中提取的 microRNA 组分。结果表明, 能从三种啮齿动物培养细胞株中特异性提取 microRNA 而不能从人细胞株中提取 (图 2)。

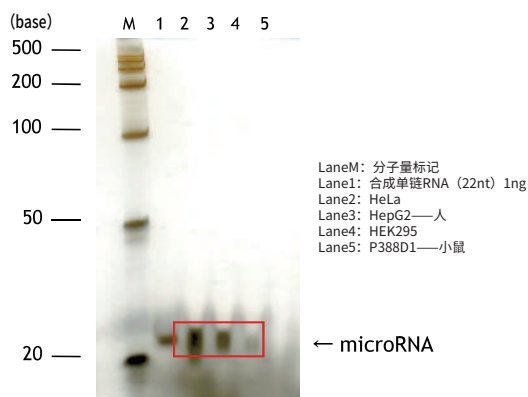


图1. 通过用Human Ago2提取的microRNA的进行银染检测

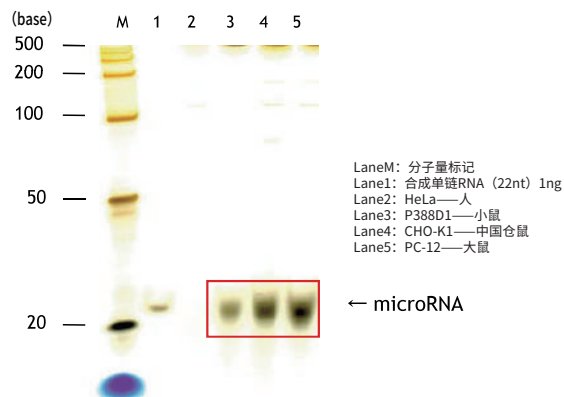


图2. 对Mouse Ago2提取的microRNA的进行银染检测



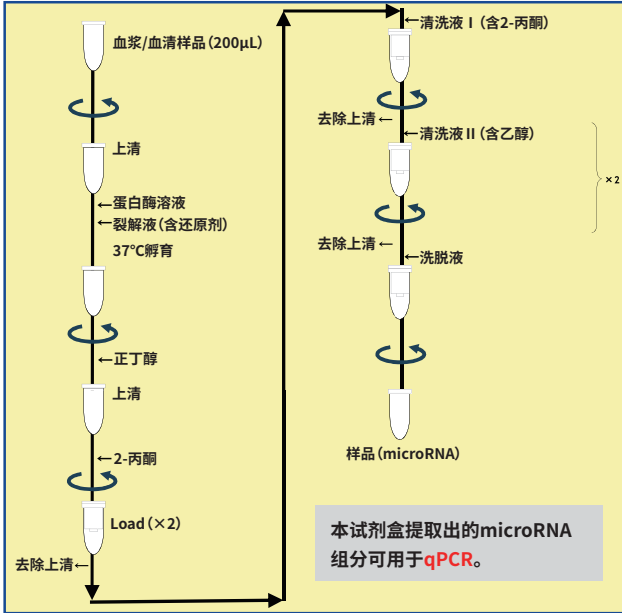
# 5. Total RNA提取

## 5-1. microRNA Extractor® SP Kit

本试剂盒能从人或动物的血清、血浆中提取含有 microRNA 的 total RNA。

无需使用传统提取法所需的苯酚、氯仿等剧毒物质即可获得高收率。

### 实验流程



### 试剂盒组成 (产品编号: 295-71701, 50 次用)

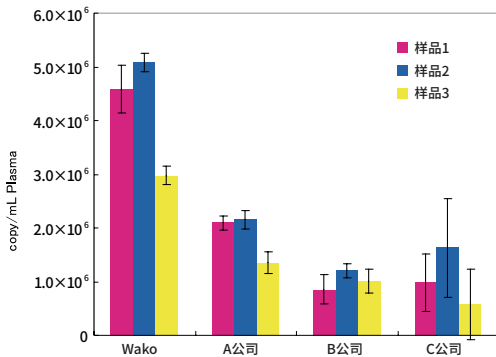
- |                 |             |
|-----------------|-------------|
| 1) 溶解液          | 20 mL × 1   |
| 2) 还原剂          | 60 µL × 1   |
| 3) 蛋白酶          | 600 µL × 1  |
| 4) 促进剂          | 600 µL × 1  |
| 5) 清洗液 I        | 12 mL × 1   |
| 6) 清洗液 II       | 22.5 mL × 1 |
| 7) 洗脱液          | 4 mL × 1    |
| 8) 离心柱 / 2mL 试管 | 50 set      |

另外还需要用到以下试剂：  
正丁醇 (产品编号 022-16035)  
2-丙酮 (产品编号 168-21675)  
乙醇 (产品编号 054-07225)

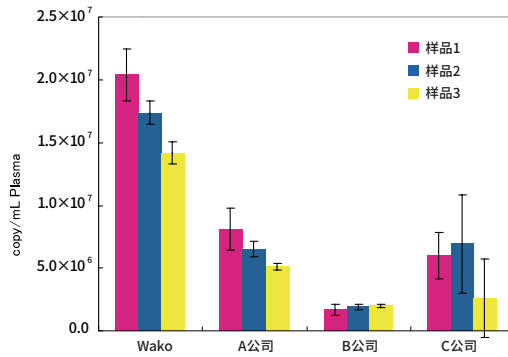


请使用 EDTA 或琥珀酸作为血浆的抗凝剂。肝素可能会抑制后续的 PCR 反应。

内源 hsa-miR-16 定量结果

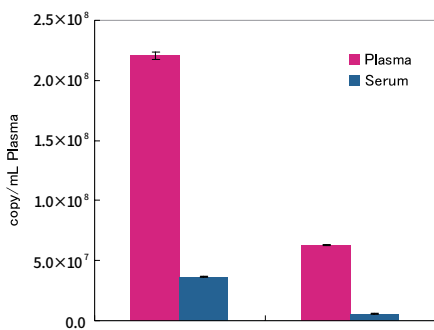


内源 hsa-miR-451 定量结果



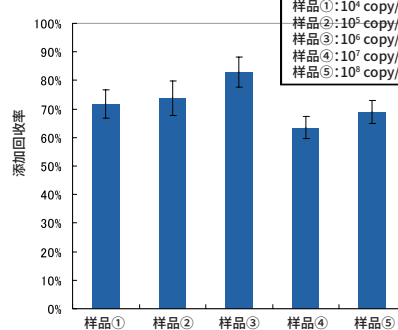
提取效率比以往的提取方法更高。

内源 rno-miR-16 提取、定量结果



也可从实验动物样本中提取。

回收·定量加入正常人血浆中的 cel-miR-238



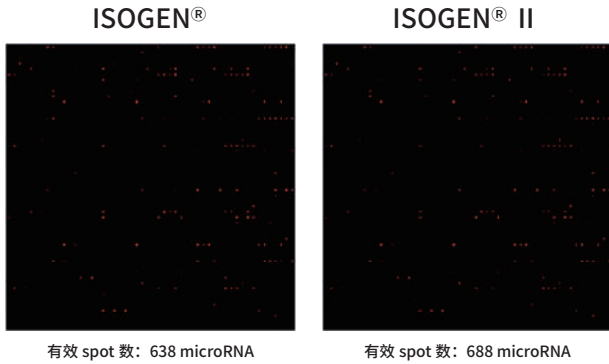
样品①: 10<sup>4</sup> copy/test (=5 × 10<sup>4</sup> copy/mL 血浆)  
样品②: 10<sup>5</sup> copy/test (=5 × 10<sup>5</sup> copy/mL 血浆)  
样品③: 10<sup>6</sup> copy/test (=5 × 10<sup>6</sup> copy/mL 血浆)  
样品④: 10<sup>7</sup> copy/test (=5 × 10<sup>7</sup> copy/mL 血浆)  
样品⑤: 10<sup>8</sup> copy/test (=5 × 10<sup>8</sup> copy/mL 血浆)

重复性高。

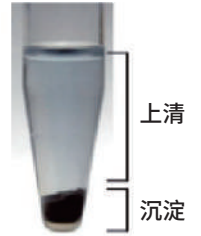
## 5-2. ISOGEN® II

ISOGEN® II 是从动物组织和培养细胞中提取 total RNA 和 small RNA 的试剂。

本品是含有苯酚和胍的均一液体,通过与细胞成分的相互作用,一步分离出 RNA。不必像以往方法的试剂 (ISOGEN® 或 ISOGEN®-LS) 一样,使用氯仿进行液相分离。



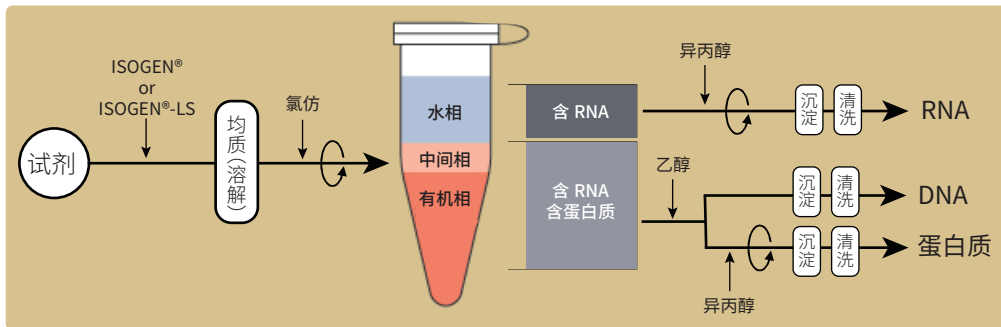
用 3D-Gene® Human miRNA Oligochip (東レ株式会社) 来分析 ISOGEN® 和 ISOGEN® II 提取的 Total RNA。  
结果显示,ISOGEN® II 能有效提取 small RNA。



产品编号	产品名称	包装
317-07363	ISOGEN® II	10 mL
311-07361	总RNA及小RNA提取试剂	100 mL

## 5-3. ISOGEN® 和 ISOGEN®-LS

ISOGEN® 和 ISOGEN®-LS 能在 1 小时左右高收率提取无损的 RNA。提取的 RNA 几乎不含 DNA 或蛋白等杂质,无需经过 DNase 处理能直接进行 Northern 分析,还能应用于斑点杂交。(图 1)



试剂			回收量
组织	小鼠	肝 脾 肾 骨骼 脑 胎盘	6~10µg RNA/mg tissue 6~10µg RNA/mg tissue 3~4µg RNA/mg tissue 1~1.5µg RNA/mg tissue 1~1.5µg RNA/mg tissue 1~4µg RNA/mg tissue
	大鼠、脑垂体或人肝穿刺活检样品		4~8µg RNA/mg tissue
植物	拟南芥或烟草		150~200µg RNA/0.5~1g weight tissue
培养细胞	上皮		8~15µg RNA/106 cell
	成纤维细胞		5~7µg RNA/106 cell
血液	(人或动物)		7~15µg RNA/ml blood

产品编号	产品名称	包装
315-02504	ISOGEN® ISOGEN RNA快速提取试剂	10 mL
317-02503		50 mL
311-02501		100 mL

产品编号	产品名称	包装
317-02623	ISOGEN®-LS	10 mL
311-02621	ISOGEN-LS 液体样本RNA抽提试剂 (血液、血清等液体样品)	100 mL

## 6. miRNA电泳分析相关试剂

用途	产品编号	产品名称	包装
电泳用RNA预制胶	194-15881	SuperSep™ RNA, 15%, 17well RNA电泳预制胶, 15%, 17孔	5 EA
电泳用RNA Marker	182-02711	R-Mark™ Small RNA Marker (20-50nt)	50 µL
聚丙烯酰胺凝胶电泳用银染试剂盒 (DNA,RNA适用)	311-03961	CLEAR STAIN Ag CLEAR银染试剂盒	20 tests
电泳buffer	318-90041	5×TBE 5×TBE缓冲液	1000 mL
microRNA克隆	290-66501	microRNA Cloning Kit Wako microRNA克隆试剂盒	8 tests
靶标mRNA克隆	298-68001	Target mRNA Cloning Kit Wako 靶标mRNA克隆试剂盒	10 tests

## 7. 用户参考文献

### hAgo2(4G8) MAb

Cell. 2014 Jan 16;156:146-157.

Inefficient SRP interaction with a nascent chain triggers a mRNA quality control pathway.

### microRNA Isolation Kit human / mouse Ago1, and human Ago2

Nucleic Acids Research , 2014,1-13.

Novel functional small RNAs are selectively loaded onto mammalian Ago1.

### microRNA Cloning Kit Wako, ssDNA Ligase, thermostable

Mol Cell. 2011 Nov 4;44(3):424-36.

MCPIP1 Ribonuclease Antagonizes Dicer and Terminates MicroRNA Biogenesis through Precursor MicroRNA Degradation.

Suzuki HI, Arase M, Matsuyama H, Choi YL, Ueno T, Mano H, Sugimoto K, Miyazono K.

### Ago1(2A7), hAgo2(4G8), hAgo3(1C12) MAb

RNA Biol. 2011 Jan 1;8(1).

Deep-sequencing of human Argonaute-associated small RNAs provides insight into microRNA sorting and reveals Argonaute association with RNA fragments of diverse origin.

Burroughs AM, Ando Y, Hoon ML, Tomaru Y, Suzuki H, Hayashizaki Y, Daub CO.,

### hAgo2(4G8) MAb

PNAS 2011 Mar 29.

MicroRNA let-7 establishes expression of  $\beta$ 2-adrenergic receptors and dynamically down-regulates agonist-promoted down-regulation.

Wang WC, Juan AH, Panebra A, Liggett SB.

### mAgo2(2D4) MAb

EMBO J . 2011 March 2; 30(5): 823-834.

Small RNA-mediated regulation of iPS cell generation Zhonghan Li,Chao-Shun Yang, Katsuhiko Nakashima, and Tariq M Rana

### mAgo2(2D4) MAb

Molecular Pharmacology March 22, 2011

RISC bound siRNA is a determinant of RNAi mediated gene silencing in mice.

Wei J, Jones J, Kang J, Card A, Krimm M, Hancock P, Pei Y, Ason B, Payson E, Dubinina N, Cancilla M, Stroh M, Burchard J, Sachs A, Hochman J, Flanagan WM, Kuklin N.

### mAgo2(2D4) MAb

Nature structural & molecular biology 2011, 18, 2, Feb

Genome-wide identification of Ago2 binding sites from mouse embryonic stem cells with and without mature microRNA.

Leung AK, Young AG, Bhutkar A, Zheng GX, Bosson AD, Nielsen CB, Sharp PA.

### Ago1(2A7), hAgo2(4G8), hAgo3(1C12) MAb

### microRNA Isolation Kit, Ago1, Human Ago2 and Human Ago3

Genome Res. August 18, 2010

A comprehensive survey of 39 animal microRNA modification events and a possible role for 39 adenylation in modulating microRNA targeting effectiveness.

Burroughs AM, Ando Y, de Hoon MJ, Tomaru Y, Nishibu T, Ukekawa R, Funakoshi T, Kurokawa T, Suzuki H, Hayashizaki Y, Daub CO.

### **hAgo2(4G8) MAb**

**Nucleic Acids Research** , 2009, 1–13

Expanded RNA-binding activities of mammalian Argonaute 2.

Tan GS, Garchow BG, Liu X, Yeung J, Morris JP 4th, Cuellar TL, McManus MT, Kiriakidou M.

### **hAgo2(4G8) MAb**

**Nature structural & molecular biology** 2009 Dec 16;12:1259

Distinct passenger strand and mRNA cleavage activities of human Argonaute proteins.

Wang B, Li S, Qi HH, Chowdhury D, Shi Y, Novina CD

### **microRNA Isolation Kit, Human Ago2**

**BIOLOGY OF REPRODUCTION** 2009 81, 717–729

Human Villous Trophoblasts Express and Secrete Placenta-Specific MicroRNAs into Maternal Circulation via Exosomes.

Luo SS, Ishibashi O, Ishikawa G, Ishikawa T, Katayama A, Mishima T, Takizawa T, Shigihara T, Goto T, Izumi A, Ohkuchi A, Matsubara S, Takeshita T, Takizawa T.

### **hAgo2(4G8) MAb**

**BMC Research Notes** 2009, 2:169

A useful approach to total analysis of RISC-associated RNA.

Hayashida Y, Nishibu T, Inoue K, Kurokawa T.

### **hAgo2(4G8) MAb**

**RNA** 2009, 15:1078–1089

Mammalian GW182 contains multiple Argonaute-binding sites and functions in microRNA-mediated translational repression.

Takimoto K, Wakiyama M, Yokoyama S.

### **mAgo2(2D4) microRNA Isolation Kit, Human Ago2**

**Reproduction** 2008 Dec;136(6):811-22.

MicroRNA (miRNA) cloning analysis reveals sex differences in microRNA expression profiles between adult mouse testis and ovary.

Mishima T, Luo SS, Ishibashi O, Kawahigashi Y, Mizuguchi Y, Ishikawa T, Mori M, Kanda T, Goto T, Takizawa T.

### **hAgo2(4G8) MAb**

**Methods Mol Biol.** 2008;442:29-43.

In vitro RNA cleavage assay for Argonaute-family proteins.

Miyoshi K, Uejima H, Nagami-Okada T, Siomi H, Siomi MC.

### **hAgo2(4G8) MAb**

**Nature** , 2008 Sep 18;455(7211):421-4.

Prolyl 4-hydroxylation regulates Argonaute 2 stability.

Qi HH, Ongusaha PP, Myllyharju J, Cheng D, Pakkanen O, Shi Y, Lee SW, Peng J, Shi Y.

### **hAgo2(4G8) MAb**

**PNAS** 2008 June 10, vol. 105 no. 23 7964–7969

Characterization of endogenous human Argonautes and their microRNA partners in RNA silencing.

Azuma-Mukai A, Oguri H, Mituyama T, Qian ZR, Asai K, Siomi H, Siomi MC.

### **hAgo2(4G8) MAb**

**J Hepatol.** 2009 Mar;50(3):453-60. Epub 2008 Jul 9.

Regulation of the hepatitis C virus genome replication by miR-199a.

Murakami Y, Aly HH, Tajima A, Inoue I, Shimotohno K.

And others...

上述试剂仅供实验研究用，不可用作“医药品”、“食品”、“临床诊断”等。

Listed products are intended for laboratory research use only, and not to be used for drug, food or human use. / Please visit our online catalog to search for other products from Wako; <http://www.e-reagent.com> / This leaflet may contain products that cannot be exported to your country due to regulations. / Bulk quote requests for some products are welcomed. Please contact us.

## 富士胶片和光(广州)贸易有限公司

广州市越秀区先烈中路69号东山广场30楼  
3002-3003室

北京 Tel: 010 64136388

上海 Tel: 021 62884751

广州 Tel: 020 87326381

香港 Tel: 852 27999019

询价: [wkgz.info@fujifilm.com](mailto:wkgz.info@fujifilm.com)

官网: [labchem.fujifilm-wako.com.cn](http://labchem.fujifilm-wako.com.cn)

官方微信



目录价查询

