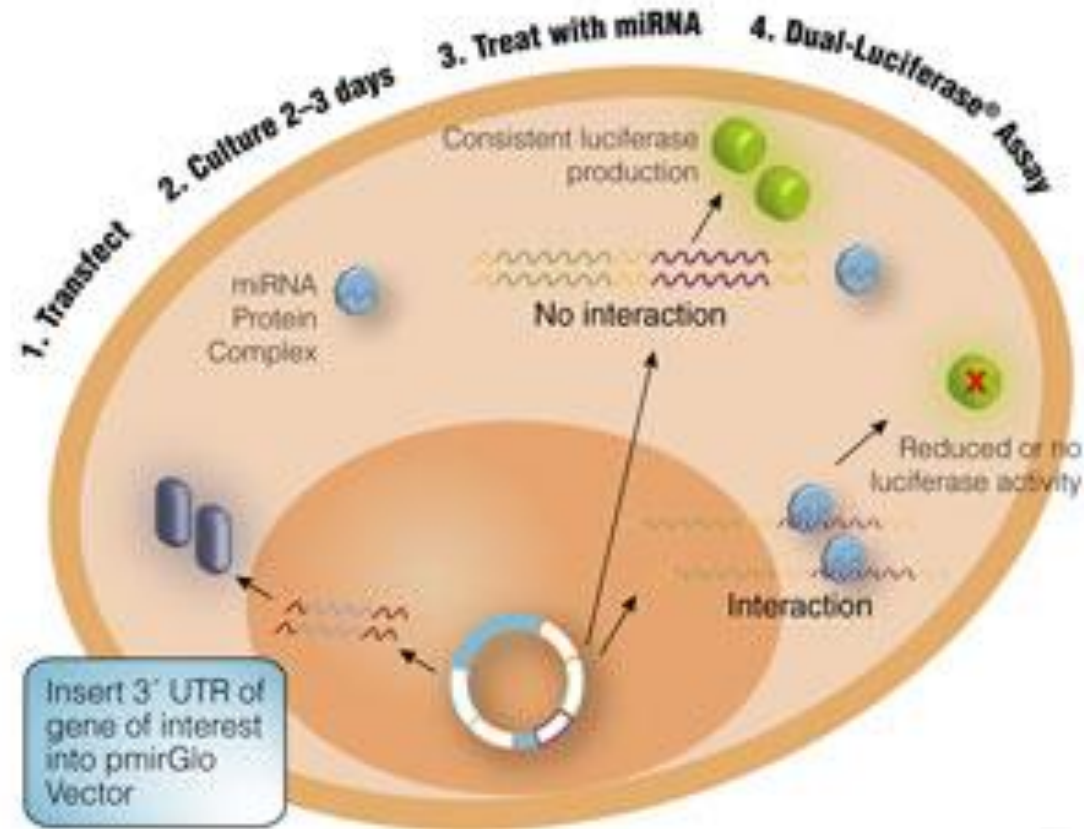
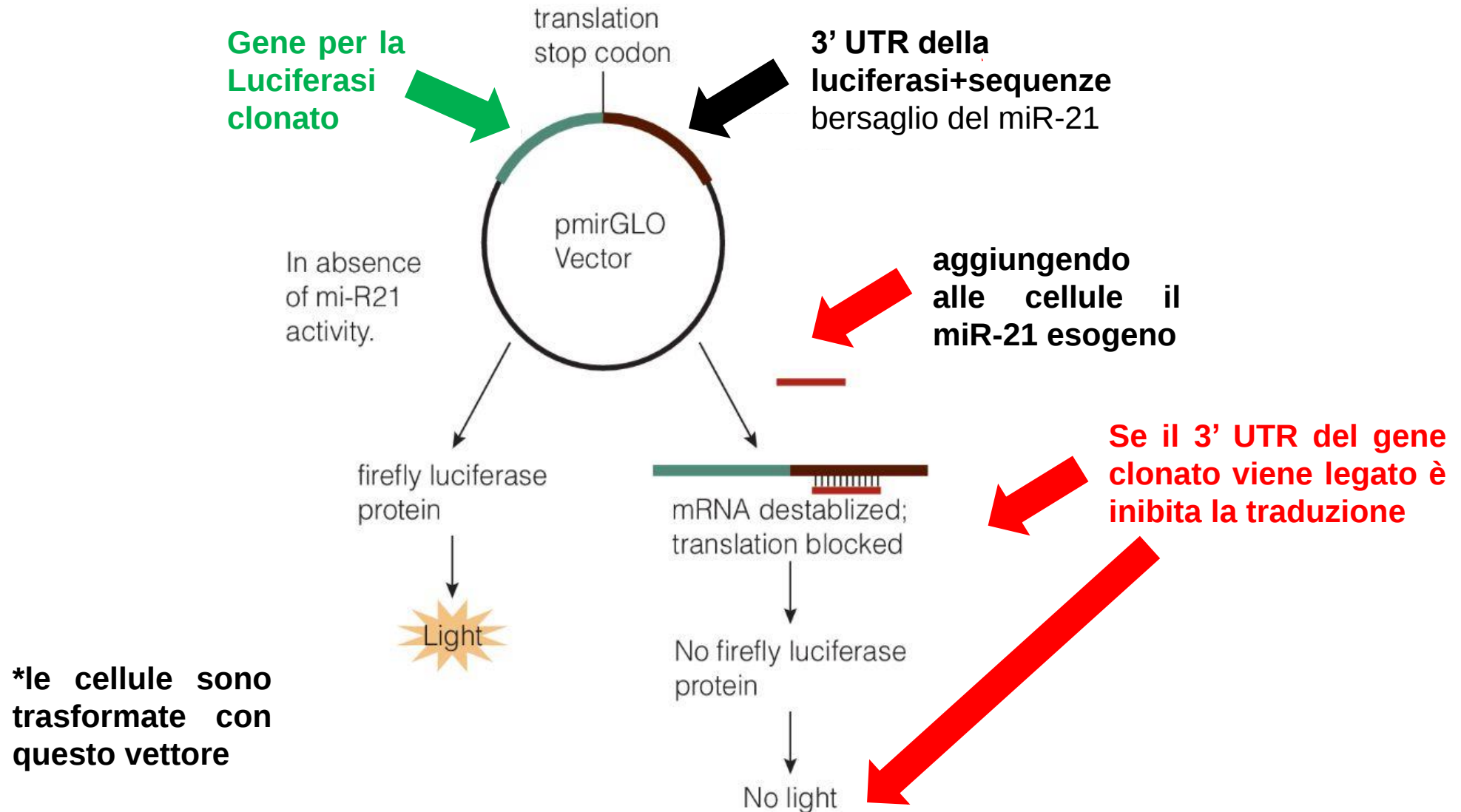


Analisi dei geni bersaglio dei miRNA: impiego di vettori d'espressione e Luciferasi come gene reporter

I microRNA sono corti RNA non codificanti, che interagiscono con sequenze bersaglio, poste nel 3' UTR di molecole di mRNA: miRNA agiscono inibendone la traduzione e/o producendone la degradazione.



pmirGLO Dual-Luciferase: un vettore per lo studio di geni bersaglio di miRNA



Se il miRNA lega il 3' UTR.....

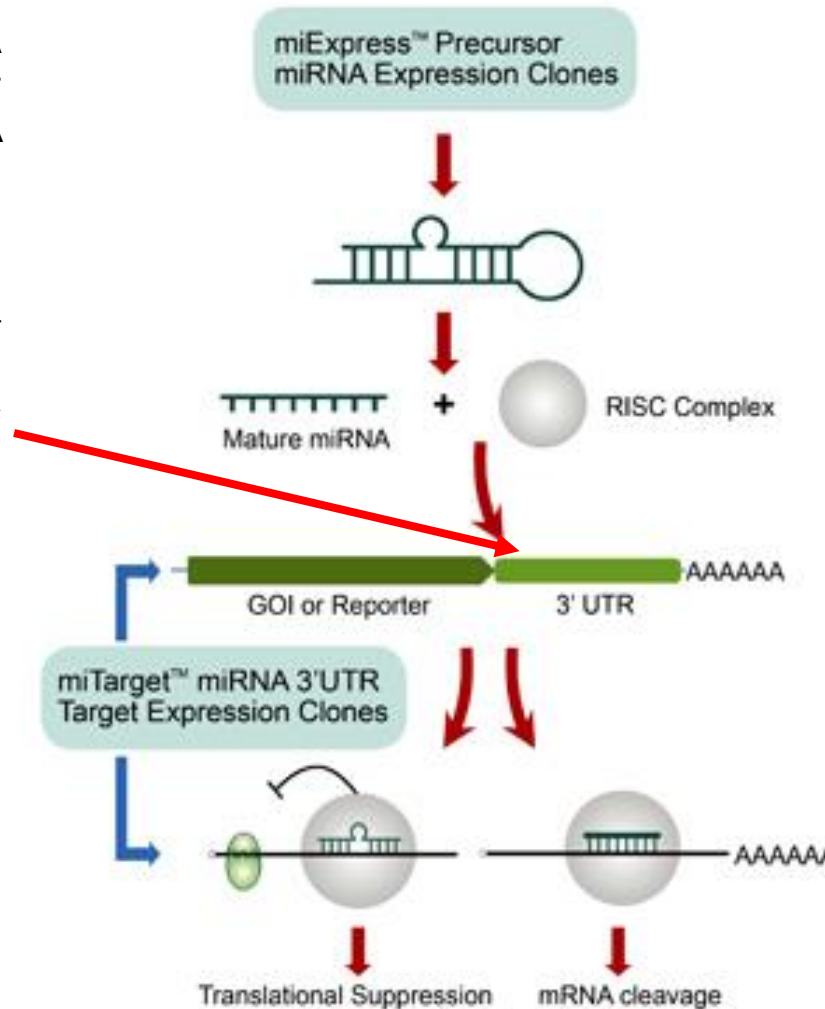
Descrizione: il **pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector** è stato disegnato per valutare quantitativamente l'attività di un miRNA **inserendo le sequenze bersaglio** di quel miRNA **nel 3' UTR del gene per la Luciferasi (*luc2*)**.

Per studiare la modulazione operata dal miRNA sulla stabilità e attività di un trascritto può essere clonato:

- **il sito riconosciuto e legato da un miR** specifico d'interesse,
- **oppure tutta la regione 3' untranslated region (UTR)** del gene probabile bersaglio del miR d'interesse.

Firefly luciferase *luc2* è il gene reporter primario: la riduzione della sua espressione è determinata dal legame 3'UTR del miR:

1. prodotto dalla cellula trasformata con un vettore d'espressione esprimente il miR,
2. oppure aggiungendo il miR esogeno d'interesse con liposomi o lipoplessi.



pmirGLO Dual-Luciferase si basa su una tecnologia a **doppia Luciferasi**:

- **la *luc2***, della lucciola *Photinus pyralis* usata come **reporter primario** per monitorare la regolazione dell'mRNA e
- **hRluc-neo**, la **Renilla Luciferase**, che agisce come **reporter secondario**, utilizzato per la **normalizzazione** dei dati.

	<i>luc2</i>	hRluc-neo
+ miR-21	★★	★★★★
C (- miR-21)	★★★★	★★★★

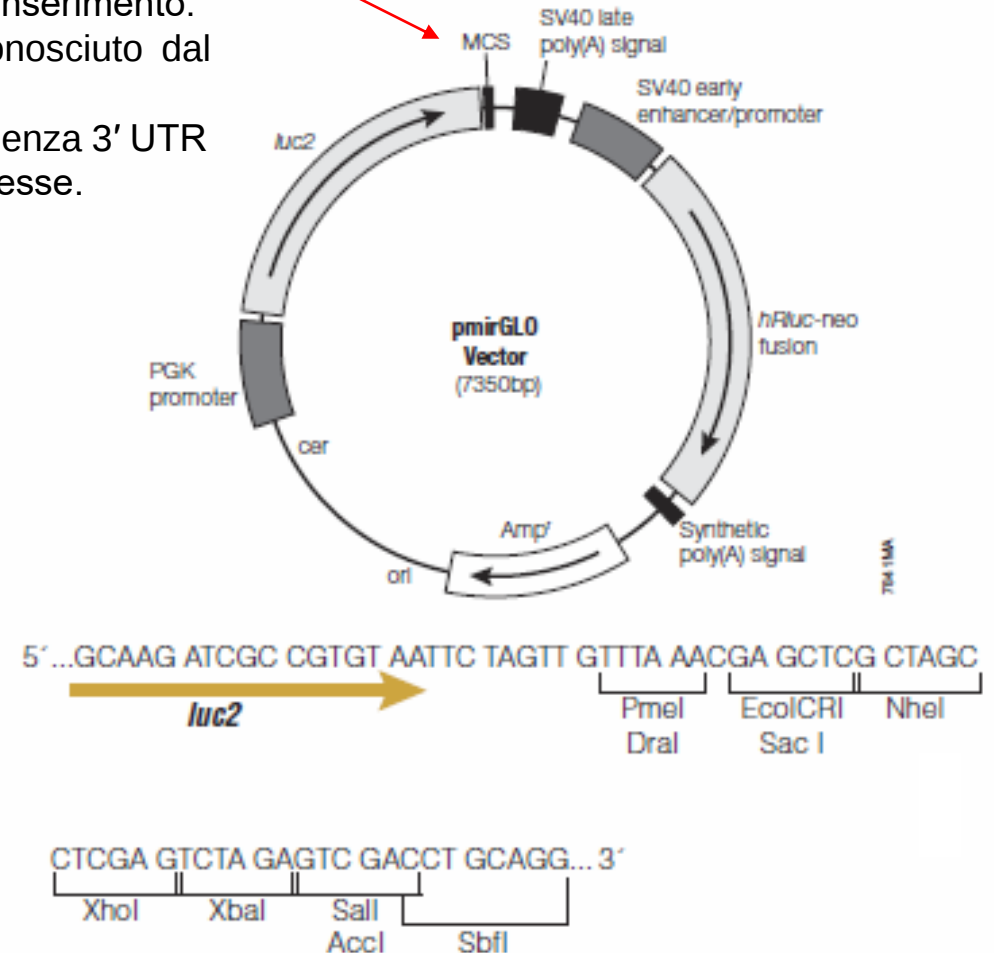
pmirGLO Dual-Luciferase miRNA target expression vector

Descrizione del vettore:

- Il **gene reporter *luc2*** è posto sotto la regolazione trascrizionale del promotore della Fosfoglicerato Kinasi (PGK), un promotore non virale, **debole**, che determina una bassa espressione genica, vantaggiosa per osservare segnali di riduzione dell'espressione genica.
- Il **promotore PGK** è un promotore universal, che funziona in tutti i tipi di cellule (lievito, ratto, topo, uomo).
- **Multiple cloning site (MCS)** è posizionato **nel 3' UTR del gene reporter *luc2***.
- **Humanized Renilla luciferase-neomycin resistance cassette (*hRluc-neo*)**: è usata come reporter di controllo per normalizzare i dati di espressione genica.
- Il **gene *Amp^r*** per l'amplificazione nei batteri e la selezione di quelli contenenti il vettore.
- **SV40 late poly(A) signal sequence** posizionata a valle del gene *luc2* per stabilizzare il trascritto di mRNA mediante poliadenilazione.
- **Synthetic poly(A) signal/transcription stop site**, posizionata a valle del gene *hRluc-neo* per stabilizzare il trascritto di mRNA mediante poliadenilazione.

Multiple Cloning Site: a valle dello stop codon del gene *luc2* per l'inserimento:

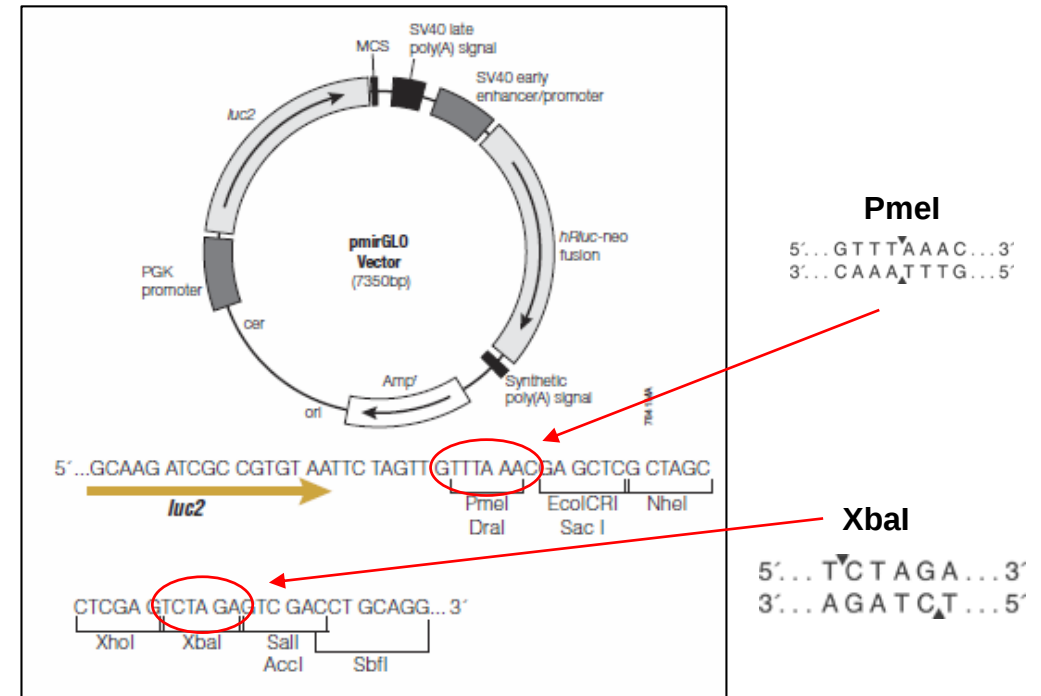
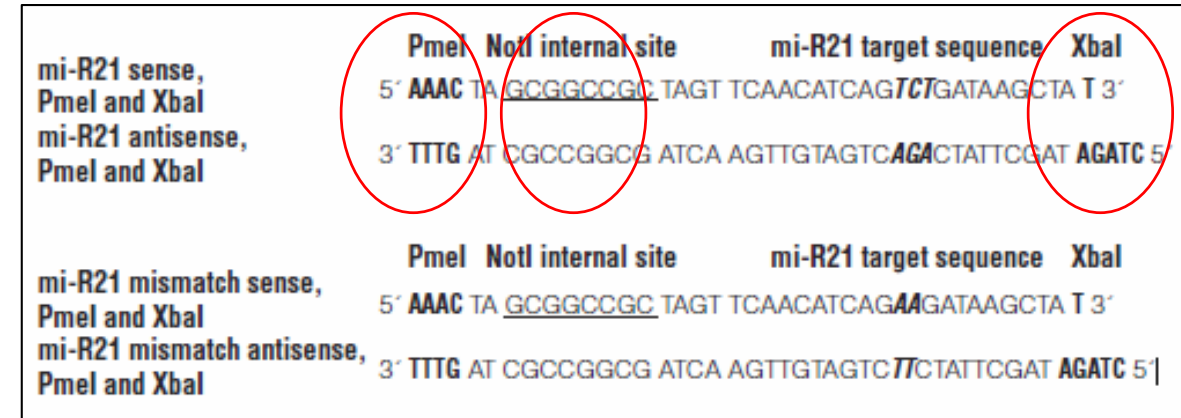
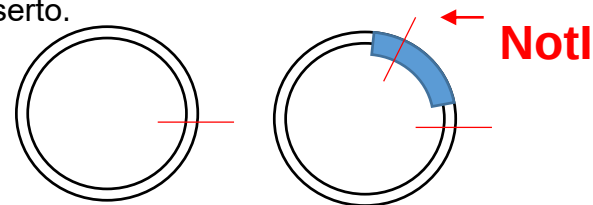
- del sito riconosciuto dal miR
- o della sequenza 3' UTR gene d'interesse.



Clonaggio della sequenza 3' UTR bersaglio del miR

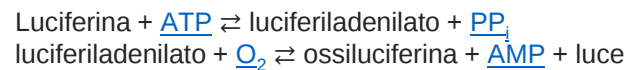
Clonaggio nel vettore

- Disegno degli oligonucleotidi (dsDNA) contenenti**
 - il sito riconosciuto e legato da un miR specifico d'interesse nella regione 3' UTR di un probabile mRNA bersaglio.
 - In 5' e 3' dell'oligonucleotide aggiungere i nucleotidi del sito **PmeI** e **XbaI**, per ricreare i siti di restrizione utili per il clonaggio nel vettore.
 - In 5' dell'oligonucleotide (dopo il sito **PmeI**) aggiungere un sito **NotI** di restrizione interno **per la conferma** della produzione del vettore ricombinante: il pmirGLO contiene in posizione 93 un sito **NotI**, inserendo un nuovo sito **NotI** nell'oligonucleotide clonato, sottoponendo il clone ricombinante a digestione enzimatica con **NotI**, sarà prodotto un frammento di ~140 bp visibile solo nei vettori nei quali è stato legato l'inserto.
- Digestione enzimatica del vettore pmirGLO** con gli enzimi **PmeI** e **XbaI**.
- Annealing degli oligonucleotidi** 1 µg/µl. Combinare 2 µl di ogni oligonucleotide con 46 µl di Oligo Annealing Buffer (40 ng/µl). Riscaldare a 90° C per 3 min, e poi trasferire in un bagno d'acqua a 37°C per 15 min. Usare immediatamente l'oligonucleotide dsDNA così prodotto o conservare a -20°C.
- Reazione di Ligasi e Trasformazione.** Diluire l'oligonucleotide dsDNA 1:10 (4 ng/µl) ed effettuare la reazione con 50 ng/µl di vettore digerito. **Per la trasformazione usare** le cellule batteriche competenti ad alta efficienza JM109.
- Selezionare i cloni su piastre contenenti ampicillina, amplificarli, purificare il DNA plasmidico
- Digerirlo con **NotI**, migrazione in gel d'agaroso, per vedere quali cloni mostrano la **banda di 140 bp**, indicante la presenza dell'inserto.



Reazione chimica catalizzata dalla Luciferasi

Luciferasi è un termine generico per la classe di enzimi (ossigenasi) ossidativi che producono bioluminescenza. Il nome deriva da Lucifero, la cui radice significa 'portatore di luce' (*lucem ferre*). Un esempio è la **Luciferasi di lucciola "Firefly Luciferase" (*Photinus pyralis*)**, anche se sono disponibili in commercio luciferasi ricombinanti da diverse altre specie di lucciole.



Molto studiata è anche la Renilla-luciferina 2-monoossigenasi di *Renilla reniformis*, un celenterato coloniale.

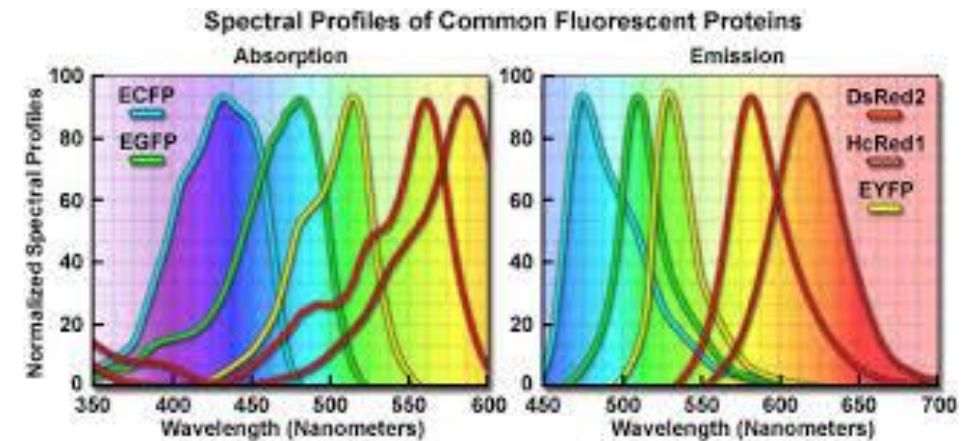
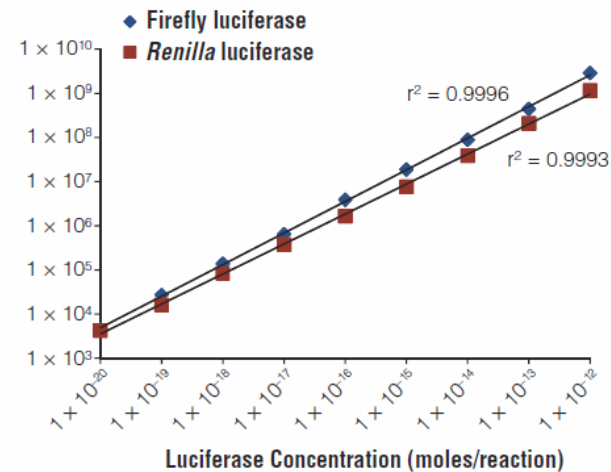
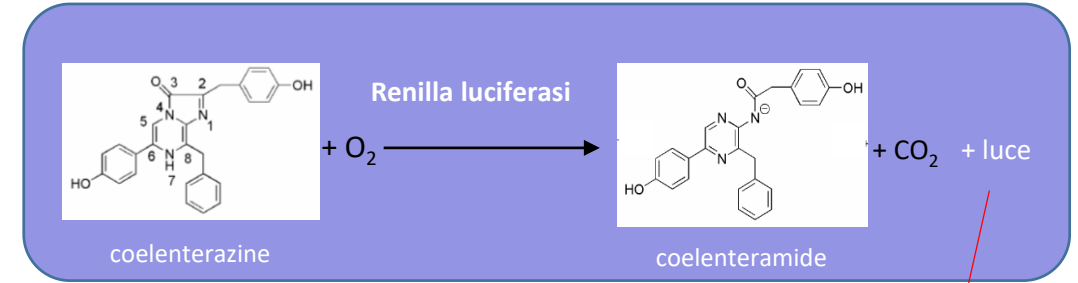
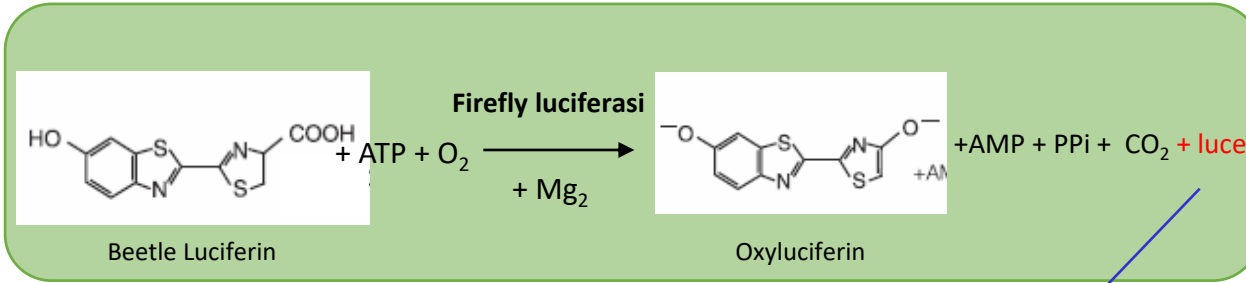
In vivo, lo stato eccitato del complesso luciferina—luciferasi è sottoposto al processo di trasferimento di energia ad una proteina accessoria, la Green Fluorescent Protein, che risulta in una bioluminescenza verde.

In vivo, Il calcio innesca la reazione. Il substrato (**coelenterazine**) è quindi disponibile per l'ossidazione della luciferasi, dove viene degradato a coelenteramide con rilascio di energia. Lo stato eccitato del complesso luciferina—luciferasi è sottoposto al processo di trasferimento di energia alla GFP strettamente associata, l'energia rilasciata dalla Luciferasi viene quindi rilasciato come un fotone di luce verde (**lunghezza d'onda di picco di emissione 510 nm**).

In vitro, complesso luciferina—luciferasi emette una luce blu in assenza di GFP, (**lunghezza d'onda di picco di emissione 482 nm**).



Reazione chimica catalizzata dalla Luciferasi

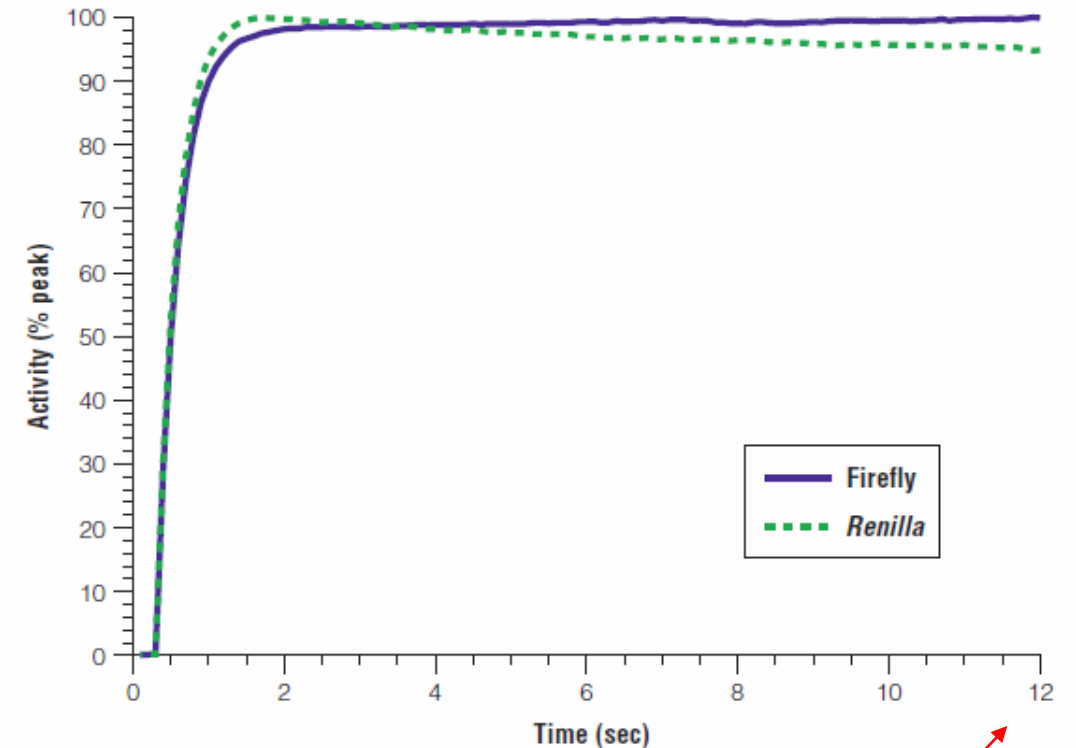
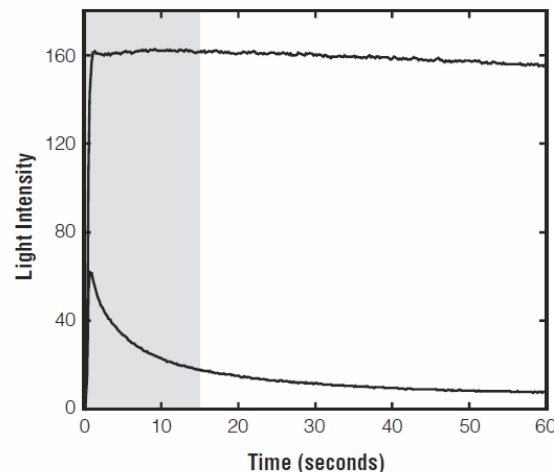


detection sensitivity of ≤ 0.1 femtogram (10^{-21} mole) of firefly and Renilla luciferases

Dual-Luciferase® Reporter Assay System

La cinetica della reazione della **Luciferasi di Renilla** forniscono un **segnale luminescente stabilizzato**, che decade lentamente nel corso della misurazione.

- Fornisce **anche estrema sensibilità e un range** di misurazione lineare di sei ordini di grandezza.
- La portata effettiva delle reazioni luminescenti può variare a seconda del tipo di luminometro (ad esempio, 96 pozzetti vs. singolo campione) utilizzato.
- Un inconveniente è dato dalla **proprietà intrinseca della coelenterazina, che emette un basso livello di autoluminescenza** in soluzioni acquose **ed è intensificata** da alcuni tipi di detergenti non ionici comunemente usati per preparare lisati cellulari (**Triton X-100**).
- Tuttavia i nuovi sistemi di dosaggio **riducono l'autoluminescenza** ad un livello non misurabile.



Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System

Protocol for Preparing Cell Lysates

1. Add 4 volumes of water to 1 volume of 5x lysis buffer. Equilibrate 1x lysis buffer to room temperature before use.
2. Carefully remove the growth medium from cells to be assayed. Rinse cells with PBS, being careful to not dislodge attached cells. Remove as much of the PBS rinse as possible.
3. Add enough 1x lysis buffer to cover the cells (400 µl/60 mm culture dish, 900 µl/100 mm culture dish or 20 µl per well of a 96-well plate).
4. Rock culture dishes several times to ensure complete coverage of the cells with lysis buffer. Scrape attached cells from the dish. Transfer cells and all liquid to a microcentrifuge tube. Place the tube on ice.
5. Vortex the microcentrifuge tube 10–15 seconds, then centrifuge at 12,000 g for 15 seconds (at room temperature) or up to 2 minutes (at 4°C). Transfer the supernatant to a new tube.
6. Store the supernatant/cell lysate at –70°C.

Protocol for Plant and Bacterial Cell Lysates and Tissue Homogenates

1. For plant tissue, quick-freeze in liquid nitrogen, grind the frozen tissue to a powder and resuspend at room temperature in 1x lysis buffer (CCLR buffer) with further homogenization. Remove the debris after cell lysis by a brief centrifugation. Assay the supernatant using standard assay conditions.
2. For bacteria, mix 40 µl of nontransformed cells (carrier cells) with 50 µl of a transformed culture. Add 10 µl of 1M K₂HPO₄ (pH 7.8), 20 mM EDTA. Quick-freeze the mixture on dry ice, then bring the cells to room temperature by placing the tube in a room temperature water bath. Add 300 µl of freshly prepared lysis mix. Mix and incubate the cells for 10 minutes at room temperature.

Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System

Standard Protocol:

Program the luminometer to perform a 2 seconds premeasurement delay, followed by a 10 seconds measurement period for each reporter assay.

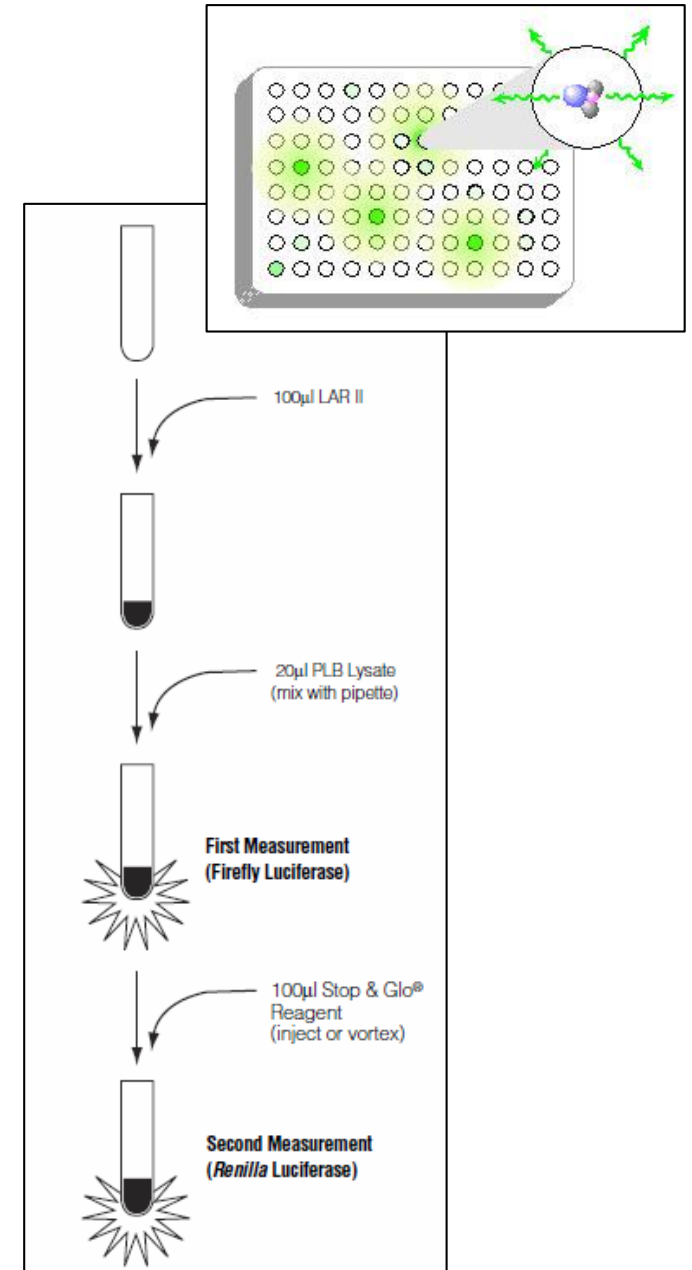
Put 100 µl of LAR II into the appropriate number of luminometer tubes to assay.

Carefully transfer up to 20 µl of cell lysate into the luminometer tube containing LAR II; mix by pipetting 2 or 3 times. **Do not vortex.** Place the tube in the luminometer and initiate reading.

Note: Vortexing may coat the sides of the tube with a microfilm of luminescent solution, which can escape mixing with the subsequently added volume of Stop & Glo[®] Reagent.

Use a reagent injector to dispense 100 µl of Stop & Glo[®] Reagent. If using a manual luminometer, remove the sample tube from the luminometer, add 100 µl of Stop & Glo[®] Reagent and vortex briefly to mix. Replace the sample in the luminometer, and initiate reading.

		Elapsed Time
Step 1:	Manually add prepared lysate to Luciferase Assay Reagent II predisposed into luminometer tubes; mix.	~3 seconds
Step 2:	Quantify firefly luciferase activity.	12 seconds
Step 3:	Add Stop & Glo [®] Reagent; mix.	3 seconds
Step 4:	Quantitate <i>Renilla</i> luciferase activity.	12 seconds
Total elapsed time for the DLR[™] Assay		30 seconds



pmirGLO Dual-Luciferase miRNA target expression vector

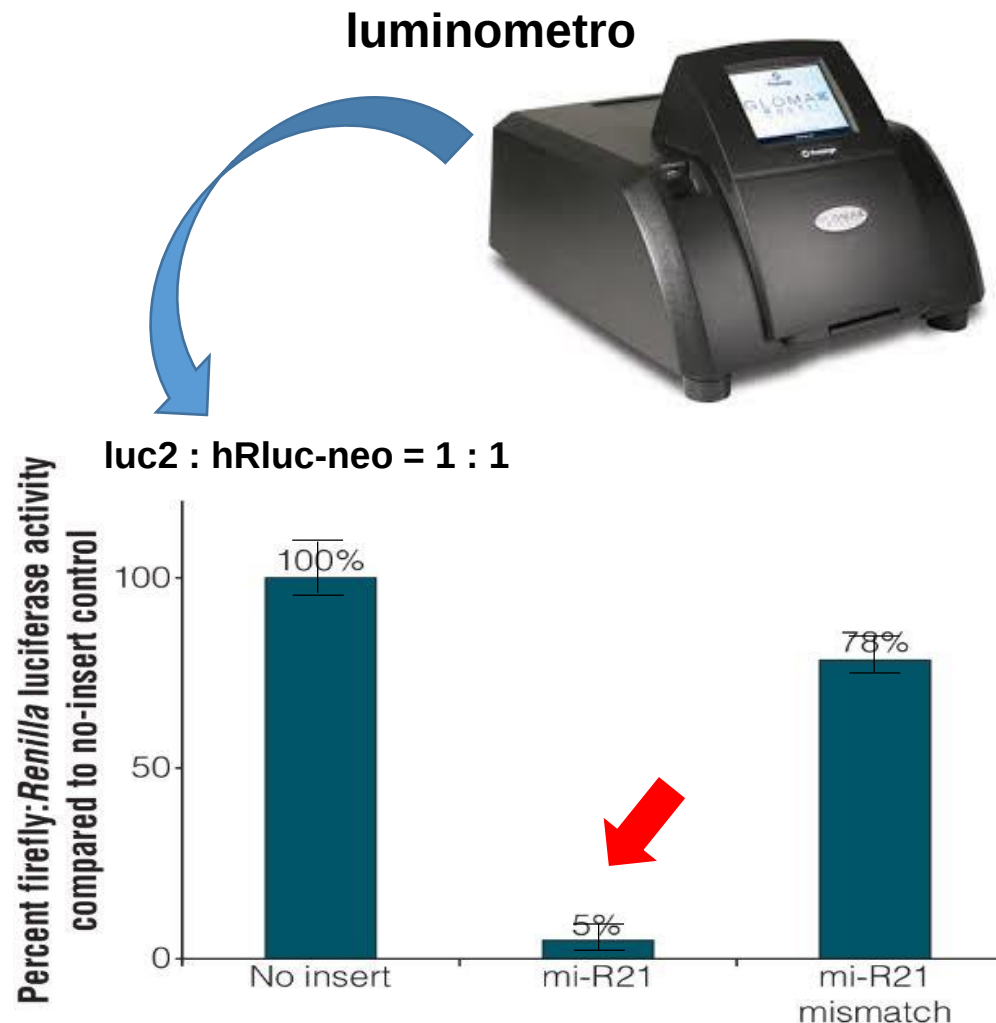
La presenza di mi-R21 è stata monitorata nella linea cellulare HeLa.

Ventiquattro ore dopo la trasformazione con il vettore pmirGLO contenente il mi-R21, nei lisati cellulari è stata analizzata l'attività della Luciferasi utilizzando il Dual-Glo® Luciferase Assay System un MicroLumatPlus LB96V luminometro (Berthold) e normalizzando il segnale per l'attività della Renilla luciferasi.

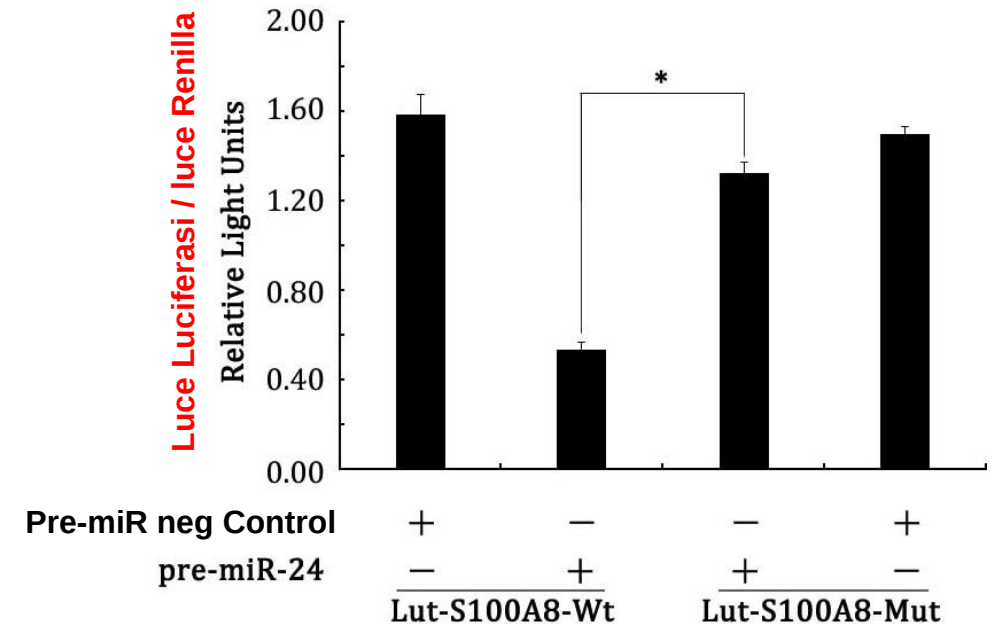
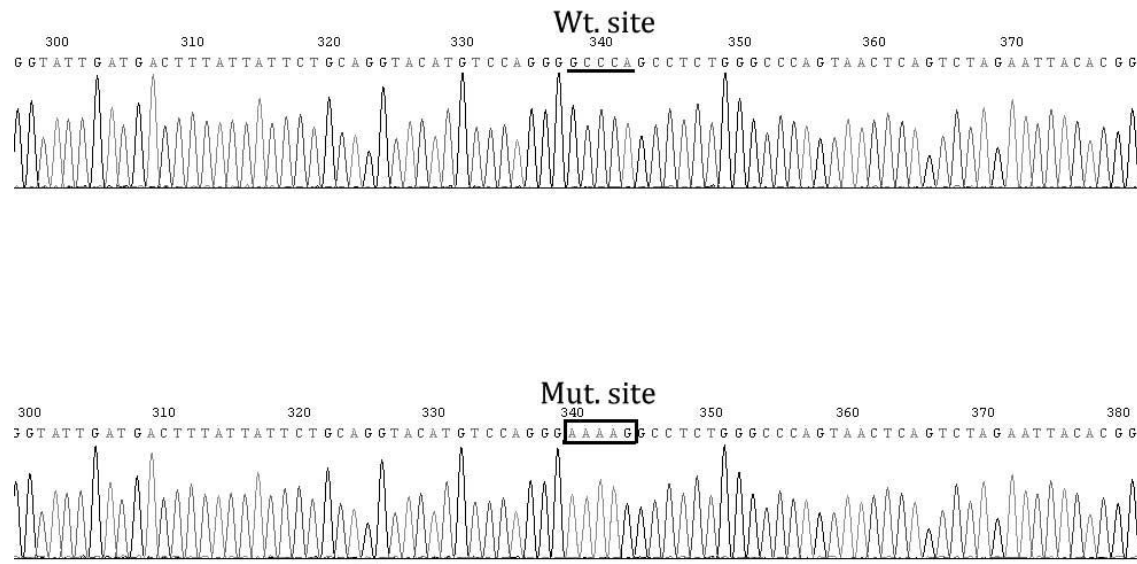
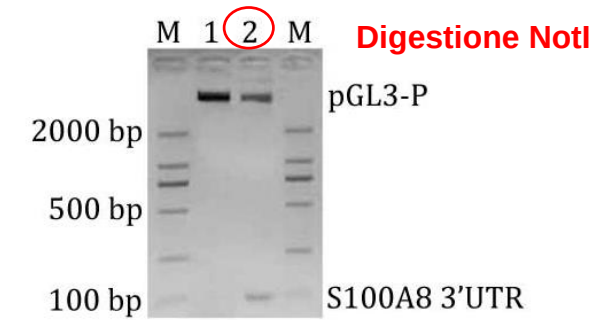
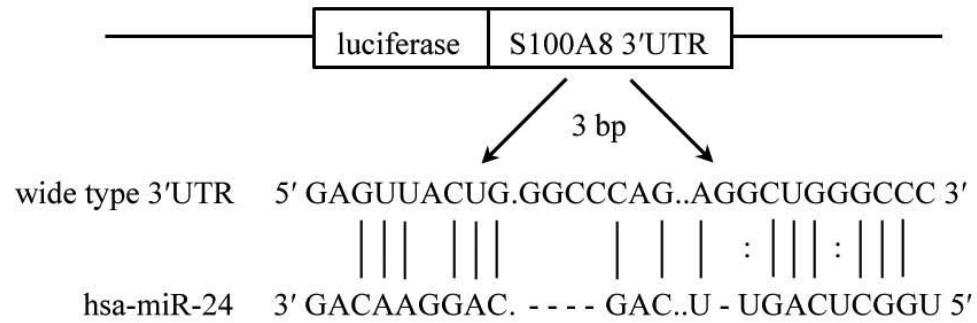
Un secondo costrutto è stato costruito con un sito per il mi-R21 mutato.

Ogni costrutto è stato confrontato con quello del vettore di controllo pmirGLO senza inserto.

Per ogni trasformazione, l'attività della Luciferasi è stata valutata su 6 repliche di ciascun campione.



Study of miRNA effects using Luciferase expression vector

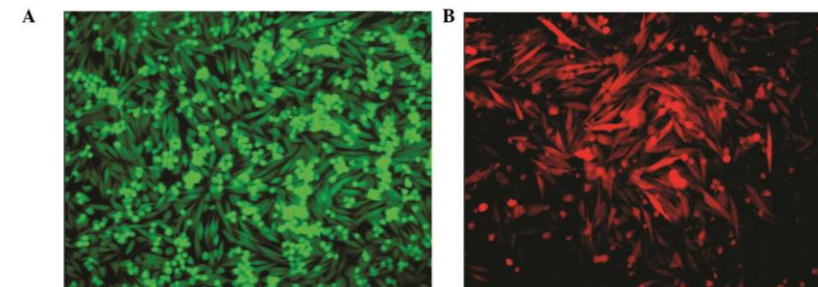
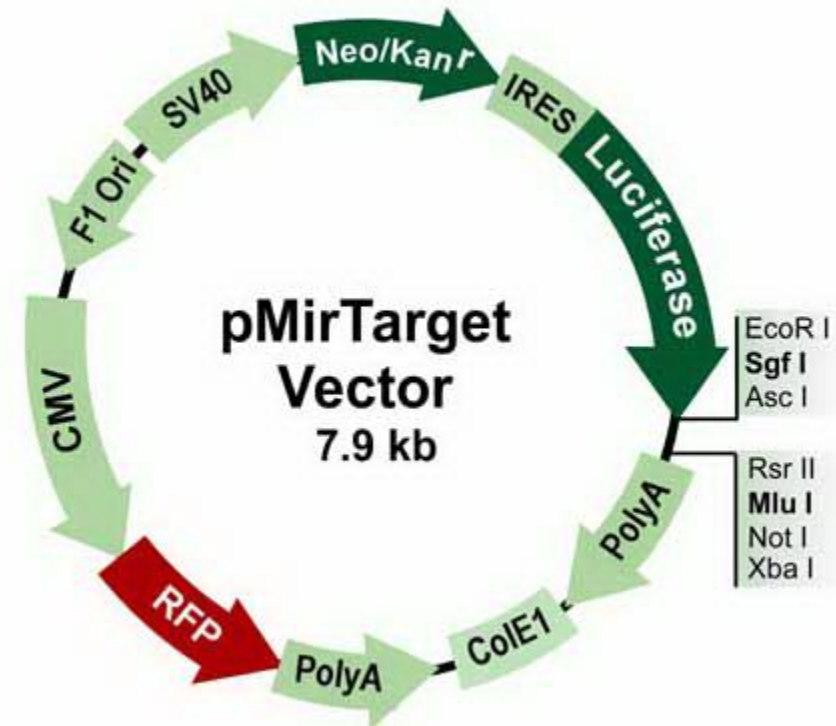


Study of miRNA effects using expression vector

pMirTarget is a reporter construct with:

- firefly luciferase as a reporter.
- The **multiple cloning sites** are downstream of luciferase stop codon and allow insertion of any sequence of interest, creating a chimerical transcript.
- **All of OriGene's 3' UTR** clones are constructed in this vector.
- High sensitivity of Luciferase assay due to **IRES**-driven luciferase cassette (IRES regions are known to attract eukaryotic ribosomal translation initiation)
- **RFP as a second reporter** for transfection, (Red Fluorescent Protein) it is a versatile biological marker for monitoring physiological processes, visualizing protein localization, and detecting transgenic expression *in vivo*. RFP can be excited by the 488 nm or 532 nm laser line and is optimally detected at 588 nm). To complement these tools, we also offer **anti-RFP antibodies and antibody conjugates for a wide variety of applications**, including imaging, western blotting, and flow cytometry. All of our anti-RFP antibodies are suited for detection of native RFP, RFP variants
- **Neomycin** selection marker for stable cell establishment

In the presence of appropriate miRNA (external or internal), shRNA or siRNA, the RNAi machinery would interact with the 3'UTR sequence and causes reduction of the luciferase activity. Can serve as a control for target validation experiments and 3' UTR Clones for MicroRNA target validation.



Study of miRNA effects using expression vector

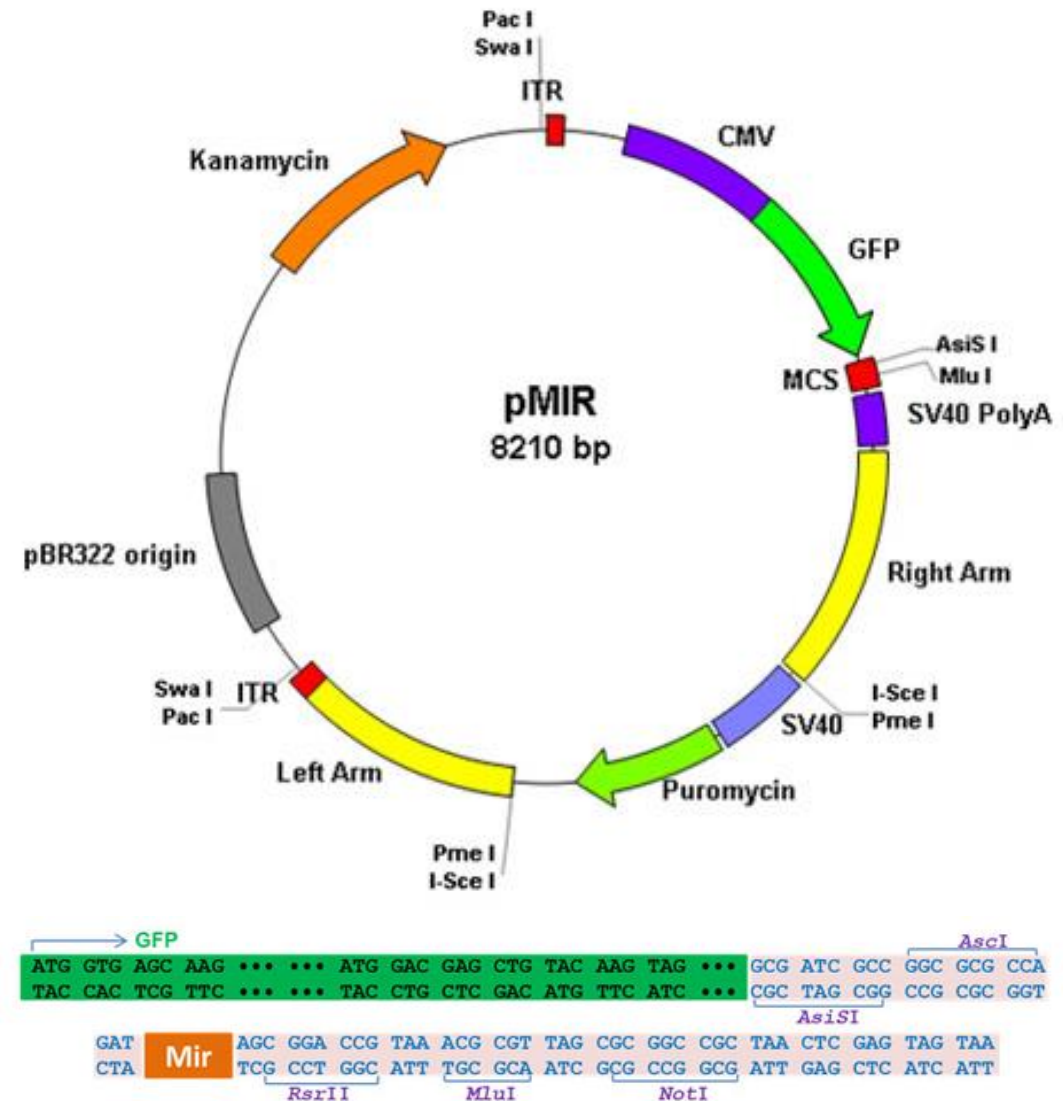
ViGene offers the most complete over-expression human miRNA precursor clone collection cloned in our **pMIR Vector**. Our miRNA Expression Clones can be transfected into **mammalian cells directly** for functional studies or can be used for viral mediated gene delivery, such as adenoviral transfection, into a broad range of dividing or non-dividing cells, including primary and stem cells.

Key Advantages

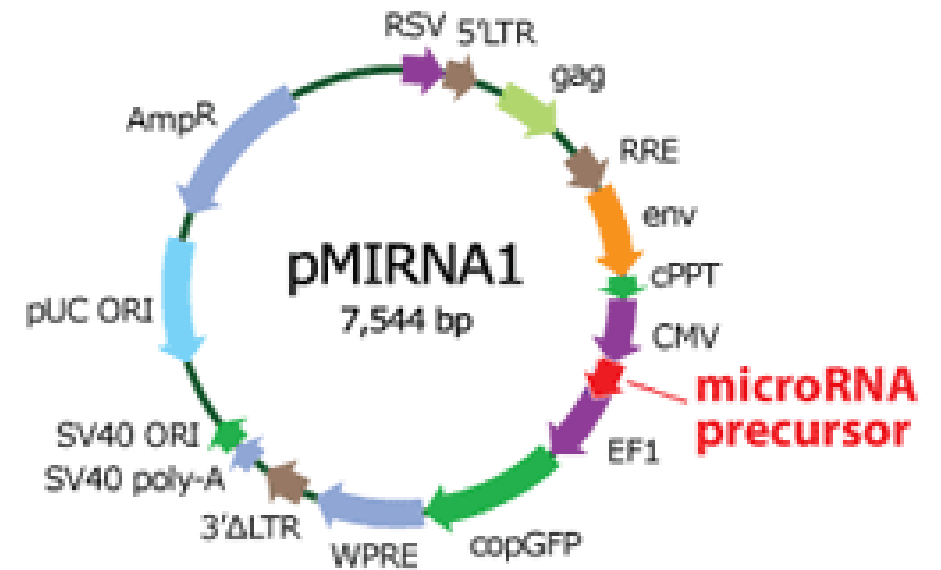
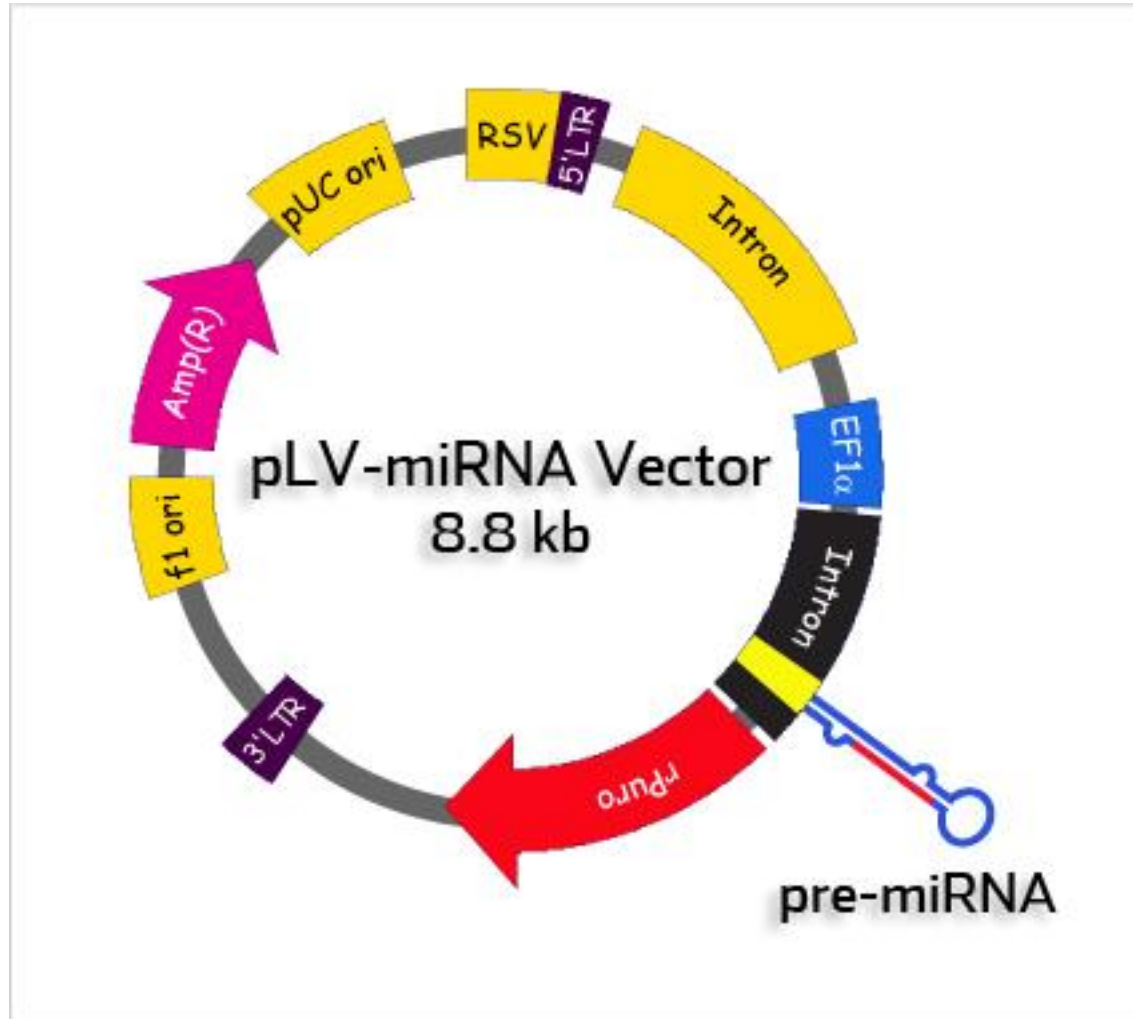
- Genome wide miRNA coverage (miRBase V18.0: 1,272 Ready-to-Use Human miRNA Expression Plasmids)
- Sequenced verified by NextGen Sequencing & optimized for mature miRNA Expression
- **pMIR vector is designed for subsequent adenoviral mediated gene delivery**
- Premade miRNA Adenovirus also available-ideal for hard-to-transfect cells

Technical Features

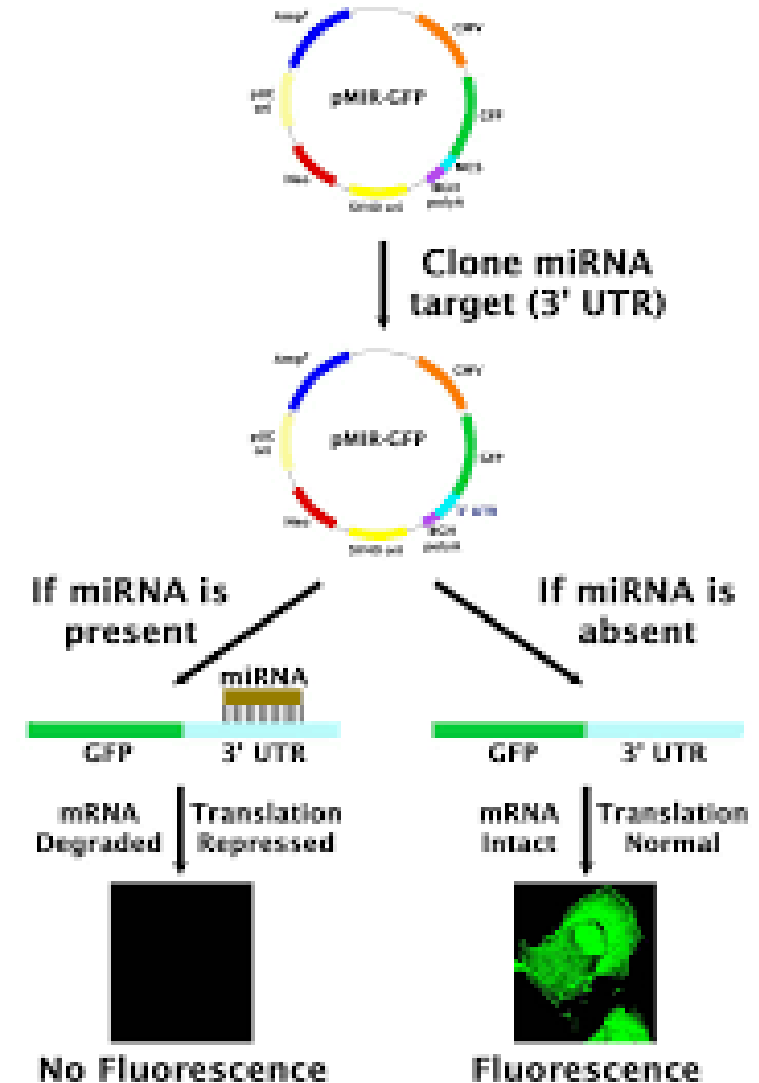
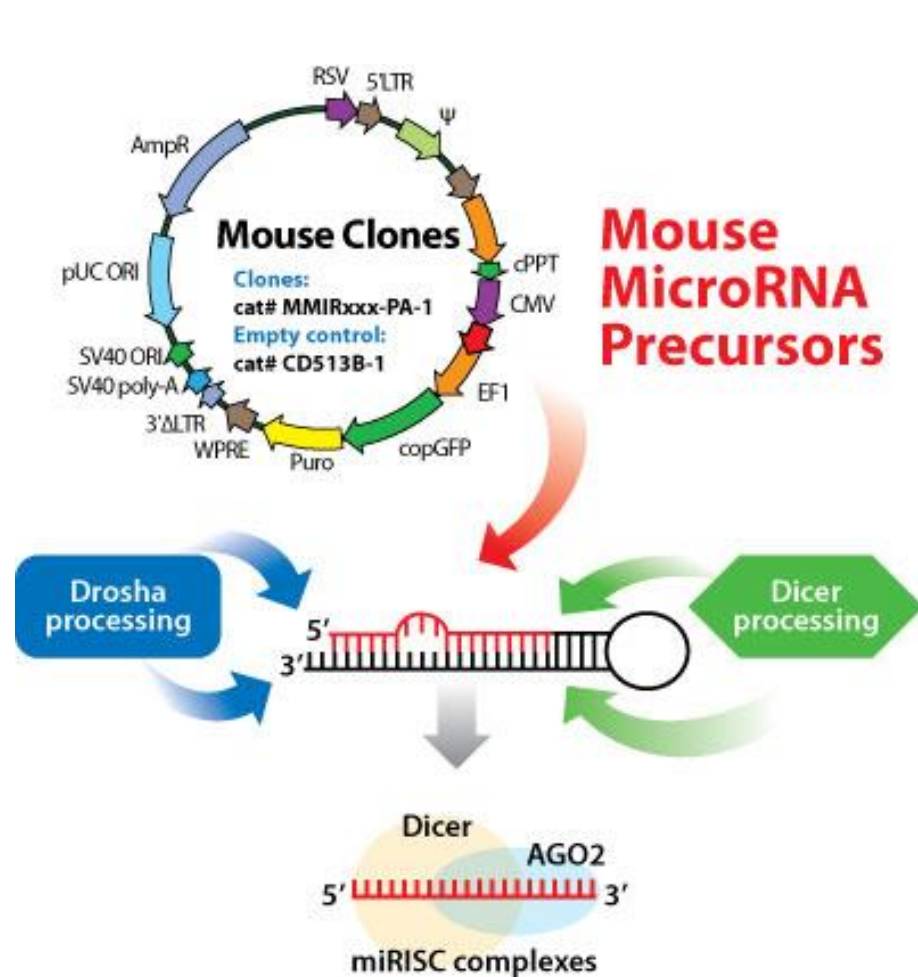
- **GFP** allows simultaneous monitoring
- **Kanamycin** as selectable marker
- **CMV** driven expression, downstream of GFP
- Includes 150-200 bps of flanking sequence and the miRNA hairpin sequence



Study of miRNA effects using expression vector

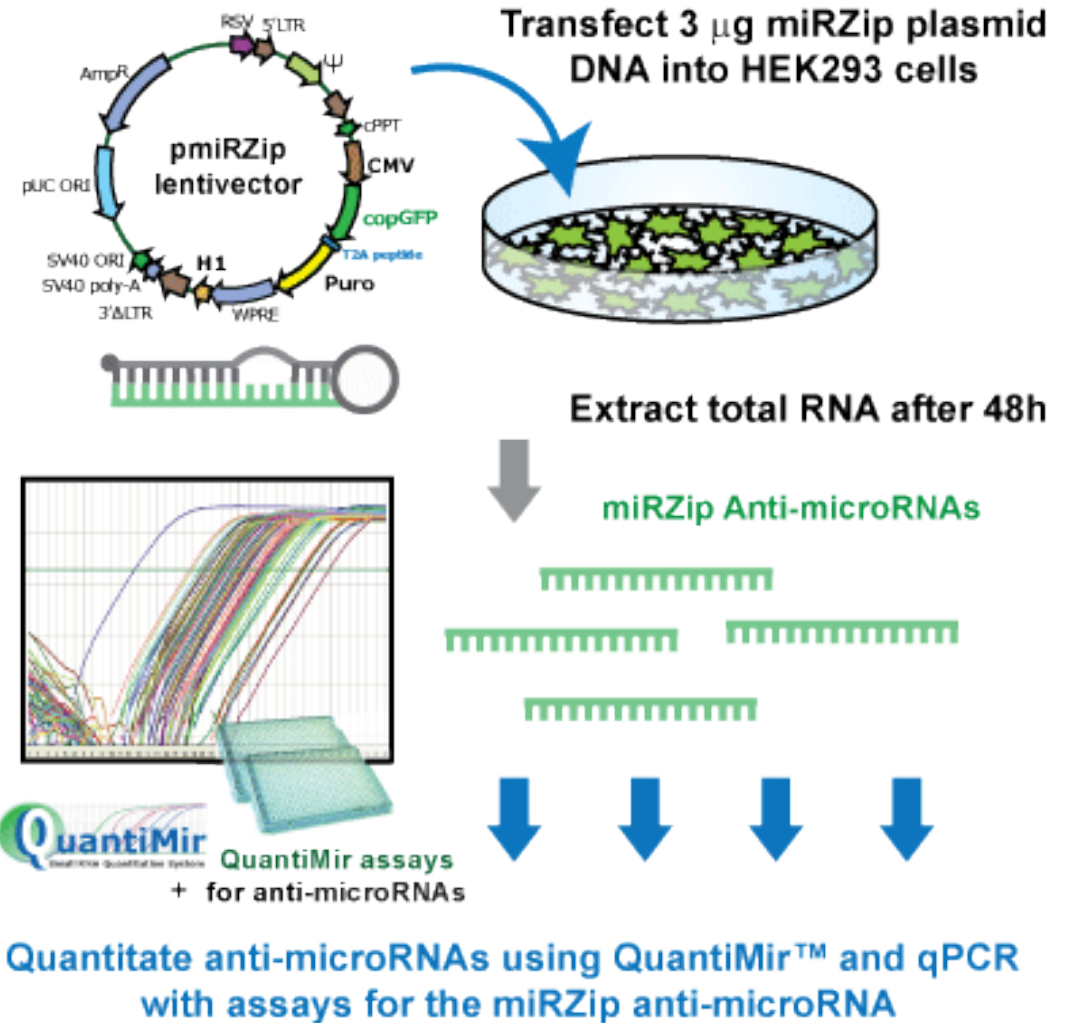
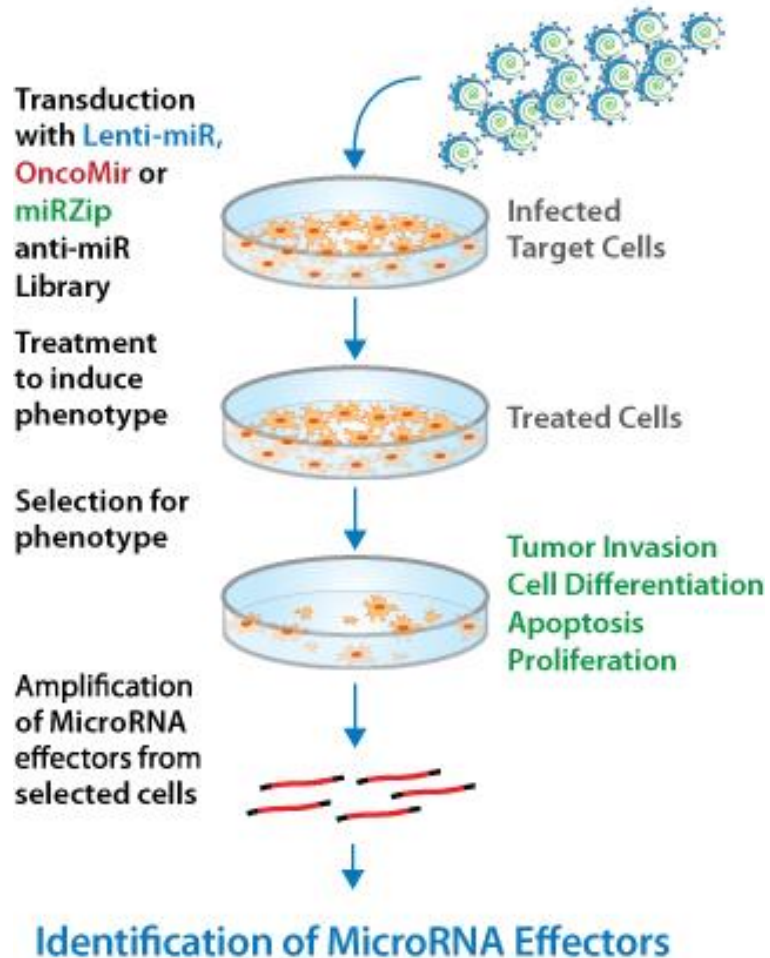


Study of miRNA effects using expression vector

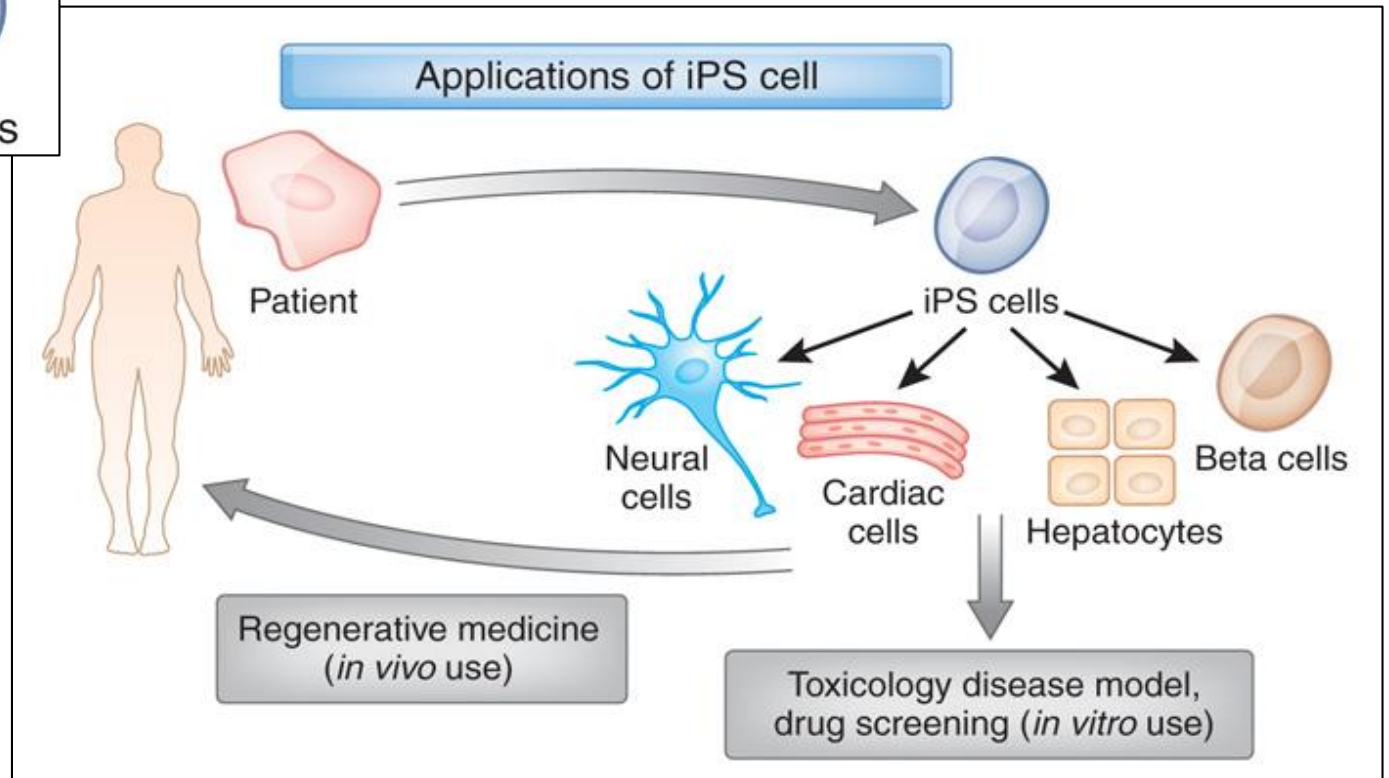
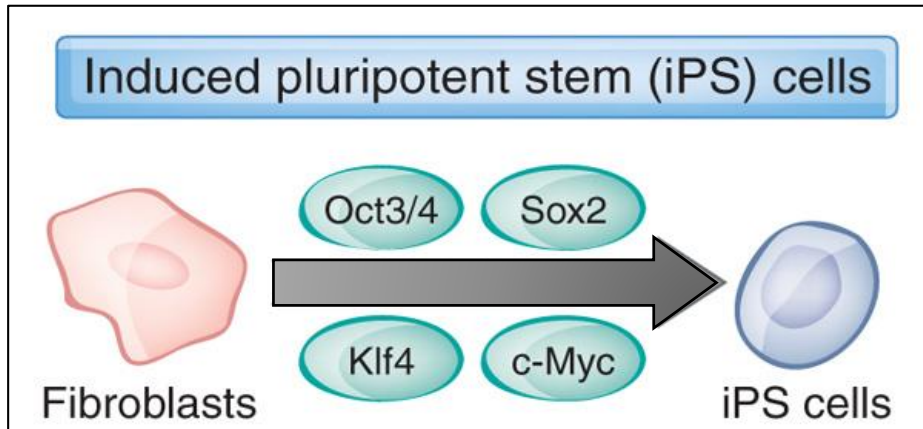


Transduction with miRNA for library production

Pooled Lentiviral MicroRNA Screens



Overexpress the stem-cell specific microRNA-302bcad/367 cluster with high efficiency to produce iPS cells

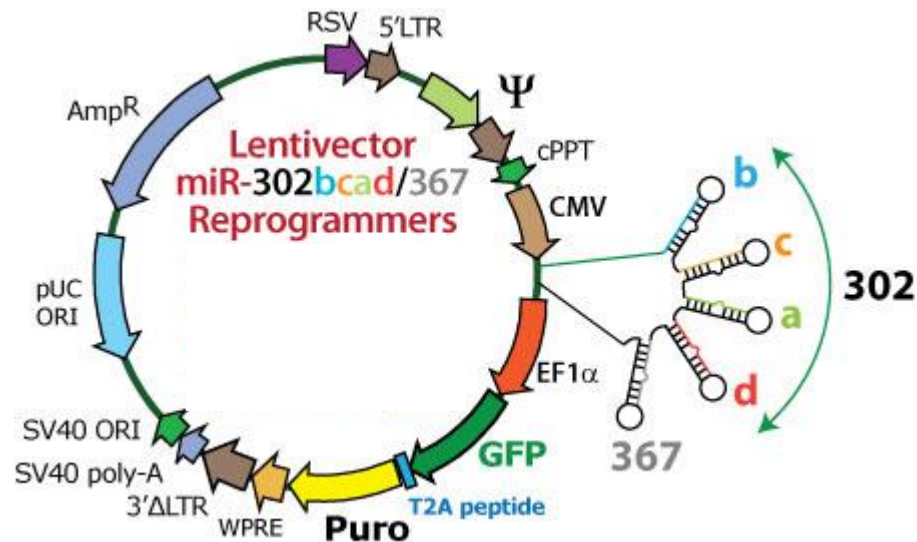


Overexpress the Stem-cell specific microRNA-302bcd/367 cluster with high efficiency to produce iPS cells

Induce either human or mouse somatic cells into the pluripotent state using a single microRNA cluster expression vector.

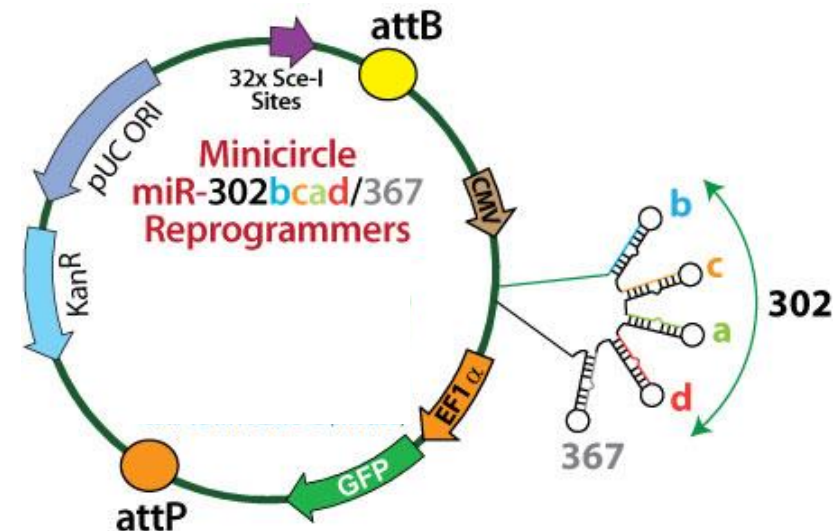
The Human or Mouse microRNA302bcd/367 expression cassettes are available in Lentivector and PiggyBac formats as well as non-integrating Minicircle DNA vector formats.

The microRNA-based reprogramming method has been published to be **more efficient** than the standard technique based on **Oct4/Sox2/Klf4/Myc reprogramming transcription factors**. The microRNA-derived iPSCs display similar morphologies, pluripotent marker expression.



miR-302bcd/367 Lentivectors

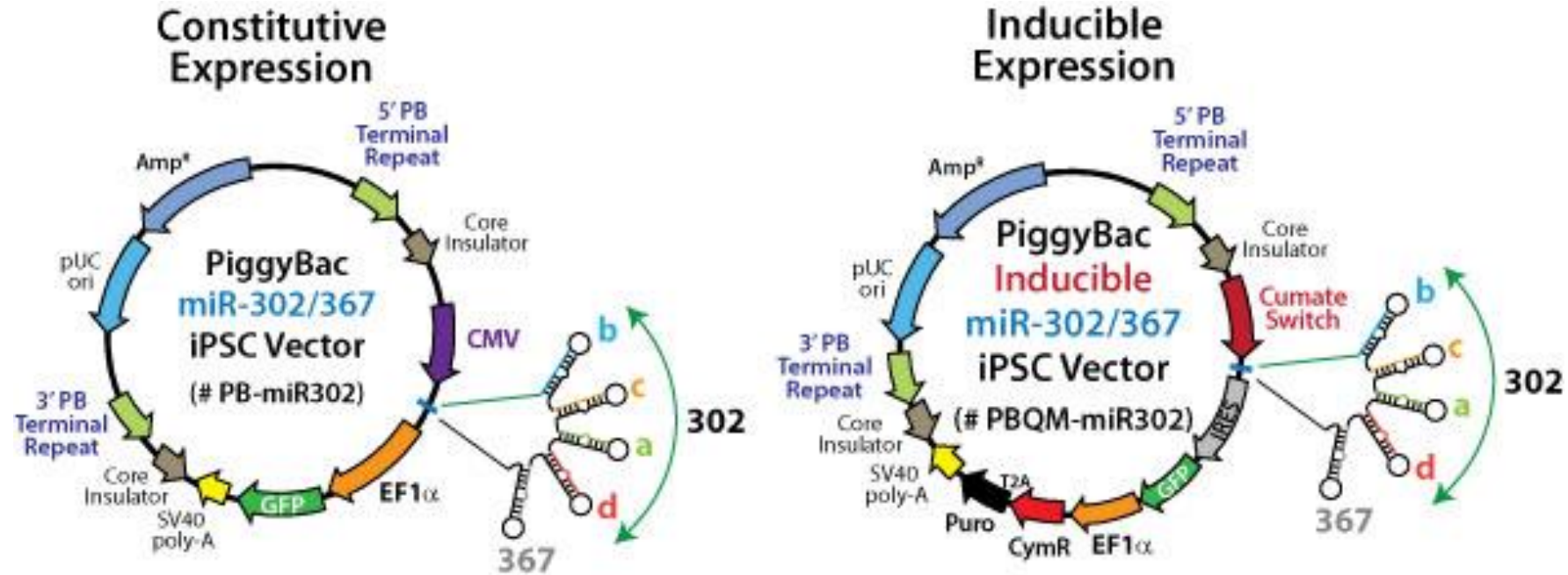
The miR iPSC lentivectors are available with GFP+Puro markers or with GFP alone.



miR-302bcd/367 Minicircle vectors

Minicircle DNA provides sustained expression without genomic integration, for Non-Viral iPSC generation.

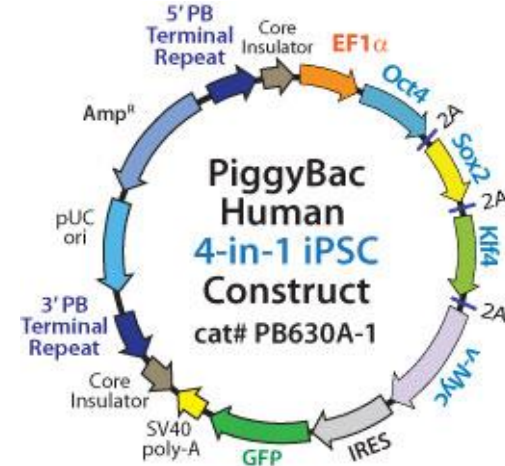
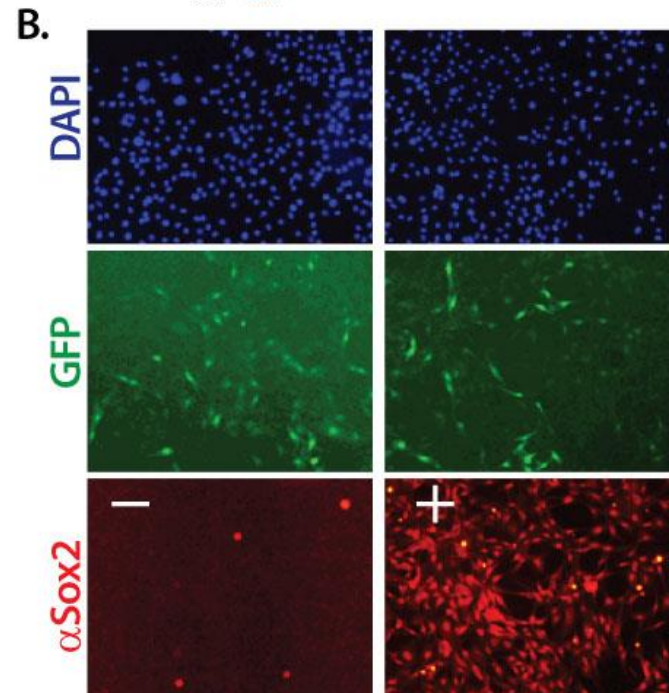
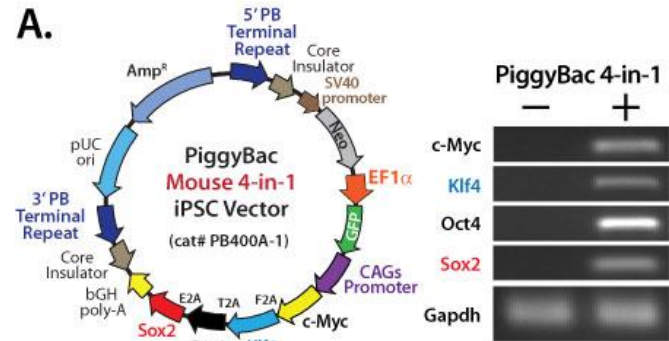
Constitutive overexpress the Stem-cell specific microRNA-302bcad/367 cluster with high efficiency



miR-302bcad/367 PiggyBac Transposon vectors

PiggyBac transposon vectors enable integration through transfection. Choose from constitutive miR-302/367 expression (cat# PB-miR302) or inducible miR-302/367 expression via the **Cumate** (4-isopropylbenzoic acid) switch. After iPSC generation, the PiggyBac transposon can be removed, footprint-free from the genome by re-expressing the PiggyBac transposase.

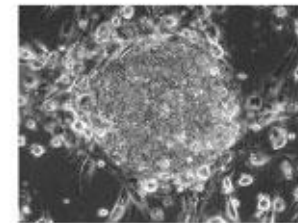
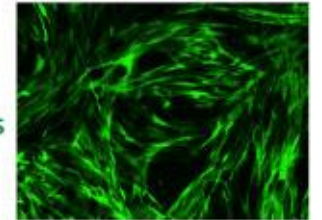
Study of miRNA effects using expression vector



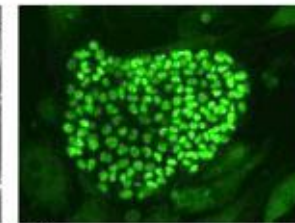
Co-transfect :

- Electroporate 1×10^5 cells
- 2.5 ug PB630A-1 OSKM vector
- 500 ng PB210A-1 Transposase
- Cells will be GFP+ initially
- iPSCs form in 12 days

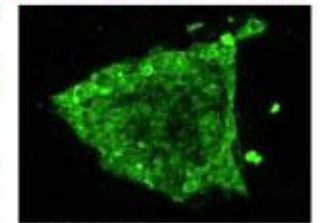
Human Neonatal Fibroblasts



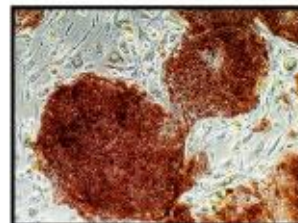
Phase



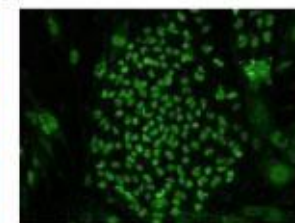
Nanog



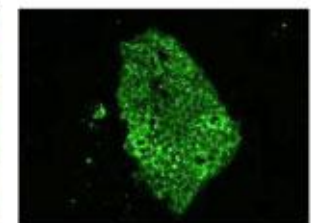
TRA-1-60



AlkPhos



Oct4



SSEA3