

ASO 操作使用说明书

一、产品简介

ASO (antisense oligonucleotides, 反义寡核苷酸) 是长度为 15~25 个核苷酸的化学修饰短链核酸, 通常约 20 nt, 为单链 RNA&DNA 杂合体。ASO 通过碱基互补配对与靶基因 mRNA、lncRNA、circRNA、miRNA 等结合, 依赖 RNase H 发挥功能, 能够特异性敲降细胞质和细胞核内的 RNA。

ASO 入核相对容易, 细胞核中 RNase H 水平较高, 更适合核内定位 RNA 的干扰; 对于核外基因, siRNA 有时效果更好。ASO 接触细胞后数小时即可通过胞吞作用进入细胞, 并较快实现 RNA 干扰。

产品形式: 冻干粉。

纯化方式: HPLC 纯化。

质量控制: MASS 检测确认准确分子量及特殊化学修饰; HPLC 测定 ASO 纯度>90%。

储存条件: 收到后于-20℃~-80℃保存; 部分 GMR-ASO 产品可在≤-15℃条件下保存 6 个月。冻干粉一般可稳定保存一年。

更新提示: 现代 ASO 不限于 RNase H 依赖的 RNA&DNA 杂合体, 还包括剪接转换型 SSO、空间位阻型 mixmer、PMO/PPMO、tcDNA、GalNAc 偶联 ASO、抗体-寡核苷酸偶联物 (AOC) 等。实验设计时应根据靶 RNA 定位、作用机制和递送方式选择合适类型。

二、产品类型与可选修饰

产品类型	序列长度	默认修饰方式	可加其他特殊修饰
常规 ASO	20 bp	全链 PS, 中间 DNA, 两端 RNA 做 2'-OMe 修饰	Amine、Phosphate、PS、3'GalNAc、Chol、2'F、2'MOE、2'OMe、biotin、cEt、荧光修饰 (FAM、CY3、CY5) 等
ASO PLUS	20 bp	全链 PS, 中间 DNA, 两端 RNA 做 2'-OMe、LNA 修饰	可参考常规 ASO 修饰
L-ASO	20 bp	全链 PS, 中间 DNA, 两端 RNA 做 LNA 修饰	biotin、cEt、3'GalNAc、荧光修饰等
ASO&RNAi (ASRi)	20+21 bp	常规 ASO+常规 siRNA	可定制
ASO PMO	20 bp	吗啉环替代 RNA 的脱氧核糖糖环	可定制
定制 ASO	15~30 bp	按实验要求设计	可定制

常见修饰包括: PS 修饰提高稳定性; 2'-MOE、2'F、cEt 增加核酸酶抗性和结合亲和力; LNA 提高结合亲和力与靶向性; GalNAc 可实现特异性肝脏递送; Chol 增强亲脂性, 提高生物膜透过和转染效率。ASO 长度也会影响分布和组织摄取, 可结合修饰和长度进行设计。

最新修饰补充: 立体化学纯 PS-ASO、5-甲基胞嘧啶、PMO/PPMO、tcDNA、GalNAc 偶联、抗体-寡核苷酸偶联 (AOC)、细胞穿透肽偶联等。设计时可结合靶组织、给药途径、耐受性和脱靶风险选择修饰方案。

三、质量控制

- MASS 检测:** 产品是准确分子量大小且经过特殊化学分子修饰的单链寡核苷酸。
- HPLC 纯化:** 经过 HPLC 纯化并测定 ASO 纯度>90%。
- 更新质控建议:** 体内实验用 ASO 建议选择 in vivo 级别, 除 MASS 和 HPLC 外, 还应关注内毒素、无菌、金属残留、残留溶剂和立体化学纯度。纯度通常要求>90%, 体内实验建议>95%或按供应商 in vivo 级别标准。内毒素一般建议<5 EU/mg, 具体以产品 COA 为准。

四、运输与保存

- 运输:** 产品以冻干粉形式常温运输。
- 收到后保存:** 收到产品后请瞬时离心, 尽快于 $-20^{\circ}\text{C}\sim-80^{\circ}\text{C}$ 保存。部分 GMR-ASO 产品可在 $\leq-15^{\circ}\text{C}$ 条件下保存 6 个月。冻干粉一般可稳定保存一年。
- 储存液保存:** 建议用 RNase-free 水、灭菌无酶水或 DEPC 水配制成 $20\text{ }\mu\text{M}$ 储存液, 分装后保存于 $-20^{\circ}\text{C}\sim-80^{\circ}\text{C}$, 避免反复冻融, 冻融次数不超过 5 次。长期保存建议 -80°C 。
- 使用中保存:** 实验过程中产品最好置于冰上, 使用完毕后于 $-20^{\circ}\text{C}\sim-80^{\circ}\text{C}$ 小心保存。
- 动物实验用 ASO:** 建议选用无内毒素、in vivo 级别 ASO, 必要时用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜无菌过滤。

五、使用前须知

- 产品以冻干粉形式提供, 由于影响结晶形态的因素很多, 产品外观可能有所差异, 甚至肉眼不可见, 此为正常现象。
- 开盖前瞬时离心, 轻轻打开管盖, 沿管壁轻柔加入溶剂, 室温溶解约 30 分钟, 并可涡旋振荡数次促溶。
- 为避免外界因素(酶、极端 pH、温度等)导致降解, 所有操作请严格遵循 RNA 操作规则。
- 操作时请戴手套, 使用的管子、移液枪、枪头等均需避免 RNAase 污染, 建议使用无酶处理耗材。
- 配好的储存液请分装、密封, 避免反复冻融。
- ASO 在操作过程中, 如果有外源核酸酶存在, RNA oligo 容易发生降解。

六、储存液配制

20 μM 储存液配制参考

ASO 量	RNase-free 水/灭菌无酶水
5 nmol	250 μL
20 nmol	1000 μL

若为 1 OD 或其他包装, 请按管标摩尔数计算。参考: 1 OD 可加入约 250 μL DEPC 水或无酶水配成 $20\text{ }\mu\text{M}$ 储存液, 具体以合成报告为准。

动物实验可根据剂量配制更高浓度(如 $10\sim 20\text{ mg/mL}$), 并用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜无菌过滤。储存液应单次使用分装, 避免反复冻融。

七、细胞实验方法

1. 一般原则

为降低细胞密度、试剂用量、转染效率等因素导致的孔间差异, 建议:

- 每个转染样品至少设置 3 个复孔;
- 接种细胞时每孔细胞数量尽量一致, 使细胞均匀分布;
- 转染时细胞融合度一般以 $30\%\sim 70\%$ 为佳, 常用 $30\%\sim 50\%$;
- 不同细胞株、转染试剂差异较大, 建议通过预实验确定最佳条件。

2. 转染浓度与检测时间

- ASO 最佳工作浓度因细胞类型和研究目的而异。推荐初始转染浓度为 50 nM 。
- 优化范围建议为 $5\sim 100\text{ nM}$, 也可参考 $10\sim 100\text{ nM}$ 。

- 部分说明中参考终浓度为 30 nM，可根据细胞类型调整。
- 检测时间：一般转染后 12~48 小时可检测 RNA，24~72 小时检测蛋白；部分说明建议转染后 24~72 小时检测 RNA。最佳检测时间与细胞类型、转染试剂、检测目的相关。

3. 转染步骤

以 24 孔板、ASO 终浓度 50 nM 为例：

1. 接种细胞

- 贴壁细胞：以 HeLa 细胞为例，接种 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个细胞至 24 孔板，使转染时密度达到 30%~50%。
- 悬浮细胞：以 THP-1 细胞为例，接种 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个细胞至 24 孔板。
- 不同细胞生长速度不同，接种数量需根据细胞类型、培养时间和实验目的调整。

2. 转染复合物配制

以 Lipofectamine RNAiMAX（具体参照说明书）为例：

- 用 30 μ L 1 $\times$ Buffer 稀释 1.25 μ L 20 μ M ASO 储存液，轻轻混匀；
- 加入 3 μ L Lipofectamine RNAiMAX，轻轻吹打混匀；
- 室温孵育 0~15 分钟，制备转染复合物。
- 请勿振荡，溶液可能浑浊但不影响转染；混合液室温放置不宜超过 24 小时。

3. 转染

将转染复合物逐滴加入含适量无双抗完全培养基的细胞中，轻轻混匀。一般无需移除或更换原培养基，也可根据实验优化。

将培养板置于 37°C、CO₂ 培养箱中培养 24~96 小时，培养时间与实验目的相关。

4. 转染用量参考

表 1 常规参考用量

培养皿类型	96 wells	24 wells	12 wells	6 wells
转染试剂	0.3~1.0 μ L	1~3 μ L	2~6 μ L	3~12 μ L
ASO	3 pmol	15 pmol	30 pmol	60 pmol
细胞数（参考）	6,000 cells/well	40,000 cells/well	80,000 cells/well	200,000 cells/well
每孔培养基体积	0.1 mL	0.5 mL	1.0 mL	2 mL

注：转染试剂用量应根据所订购试剂调整；表中 ASO 添加量对应终浓度约 30 nM；细胞密度为参考值，一般融合度 30%~70% 为佳。

表 2 Lipofectamine RNAiMAX 转染 ASO 用量参考（50 nM）

培养板	终浓度	培养基	Buffer	20 μ M ASO 储存液	Reagent
96-well	50 nM	93.15 μ L	6 μ L	0.25 μ L	0.6 μ L
24-well	50 nM	465.75 μ L	30 μ L	1.25 μ L	3 μ L
12-well	50 nM	931.50 μ L	60 μ L	2.5 μ L	6 μ L
6-well	50 nM	1863.00 μ L	120 μ L	5 μ L	12 μ L

其他终浓度（10、20、30、100 nM）请按具体转染试剂说明书调整。

最新转染/递送补充: 除脂质体转染外, 可根据细胞类型选择电转、微流控、多肽/ CPP 递送或裸递送 (gymnosis)。裸递送无需转染试剂, 但所需浓度通常远高于脂质体转染, 建议设置 1~20 μM 浓度梯度优化。难转染细胞优先考虑电转或非病毒递送体系。若使用 GalNAc-ASO、AOC 等偶联物, 应按其特定递送途径操作。

5. 效果检测

- RNA 水平:** ASO 通过 RNase H 介导靶 RNA 裂解, 可用 qRT-PCR 检测目的基因 RNA 水平并计算抑制效率。一般转染后 24~72 小时可检测到 RNA 表达明显降低, 引物设计质量很重要。
- 蛋白水平:** 对于蛋白编码基因, 需检测相应蛋白表达水平。若 RNA 水平下降而蛋白变化不明显, 需结合 mRNA 表达水平判断原因。
- 功能筛选:** 可用 EdU 细胞增殖、TUNEL 细胞凋亡等方法检测 ASO 对细胞功能的影响。
- 最新检测技术:** ddPCR、RNA-seq、单细胞转录组、空间转录组、高内涵成像、质谱成像、LC-MS/MS 等, 可用于低丰度 RNA 精确定量、全局脱靶分析、细胞异质性和组织分布研究。

八、动物实验方法

- 动物模型:** 根据实验需要选择合适的动物模型。
- 纯化方式:** 动物体内实验建议选择 in vivo 纯化级别的 ASO。
- 给药方式:**
 - 局部给药: 适用于浅表器官和组织, 如眼、肌肉、皮下组织等, 导入效率较高、用量少、吸收快。
 - 系统给药: 适用于内脏、器官及散在分布的靶位, 如心、肝、脾、肺、肾、淋巴细胞、转移性肿瘤等。

1. 注射剂量

- 静脉或腹腔给药: 1~150 nmol/次, 或 2~80 mg/kg。
- 局部给药: 0.1~100 nmol/次, 或 0.5~60 mg/kg。

2. 给药周期

- 慢性给药模型: 建议每周注射 2~3 次, 持续给药时间根据实验要求调整。
- 急性给药模型: 给药 1 次, 给药后 48~72 小时进行相关检测。

3. 给药途径

途径	适用部位
静脉给药	心、肝、肾、肺、肿瘤组织等血流丰富组织器官
腹腔给药	腹腔和盆腔内脏器, 如胰、脾、肾、卵巢等
颅内给药	中枢神经研究
呼吸道给药	呼吸系统
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、眼睛等
鞘内/脑室内注射	CNS 靶向, 如 nusinersen、tofersen 等
玻璃体腔注射	眼科靶向
皮下注射	GalNAc-ASO 常用, 肝靶向
吸入/雾化	肺部靶向

更新提示: GalNAc 偶联 ASO 通常剂量更低、给药频率更低。所有动物实验需经伦理委员会批准, 并根据预实验确定剂量、频率和终点。

4. 实验案例参考文献

Reference	ASO 类型/靶点	Animal	Delivery	Doses	detection
Prakash et al., <i>Nucleic Acids Res.</i> 2022	GalNAc 偶联 ASO (靶向 PCSK9)	mice	Subcutaneous injection (皮下注射)	10 mg/kg, 每周 1 次, 持续 4 周	末次注射后 7 天
Smith et al., <i>Nat Med.</i> 2021	2'-MOE ASO (靶向 SOD1)	mice	Intrathecal injection (鞘内注射)	50 µg/只, 单次	注射后 4 周
Wang et al., <i>Mol Cancer.</i> 2023	LNA 修饰 ASO (靶向 STAT3)	mice	Intratumoral injection (瘤内注射)	5 mg/kg, 每 3 天 1 次, 持续 2 周	末次注射后 3 天
Lu et al., <i>J Clin Invest.</i> 2022	剪接调节 ASO (靶向 DMD)	mice	Intramuscular injection (肌肉注射)	20 µg/只, 单次	注射后 2 周
Li et al., <i>Nucleic Acids Res.</i> 2024	2'-OMe ASO (靶向 miR-21)	rats	Tail vein injection (尾静脉注射)	20 mg/kg, 连续 3 天	首次注射后 14 天
Zhao et al., <i>J Neuroinflammation.</i> 2023	完全修饰 ASO (靶向 Tau)	mice	Intracerebroventricular injection (脑室内注射)	1 nmol/只, 单次	注射后 21 天
Chen et al., <i>Hepatology.</i> 2023	GalNAc 偶联 ASO (靶向 ApoB)	mice	Subcutaneous injection (皮下注射)	5 mg/kg, 单次	注射后 4 周
Xu et al., <i>Sci Transl Med.</i> 2024	反义寡核苷酸 (靶向 ANGPTL3)	mice	Tail vein injection (尾静脉注射)	30 mg/kg, 每周 1 次, 持续 3 周	末次注射后 10 天

九、实验对照设置

正式实验一般设置实验组和阴性对照组, 实验组抑制效果需与阴性对照组比较。预实验可设置以下对照, 以确认转染试剂及阴性对照无毒性、无显著干扰:

- **a) 实验组:** 使用目的基因 ASO 进行转染。
- **b) 阴性对照组 (NC 组):** 使用阴性对照 ASO 转染, 用于说明 ASO 作用的特异性。
- **c) 正常细胞对照组 (Blank 组):** 未经任何转染处理的细胞。
- **d) 转染试剂对照组 (Mock 组):** 仅使用转染试剂, 不加入 ASO, 用于排除转染试剂影响。
- **e) 荧光标记转染对照组:** 使用荧光对照 siRNA 或转染指示剂, 用于检测转染效率。

更新建议: 阴性对照 ASO 建议与实验 ASO 具有相同长度、化学修饰、GC 含量和骨架修饰, 并经生物信息学确认无已知靶标。对于剪接转换 ASO, 应使用不诱导目标剪接事件的对照。qRT-PCR 建议使用至少 2~3 个内参基因, 并结合 ddPCR 或 RNA-seq 验证。

十、基因沉默效果不好时的改善建议

- 1. 提高转染效率**
依据转染试剂说明书优化细胞密度、试剂用量、转染时间等; 尝试其他细胞类型; 必要时更换转染试剂或采用电转。
- 2. 检测目的基因表达水平**
若目的基因表达丰度很低, 难以有效沉默。一般目的基因与 GAPDH 或 ACTB 的 ΔCt 值在 10 以内较适合沉默; ΔCt 达到 15 以上通常难以获得有效沉默, 建议更换实验细胞。
- 3. 优化 ASO 浓度**
可按推荐浓度 50 nM 进行预实验, 再结合细胞类型和目的基因表达水平设置浓度梯度, 优化最适浓度。

4. 更换其他 ASO

若转染效果尚佳且其他因素无问题, 但仍无理想沉默效果, 可尝试更换其他 ASO。靶位点二级结构复杂或序列特性可能导致部分 ASO 效果不佳。

5. 检查检测分析方法

引物设计、检测时间点、对照样本、实验样本数据稳定性等均可能影响结果, 需针对性分析调整。

6. 其他原因

若已排除转染方法、转染效率、基因表达水平及 ASO 浓度等问题, 可考虑更换细胞进行尝试。

十一、参考文献

1. Crooke ST, Liang XH, Baker BF, Crooke RM. Antisense technology: A review. *J Biol Chem*. 2021;296:100416.
2. Crooke ST, Baker BF, Crooke RM, Liang XH. Antisense technology: an overview and prospectus. *Nat Rev Drug Discov*. 2021;20(6):427-453.
3. Dhuri K, Bechtold C, Quijano E, et al. Antisense Oligonucleotides: An Emerging Area in Drug Discovery and Development. *J Clin Med*. 2020;9(6):2004.
4. Egli M, Manoharan M. Chemistry, structure and function of approved oligonucleotide therapeutics. *Nucleic Acids Res*. 2023;51(6):2529-2573.
5. Kulkarni JA, Witzigmann D, Thomson SB, et al. The current landscape of nucleic acid therapeutics. *Nat Nanotechnol*. 2021;16(6):630-643.
6. Roberts TC, Langer R, Wood MJA. Advances in oligonucleotide drug delivery. *Nat Rev Drug Discov*. 2020;19(10):673-694.
7. Bost JP, Barriga H, Holme MN, et al. Delivery of Oligonucleotide Therapeutics: Chemical Modifications, Lipid Nanoparticles, and Extracellular Vesicles. *ACS Nano*. 2021;15(9):13993-14021.
8. Gagliardi M, Ashizawa AT. The Challenges and Strategies of Antisense Oligonucleotide Drug Delivery. *Biomedicines*. 2021;9(10):1333.
9. Miller TM, Cudkowicz ME, Genge A, et al. Trial of Antisense Oligonucleotide Tofersen for SOD1 ALS. *N Engl J Med*. 2022;387(12):1099-1110.
10. Coelho T, Marques W Jr, Dasgupta A, et al. Eplontersen for Hereditary Transthyretin Amyloidosis with Polyneuropathy. *N Engl J Med*. 2023;389(26):2425-2435.
11. Li M, Ding X, Zhang Y, et al. Antisense oligonucleotides targeting lncRNA AC104041.1 induces antitumor activity through Wnt2B/ β -catenin pathway in head and neck squamous cell carcinomas. *Cell Death Dis*. 2020;11:672.
12. Shen W, De Hoyos CL, Migawa MT, et al. Chemical modification of PS-ASO therapeutics reduces cellular protein-binding and improves the therapeutic index. *Nat Biotechnol*. 2019;37(6):640-650. (经典文献)