



GenePharma

股票代码: 430601

吉玛基因
www.genepharma.com

ASO 操作使用手册

1. 产 品: GMR-ASO
2. 纯化方式: HPLC 纯化
3. 产品形式: 干粉
4. 储存条件: 在 $\leq -15^{\circ}\text{C}$ 条件下 6 个月

质量控制

1. 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。
2. HPLC 纯化: 经过 HPLC 纯化并测定 ASO 纯度 $>90\%$ 。
3. 注意事项:
 - (1) 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。
 - (2) 在进行相关实验时, 请带手套进行操作, 使用的管子、移液枪和枪头都要避免 RNAase 污染。
 - (3) 收到产品后尽快储存在 $\leq -15^{\circ}\text{C}$ 环境中。

ASO 的重悬

在转速为 4,000~10,000g 的条件下离心 EP 管 4~2 分钟, 让 ASO 干粉聚集在试管的底部。

1. 轻轻的打开管盖。
2. 1OD 加入 250 μL (左右) 的 DEPC 水, 配成 20 μM 的储存液。
3. 柔和地用移液枪吹打储备液 5~6 次。
4. 根据具体用量情况分装, 密封好 EP 管后储存, 避免反复冻融。
5. 贮存在 -80°C , 以备使用。
6. 使用的管子、枪头都要经过无酶处理。



GenePharma

股票代码：430601

吉玛基因

www.genepharma.com

一、ASO 简介

ASO 是小核酸药物之一的反义寡核苷酸（antisense oligonucleotides）英文缩写，也有简称为 ASON，是与靶基因 mRNA/lncRNA/circRNA/miRNA 形成互补的单链核糖核酸（长度通常为 20bp 左右）。

ASO 是一种基因调控好助手，在真核生物中 ASO 发现与发展历史比 siRNA 还要早，经历了第一代、第二代、第三代发展历程，特别是以 PMO、LNA、cEt、GalNAc、2' OMe/F/MOE、5'-VP/Chol、3'-PUFA 等修饰方式以及 LNP 递送载体的不断改进，优化了与 RNA 或蛋白亲和力以及耐酶解稳定性，使得 ASO 进一步发展，小核酸临床药物不断获批。

（一）ASO 细胞应用

- 1) 有研究表明 ASO 针对不同区域的 RNA 干扰效果有差异，ASO 更容易入核，并且细胞核中 RNase H 的水平较高，更适合核内 RNA 干扰。因此，对于核内定位基因可以尝试 ASO 进行调控。而对于核外基因 siRNA 干扰效果更好一些。当然，不同基因、不同细胞、不同时间及调控方式等差异也可能导致调控效果出现不一样的结果。
- 2) 有研究表明 ASO 在细胞水平发挥时效相对较早，ASO 接触细胞后几个小时即可通过细胞胞吞作用进入细胞，其中一部分可以结合到核内或核外 RNA，招募到 RNaseH1，进行 RNA 降解。所以 ASO 可以较快实现 RNA 干扰。考虑细胞转染过程及蛋白水平及功能表现，可以在转染后 12~48 小时检测 RNA，24~72 小时检测蛋白（实验目的另有要求需另行考虑）。

（二）ASO 动物应用

由于动物体内存在大量的核酸酶，外源核酸进入动物体内后容易降解，这就要求 ASO 具有较高的稳定性、亲和性、以及较低的免疫原性和毒性。不同的修饰——磷酸骨架、核糖环、3'-和 5'-末端修饰，可以实现这个目标。如：

- 1) PS 修饰可以提高寡核苷酸的稳定性；
 - 2) 2'-Moe、2'F、cEt 可以增加的核酸酶抗性和结合亲和力；
 - 3) LNA 具有更高的结合亲和力，增加靶向性；
 - 4) GalNAc 修饰的 ASOs 可以实现特异性的肝脏递送；
 - 5) 胆固醇 Chol 是亲脂性基团能加强亲脂性，从而有效地透过生物膜，提高转染效率。
- 除了修饰影响外，ASO 的长度也会影响分布和组织摄取，所以可以通过修饰选择和设计长度来达到实验目的。

二、ASO 产品类型

吉玛基因具有丰富的寡核苷酸合成经验。我们可以为大家提供多种 ASO 产品：常规 ASO 是全链硫代修饰，中间是 DNA，两端是修饰的 RNA 序列。除此以外，还可以根据实验要求添加其他修饰，比如 LNA、GALNAC、2'MOE、2'F、Amine、Chol 等来提高靶向性和干扰效果，也可以添加荧光修饰，比如 CY3、CY5、FAM。






GenePharma

股票代码: 430601

吉玛基因

www.genepharma.com

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; 3'Galnac; 荧光修饰 (FAM; CY3; CY5,)
ASO PLUS	20 bp	全链 PS, 中间 DNA, 两端 RNA 做 2'-OMe 修饰、LNA 修饰 	
L-ASO	20 bp	全链 PS, 中间 DNA, 两端 RNA 做 LNA 修饰 	
ASO&RNAi (ASRi)	20+21bp	常规 ASO+常规 siRNA	
定制 ASO	15-30bp	-----	

图示:



2'Ome



phosphorothioate linkage



DNA



LNA

三、ASO 细胞转染

不同的转染试剂操作和用量不同, 需要根据使用的转染试剂说明书进行操作。由于不同转染试剂对不同的细胞株转染效率也不同, 建议通过预实验来确定最佳转染条件。优化时的 ASO 的浓度范围可以放至 5~100nM。转染后 12~48 小时检测 RNA 结果, 24~72 小时检测蛋白结果。

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:

- 1) 转染试剂的推荐量, 根据您订购的试剂不同应做适当的调整。
- 2) 所显示的添加量是 ASO 终浓度为 30nM 的量。由于最大 ASO 活性的量在不同细胞类型是有差异的, 如果 ASO 加入量太大, 容易导致细胞死亡, 推荐您自行优化。
- 3) 对细胞密度只是推荐值, 不同的细胞株有一定的变化, 主要看细胞的大小和生长情况, 一般我们推荐的细胞融合度在 30~70%为佳。



四、体内实验指南

ASO 可以通过动物局部注射或者尾静脉注射的方式, 在局部或者全身发挥作用。体内使用剂量随着给药方式和不同修饰有很大的差异, 需要根据实验方案参考相关文献设定给药剂量和频次, 通过预实验找到最佳的实验条件。

(一) 注射剂量:

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

(二) 给药周期:

- 1) 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进行调整;
- 2) 急性给药模型: 给药 1 次, 给药 48~72 小时以后进行相关检测。

(三) 给药途径:

- 1) 静脉给药: 适合心、肝、肾、肺、肿瘤组织等血流丰富的组织器官;
- 2) 腹腔给药: 适合腹腔和盆腔内脏器, 胰、脾、肾、卵巢等;
- 3) 颅内给药: 适合中枢神经研究;
- 4) 呼吸道给药: 适合呼吸系统;
- 5) 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。

五、实验案例

Li et al. *Cell Death and Disease* (2020)11:672
<https://doi.org/10.1038/s41419-020-02820-3>

Cell Death & Disease

ARTICLE

Open Access

Antisense oligonucleotides targeting lncRNA AC104041.1 induces antitumor activity through Wnt2B/ β -catenin pathway in head and neck squamous cell carcinomas

Mengwei Li^{1,2}, Xu Ding³, Yinan Zhang^{1,2}, Xin Li^{1,2}, Haoze Zhou^{1,2}, Li Yang^{1,2}, Yilin Li^{1,2}, Peiwei Yang^{1,2}, Xiaomin Zhang³, Jialiang Hu^{1,2}, Edouard Nice⁴, Heming Wu³ and Hanmei Xu^{1,2}

(一) 实验操作:

- 1) 细胞实验: LNA-ASO (GenePharma, China), 使用 GP-transfect-Mate (GenePharma, China) 做为转染试剂, 工作浓度是 80 nM;
- 2) 动物实验: LNA-ASO (GenePharma, China) 溶解成 1 μ M 浓度后, 没有添加转染试剂, 直接注射到动物体内, 尾静脉注射, 使用量是 10 mg/kg, 每 2 天注射, 持续 28 天。



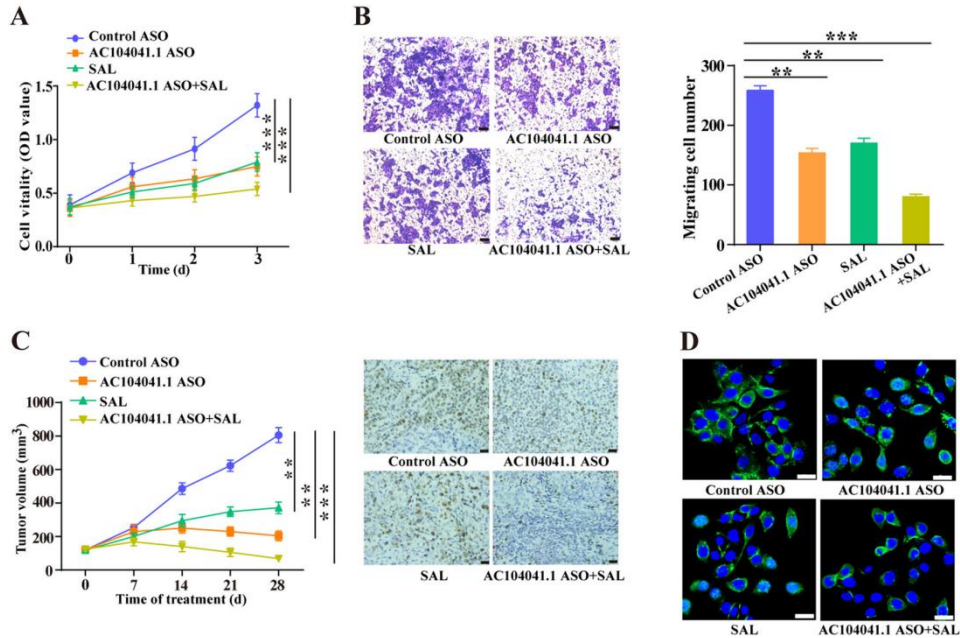
GenePharma

股票代码: 430601

吉玛基因

www.genepharma.com

(二) 实验结果:



- a. Cell proliferation assay of SCC4 cells transfected with AC104041.1 specific LNA-ASO or combined with salinomycin treatment (n = 5). Data are presented as the mean values ± SEM, the experiment was repeated three times, ***P < 0.001, compared with control cells (two-way ANOVA).
- b. Cell migration assay of SCC4 cells transfected with AC104041.1 specific LNA-ASO or combined with salinomycin treatment. Data are presented as the mean values ± SD, the experiment was performed in triplicates and repeated three times, **P < 0.01, ***P < 0.001 (Student's t-test).
- c. Tumor growth in Balb/c nude mice and representative immunohistochemical images of Ki-67 from tumors after subcutaneous injection of AC104041.1 specific LNA-ASO or combined with salinomycin treatment (n = 5 mice for each group). Data are presented as the mean values ± SEM, **P < 0.01, ***P < 0.001 (two-way ANOVA).
- d. Immunofluorescence of β-catenin (green) and nuclei (blue) in SCC4 cells transfected with AC104041.1 specific LNA-ASO or combined with salinomycin treatment. Scale bar represents 20 μm.

(三) 来自 Hamilton 注射器指南

Size	液晶显示 最小			液晶显示 最小			液晶显示 最小		
	分辨率	Cat.No.	Cat.No.	分辨率	Cat.No.	分辨率	Cat.No.	Cat.No.	
0.5 μL						0.0025 μL	HDS86259	HDS86250**	
1 μL						0.005 μL	HDS80135	HDS80100**	
2 μL						0.010 μL	HDS88411	HDS88400**	
5 μL	0.025 μL	HDS87900				0.025 μL	HDS88011	HDS88000**	
10 μL	0.05 μL	HDS80300	HDS80365	0.05 μL	HDS80330				
25 μL	0.10 μL	HDS80400	HDS80465	0.10 μL	HDS80430				
50 μL	0.25 μL	HDS80500	HDS80565	0.25 μL	HDS80530				
100 μL	0.5 μL	HDS80600	HDS80665	0.5 μL	HDS80630				
250 μL	1.0 μL	HDS80700	HDS80765	1.0 μL	HDS80730				
500 μL	2.5 μL	HDS80800	HDS80865	2.5 μL	HDS80830				

** 这些注射器的针头不是22/22s, 不能用于Rheodyne 进样阀



GenePharma

股票代码: 430601

吉玛基因
www.genepharma.com

六、参考文献

1. Shen W , De Hoyos C L , Migawa M T , et al. Chemical modification of PS-ASO therapeutics reduces cellular protein-binding and improves the therapeutic index[J]. Nature biotechnology, 2019.
2. H , Lim S , Wong W F . ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES: FROM DESIGN TO THERAPEUTIC APPLICATION[J]. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 2010, 33(5-6):533-540.
3. Crooke S T. Molecular mechanisms of antisense oligonucleotides[J]. Nucleic acid therapeutics, 2017, 27(2): 70-77.
4. Cai Z, Cao C, Ji L, et al. RIC-seq for global in situ profiling of RNA–RNA spatial interactions[J]. Nature, 2020, 582(7812): 432-437
5. 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 11, 672 (2020).

本产品仅限于科研用途，而不适用于临床诊断、治疗等其他用途

上海电话: 021-51320195

E-mail: support@genepharma.com

苏州电话: 0512-86668828

E-mail: szsupport@genepharma.com



B056-V001-20230206