

细胞用 ASO 使用说明书

产品介绍

QM 化学修饰 ASO 是小核酸药物之一的反义寡核苷酸 (antisense oligonucleotides) 英文缩写, 基于目前研究结果表明, ASO 降解 RNA 是通过单链 ASO 直接结合 RNA 在 RNaseH 作用下降解 RNA。QM 化学修饰 ASO 是特殊化学修饰的一段长 20bp 的单链 DNA-RNA Chimeras, 即用型。对合成的 ASO 进行一系列化学修饰以提高 ASO 的稳定性, 降低细胞毒性。适合动物体内干扰实验和细胞实验。

使用前须知

产品形式: 冻干粉(由于影响结晶形态的因素很多, 产品外观有些差异, 甚至形态无法用肉眼可见, 此为正常现象)

运输条件: 常温运输

储存条件: 请于-20°C ~ -80°C条件下存放, 冻干粉可以稳定保存一年。

注意事项 1: ASO 在操作过程中, 需注意避免 (核酸酶 RNAase, DNAase, 温度, 极端 PH 等) 可能导致的产品降解。请遵循 RNA 操作规范, 带手套操作, ep 管, 移液枪和枪头等都要避免污染, 实验过程中, 产品最好于冰上放置。

注意事项 2: 使用前请瞬时离心 (在最大转速约为 4,000g 的低速条件下离心装有 ASO 的 EP 管, 让 ASO 聚集在试管的底部) 轻轻的打开管盖, 用 DEPC 水或者 RNase free water 配制 20 μ mol/L 的 ASO 储存液, 柔和地用移液枪吹打充分混匀 ASO 储存液。分装保存于-20°C~-80°C, 避免反复冻融 (不超过 5 次)。

ASO	5nmol
DEPC 水	250ul

表 2 20 μ mol/L 的 ASO 储存液的配置参考

注: 若搭配 QM-RNA Transfection Kit 转染试剂不得使用 PBS 或培养基稀释 ASO

ASO 的细胞转染步骤

为了降低细胞密度、试剂用量, 转染效率等因素导致的孔间差异, 保证实验的可靠性和可重复性,

1、一般建议:

1. 接种细胞时的每个孔的细胞密度, 数量保持尽可能一致, 且细胞均匀分布。

2. 转染实验每个转染处理组建议设置至少 3 个复孔;

3: 芊陌生物推荐的 ASO 转染终浓度为 40nmol/L, 该浓度对于多数情况可以达到较为理想的 ASO 干扰效果, 不同类型的细胞以及研究目的的 ASO 的最佳转染终浓度各不相同。最佳转染效率建议通过调整 ASO 的用量 (优化范围推荐 5~100nmol/L) 来进行优化。

4: 转染时的细胞密度应根据细胞生长速度、大小、后续检测时间等条件进行调整。

转染步骤示例:

以芊陌生物的 QM-RNA Transfection 转染试剂 (转染试剂组成见表 3) 转染 ASO (6 孔板, ASO 转染终浓度为 40nmol/L) 为例, 其他规格容器的试剂用量请参考表 4, 若使用其它转染试剂, 请参考对应转染试剂说明书。

芊陌生物的 QM-RNA Transfection Kit 转染试剂

QM-RNA Transfection Kit 转染试剂是一种专门用于小片段 RNA (siRNA /ASO / miRNA

mimic/ miRNA inhibitor /piRNA / tRNA 等) 的高效低毒转染试剂 (不建议转染质粒), 极具生物相容性, 转染效率优异, 细胞毒性小。该转染试剂转染操作方便, 快捷, 高效。

QM-RNA Transfection Kit 组成	100ul	0.5ml	1ml
QM-RNA Reagent	100ul	0.5ml	1ml
QM-RNA Buffer	1ml	5ml	10ml

表 3 QM-RNA Transfection Kit 转染试剂成分组成及规格

注) QM-RNA Transfection Kit 转染试剂为常温运输, 长期储存为 2~8°C 保存, 可稳定保存一年, 不可冷冻, 冷冻后会破坏 Reagent 组分结构和性状, 会极大的影响细胞转染效果。推荐转染前细胞密度 50% ~80% 为最佳。

1、细胞接种:

贴壁细胞: 以 293T 细胞为例, 接种~ 0.4×10^6 个细胞到含 2mL 完全培养基的六孔板培养孔中, 使细胞转染时达到 50-80% 细胞密度。

悬浮细胞: 以 THP-1 细胞为例, 接种~ 0.5×10^6 个细胞至含 2mL 完全培养基的六孔板培养孔中。

注) 1: 不同细胞初始接种数量依据不同的细胞大小, 细胞类型和细胞生长速度, 培养时间, 实验目的相应调整, 每个孔接种的细胞数量尽可能相同, 且细胞均匀分布。

2: 悬浮细胞、免疫细胞、原代细胞本身的特性普遍比较难转染, 可通过调整 ASO 用量以及转染试剂的用量, 不同的转染试剂及尽可能规范实验操作等来尝试提高转染效果, 如无明显改善可更换为电转方式或其他方法。

2、ASO 转染

ASO 预混液制备: 取无菌无酶 EP 管一支, 加入 46ul 的 QM-RNA Buffer 和 4ul 的 20umol/L 的 ASO 储存液, 吹打混匀。

ASO-QM 转染复合物制备: 取 7.5ul 的 QM-RNA Reagent 加入到 ASO 预混液的 EP 管中, 移液枪充分吹打混匀 20 次以上, 或者旋涡 2-3s。

注: a) 转染复合物在室温下可稳定存放 8 小时, 请勿将 ASO-QM 转染复合物置于冷冻条件。

b) RNA/QM-RNA Reagent 的比例是 QM-RNA Transfection 转染试剂包封的关键因素, 如需增减每孔 ASO 用量, 您可以按比例增加或减少加入细胞的 **ASO-QM 转染复合物** 的体积。

将 **ASO-QM 转染复合物** 加入到待转染的孔板的细胞培养基中, 轻轻混匀。

进行其他必要的特殊处理 (可选, 如加药处理等具体依据具体实验情况来确定)。

将培养板置于 37°C 的 CO₂ 培养箱中培养 24~96h (培养时间与实验目的相关, qPCR 一般为转染后 24-48h 收集细胞提取 RNA 检测 RT-qPCR; WB 一般为转染后 48-96h 收集细胞检测 WB)。

试剂	孔板			
	96 孔 (ul)	24 孔 (ul)	12 孔板	6 孔 (ul)
QM-RNA Buffer	2.3	11.5	23	46
20umol/L ASO 储存液	0.2	1	2	4
QM-RNA Reagent	0.38 或 0.75	1.9 或 3.8	3.8 或 7.5	7.5 或 15

表 4 终浓度 40nmol/L ASO 不同培养皿的推荐转染用量

注) 提供 2 种不同的 QM-RNA Reagent 转染浓度, 具体浓度可根据不同的细胞摸索选择, 对于多数细胞通常按照低剂量 QM-RNA Reagent 用量即可达到理想的转染效果。

3. ASO 效果检测

RNA水平检测：转染ASO后24~48h进行RNA水平检测。通过qPCR检测目的基因RNA水平的变化情况是RNAi实验结果的公认标准。由于细胞种类的不同，各实验最佳检测时间也不相同。检测时间过晚可能导致检测干扰效率不佳甚至检测不到干扰效果。（注：检测的qPCR引物设计质量很重要，我司（芊陌生物）可提供优质的qPCR引物设计合成）

蛋白水平检测：对于编码蛋白的基因，如需进行蛋白水平检测，推荐转染后48-96h进行相应检测。由于蛋白表达受到影响因素较多，如检测蛋白水平变化不明显请检测其mRNA水平变化情况，以确定ASO是否起作用。（注：wb检测的抗体质量很重要，我司（芊陌生物）可提供优质的wb抗体）

常见问题

沉默效果不佳改善建议：

1) 提高转染效率

良好的转染效果是RNAi实验成功的基本前提。若基因沉默效果不佳，需优先排查转染效率方面的问题，可通过阳性对照siRNA/FAM-siRNA 转染对照来评估确认细胞转染效率。确认转染效率之后，如果转染效率不理想，则依据转染试剂相关说明进行转染条件（细胞密度，转染试剂用量，转染时间，ASO用量等）优化尝试，其次可尝试在其他类型细胞上进行转染。若由于实验细胞本身的特性很难转染，可考虑更换转染试剂或转染方法（如电转），或者在实验本身允许的情况下更换易于转染的其他细胞。

2) 检测目的基因初始的表达水平

若目的基因在实验细胞中的原本的表达丰度很低，是难以得到有效的沉默的。一般目的基因与管家基因QMPDH或ACTB的 ΔCt 值差值为10以内，比较适合做RNAi，若 ΔCt 值差值大于15则很难得到有效的沉默效果。对于目的基因表达丰度低的情况，若实验本身允许的情况下建议更换实验细胞。

3) 优化ASO浓度

ASO在一定的丰度下才能达到理想的作用效果，可根据芊陌生物推荐浓度（40nmol/L的转染终浓度）进行预实验测试，再结合实验细胞系类型及目的基因的表达水平设置ASO浓度梯度来优化ASO最适浓度。

4) 检测分析方法有误

qPCR引物的特异性不佳或使用有误，检测时间点设置不合理，对照组别设置错误，对照样本异常，实验样本检测数据不稳定等因素都会对后期实验数据分析造成影响，此类问题需根据具体的问题有针对性地进行分析调整。

5) 更换其他ASO

若确定转染效果良好，目标基因表达水平符合要求，RNAi的qPCR检测实验的引物特异性良好，及其他因素分析都没有问题的情况下，却没有达到理想的基因沉默效果，则可以尝试重新设计合成新的ASO尝试。

（注：由于RNA本身序列特性，目标基因靶位点的二级结构复杂等因素，目前，没有任何公司或者个人能够保证设计合成的每条ASO都可以对目标基因达到很好的敲低效果）

6) 其它原因

部分基因因其本身表达调控特性导致其难以沉默，在排除转染效率，基因表达水平、ASO 浓度，实验操作等方面的问题，且尝试过5条以上ASO，均无法有效敲低的情况下，则应考虑更换细胞进行尝试，或者更换其他方法如Crisp等来进行尝试。

温馨提示：如涉及到使用本公司产品发表文章请引用产品来源，QianMoBio Co. Ltd, shanghai, China, 上海芊陌生物科技有限公司。对于引用注释本公司产品发表的SCI paper，联系销售或者本公司，可获取对应的科研奖励金。