

invitrogen



Invitrogen 合成生物学服务产品手册

- 引物
- 探针
- 测序
- 基因合成

ThermoFisher
SCIENTIFIC

关于我们



赛默飞世尔科技是科学服务领域的世界领导者。公司年销售额超过 200 亿美元，拥有员工约 65,000 人，公司旗下包括以下五个首要品牌：Thermo Scientific、Applied Biosystems、Invitrogen、Fisher Scientific 和 Unity LabServices。我们的使命是携手客户，让世界更健康、更清洁、更安全。我们的产品和服务帮助客户加速创新并有效提升生产效率。

赛默飞世尔科技公司在中国的总部设于上海，并在 10 多个城市和地区设立了分公司和办事处，我们的全国员工人数约 4500 名，有 2400 多名面向客户的专业员工。生命科学研究、遗传分析和应用科学是我们的重要业务领域，旗下产品涵盖科学研究领域的各类试剂耗材和大型分析仪器。

合成生物学服务

合成生物学是什么？

合成生物学是分子生物学与系统生物学的组合，使用工程学的原则来设计生物系统 & 生物工厂。其目的是创造出改进的生物功能以应对当前与未来的挑战。

我们相信合成生物学将会改变我们生成能源、生产食物以及优化工业过程的方式，并能检测、预防与治愈疾病。我们致力于为科研群体提供无与伦比的技术和解决方案。通过科学与工程，这一独特的领域能让科研人员研究、修改、创造和再创造高度复杂的生化途径、DNA 序列、基因以及自然生物系统，以便能够理解并解答一些关于生命最有挑战性的问题。

我们在全球有 9 个生产基地：

- Pleasanton, California
- Regensburg, Germany
- Auckland, New Zealand
- Haneda, Japan
- Inchinnan, UK
- San Paulo, Brazil
- Suzhou, China
- Beijing, China
- Guangzhou, China

其中 Pleasanton, California 工厂拥有：

- ISO 9001
- ISO 13485
- GMP 认证



立足中国

在中国，我们有苏州、北京、广州三地工厂进行合成生物学服务，包括引物合成、探针合成、Sanger 测序服务、基因合成。其中苏州和广州工厂获得 ISO 9001:2008 认证，北京工厂获得 ISO 9000& 13485:2009 认证。



我们有多多样化的仪器：

- 27 台 Jurassics 合成仪
- 3 台 ABI 3900
- 3 台 Mermade12 高通量合成仪
- 1 台 AKAT 大规格合成仪
- 5 台 LCMS

满足不同类型的应用需求：

- PCR
- 荧光定量 PCR
- STR
- SSR
- NGS

Invitrogen 引物合成服务已经超过了 20 年，我们在 20 余年的专业 DNA 合成中积累了丰富的经验和良好的业内声誉。多年来，我们的产品以稳定的品质和严格的管理规范受到广大科研工作者的青睐。

目录

第一章 引物合成	2
第二章 探针应用	7
第三章 测序服务	13
第四章 基因合成	15
4.1 常规基因合成	15
4.2 GeneArt 基因合成	16
第五章 附 1：常见问题解答	23
附 2：荧光基团选择	24

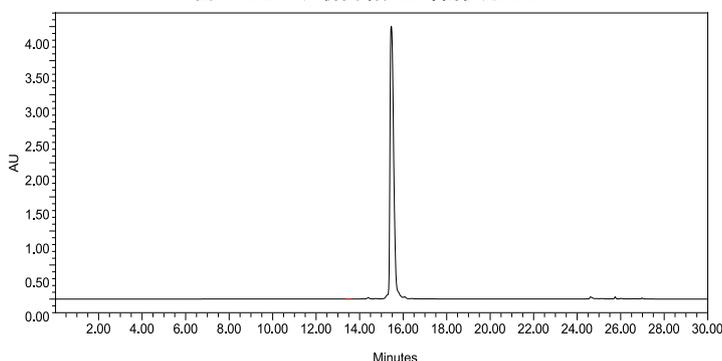


第一章 引物合成

Invitrogen 合成服务

- 源头保障 — 所有合成原料 (CPG, 单体, 修饰用染料等) 均为原装进口高品质产品, 卓越的全球采购系统确保了生产的高起点;
- 引领行业发展风向 — 全行业内率先进行气相氨解, 且采用自动化控制进行氨解, 成为行业发展的风向标;
- 合成仪器多样化 — 经典高效大通量合成仪及特殊应用的高品质合成仪相结合, 满足各种合成需求;
- 在线控制能力 — BIOTEK 锁定引物合成效率, 合成的同时加强了在线控制, 确保高质量的引物流入下道工序;
- 毛细管电泳在质检中的应用 — Invitrogen 是在中国引物合成业内唯一的一家拥有多台毛细管电泳仪并将其应用到每批产品质量检测中的公司, 其检测精度可达到 1 个碱基。

图A--HPLC 分析图谱, 主峰面积比96.87%



图B--CE 分析图谱, 主峰面积比89.61%

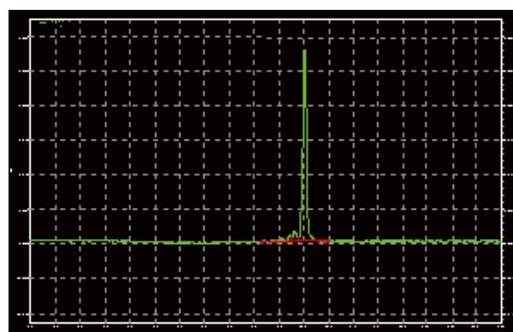
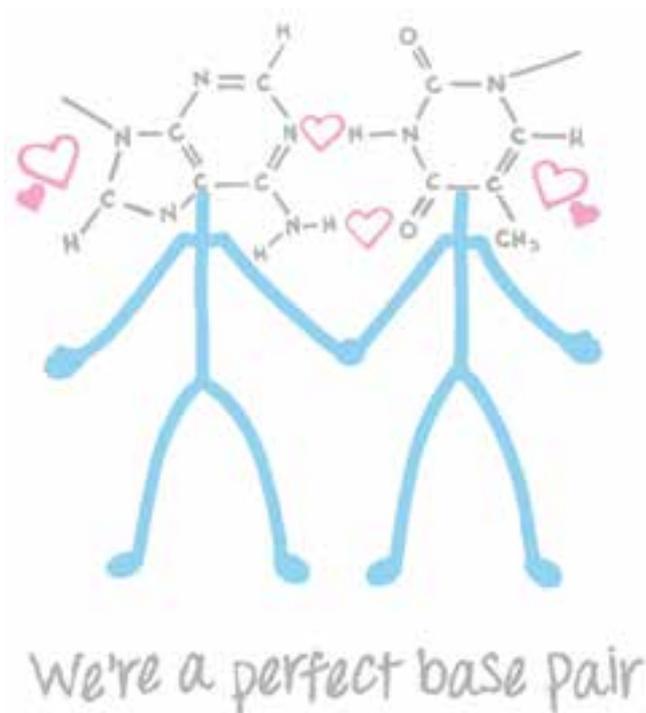


图 A 及图 B 说明: 同一引物使用 HPLC 分析显示主峰面积比 96.87%, 而用 CE 分析只有 89.61%。HPLC 图谱中看似单一的峰形, 在 CE 分析图中则显示仍然有部分杂峰存在, 因此使用 CE 毛细管电泳仪对合成的引物进行质量检测, 能保证引物的更高品质。一个 HPLC 鉴定纯度为 95% 的 20 个碱基的引物 (图 A), CE 结果往往仅有 88% 左右 (图 B), 因此, CE 的分辨率远高于 HPLC 和 PAGE 分析胶。

- 独特质检工艺 — 100% 的 Trityl 在线监控, CE, MS 及 OD 检测相结合, 确保 oligo 具有持续稳定的质量和准确的定量;



普通引物

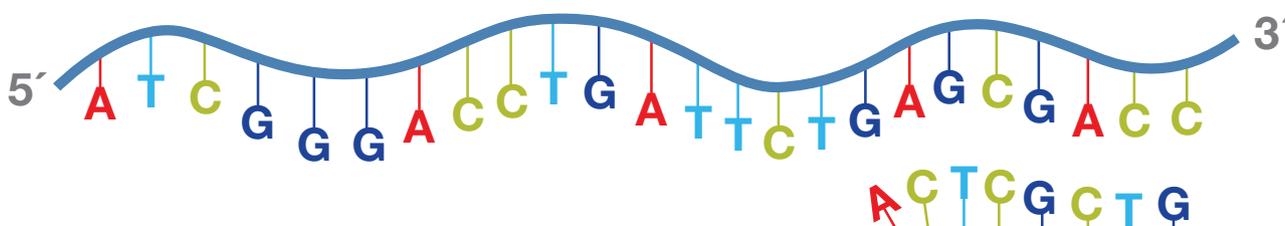
DNA 寡核苷酸产品有着广泛的应用，不仅在基础研究方面，还包括医学诊断、法医学和农业科学等各大领域，涉及基因表达，基因分型，克隆，突变，甲基化，一代测序，二代测序等应用。

定制 DNA 合成：

纯化方式	下单合成规模 (OD)	合成范围	质控范围
DSL	2OD 开始	6-99bp	80bp 之内
COP (iPAGE)	2OD 开始	15-45bp	45bp 之内
PAGE	2OD 开始	15-99bp	80bp 之内
HPLC	2OD 开始	6-50bp	50bp 之内

备注：荧光修饰引物合成范围及质控范围请额外询问本公司。

Find more information at: thermofisher.com/valueoligos



一般应用推荐：

应用	建议纯化方法 (保证最小纯度)
常规 PCR/RT-PCR	脱盐 (DSL)
测序	脱盐 (DSL)
RT-PCR 的第一条链 cDNA 合成	脱盐 (DSL)
PCR, 引物的关键在于 5' 序列 (如限制性酶切位点)	高亲和纯化 (COP/iPAGE)
指定位点突变	高亲和纯化 (COP/iPAGE)
合成文库时的第一条链 cDNA 合成	高亲和纯化 (COP/iPAGE)
克隆接头的产生	高亲和纯化 (COP/iPAGE)
凝胶迁移分析	高亲和纯化 (COP/iPAGE)
GeneTrapper 筛选	PAGE
PCR 产物用于克隆表达研究或基因重组等	PAGE
全基因合成	PAGE

完整严谨的 PAGE 纯化工艺



纯化方式说明:

纯化方法	描述优点	纯度标准
脱盐 (DSL)	通过在高纯氨气水蒸气混合物的气相氨解环境下将连接在 CPG 上的引物切割洗脱下来，能有效地去除盐分，但不能有效去除比目的片段短的小片段。	毛细管电泳 (Capillary Electrophoresis) 纯度大于 45%。
高亲和纯化 (COP/iPAGE)	基于特异和反相层析法，从合成好的产物中去除失败序列，提供最终的目标序列。适于 45 个碱基以下的引物。	毛细管电泳 (Capillary Electrophoresis) 纯度大于 75%。
聚丙烯酰胺电泳 (PAGE)	利用不同长度序列 DNA 在凝胶中迁移率不同来分离目标序列和失败序列，从而提供高纯度的目标引物。对长链 Oligo DNA (大于 40 个碱基) 的纯化特别有效。	毛细管电泳 (Capillary Electrophoresis) 纯度大于 85%。
高效液相 (HPLC)	高效液相 (HPLC) 利用 DNA 片段大小和带电电荷的不同来分离纯化引物，是一种广泛使用且非常有效的纯化方式，能达到很高的纯度和灵敏度，特别适合 40 个碱基以下的引物。	毛细管电泳 (Capillary Electrophoresis) 纯度大于 85%。 高效液相纯度 (HPLC) 纯度大于 90%。

修饰引物

我们提供包括 5' 修饰、3' 修饰和内部修饰的多种修饰引物合成服务。

修饰	代码	5' 修饰	3' 修饰	Internal	Prior Purification		
					DSL	PAGE	HPLC
*Attachment Chemistry/Linker							
Amine	AMN	√ C6	√ C7	√ dT	√	N/A	√
Aminolinker(C12)	AMB	√ C12			√	N/A	√
Biotin C6	BIO	√ C6	√ TEG	√ dT	√	N/A	√
Digoxin	DIG	√	√	√ dT	N/A	N/A	√
Thiol-modifier C3 S-S	THS		√ C3				
Thiol-modifier C6 S-S	THS	√ C6			N/A	N/A	√
**modified bases							
Deoxyinosine	dI	√	√	√	√	√	√
Deoxyuracil	dU	√	√	√	√	√	√
Me-dC	MedC	√	√	√	√	√	√
2,3-ddC	ddC		√		N/A	N/A	√
Hydroxymethyl-dC	HMC	√	√	√	N/A	N/A	√
***Phosphorylation and Phosphorothioates							
Phosphate	PHO	√	√		√	√	√
Phosphorothioates	THO			√	√	√	√
Spacer							
dSpacer	DSP	√	√	√	N/A	N/A	√
Spacer C3	SPC3	√	√	√	N/A	N/A	√
Spacer C6	SPC6	√	√	√	N/A	N/A	√
Spacer 9	SP9	√	√	√	N/A	N/A	√
Spacer C12	SPC12	√	√	√	N/A	N/A	√
Spacer 18	SP8	√	√	√	N/A	N/A	√

*Attachment Chemistry/Linker: 此种修饰方法可以用于后续连接其他修饰基团或者反应支持物表面。

**Modified bases: 此种修饰可用于交联或者杂交实验, 增加 DNA 双链稳定性和核酸酶保护等多种应用。

***Phosphorylation and Phosphorothioates 磷酸化和硫代修饰

氨基修饰 (AMN, AMB)

内部氨基修饰

我们主要用 C6-dT aminolinker 来加到胸腺嘧啶残基上来进行内部修饰。修饰后氨基与主链相距 10 个原子距离, 可用于进一步的标记和酶连接。

5' 氨基修饰

可方便地用于制备功能化的寡核苷酸, 广泛的应用在 DNA 芯片 (DNA Microarray) 和多重标记诊断系统。我们目前提供 5' C6 氨基修饰和 5' C12 氨基两种修饰, 前者可用于连接一些即便靠近寡核苷酸也不会影响其功能的化合物, 后者可以用于亲和纯

化基团的连接和一些荧光标记尤其是当荧光可能会因标记太靠近 DNA 链而被淬灭时。

3' 氨基修饰

我们目前提供 3' C6 氨基修饰。它可用于设计新的诊断探针和反义核苷酸, 例如 5' 端可用高度敏感的 32P 或荧光素标记的同时 3' 可用氨基修饰以进行其他的连接。另外 3' 修饰抗 3' 外切酶消化从而可用于反义实验。

生物素 (BIO)

卵白素 - 生物素 (avidin-biotin) 技术应用广泛, 包括用于非放射性免疫分析来检测蛋白质, 胞内化学染色, 细胞分离, 核酸分离, 杂交检测特异性的 DNA/RNA 序列, 离子通道构象变化的探针等。功能化的生物素还可用在已包被的固相表面的固定。最近也在探讨将这项技术用于光降解的生物素产品。由于链霉亲和素和生物素之间亲和力极强, 并且具有高度的特异性和稳定性, 因而可提高检测灵敏度。所有这些应用需要包含有一个或多个的生物素标记的特异性寡核苷酸。

巯基 (THS)

5'-巯基在很多方面与氨基修饰类似。巯基可用于加附各种修饰如荧光标记物和生物素。例如可以在碘乙酸和马来酰亚胺衍生物存在下来制作巯基连接的荧光探针。5'的巯基修饰主要用 5'-Thiol-Modifier C6-CE Phosphoramidite or the Thiol-Modifier C6 S-S CE Phosphoramidite)。用 5'-Thiol-Modifier C6-CE 单体修饰后必须进行硝酸银氧化以去除保护基 (trityl), 而 Thiol-Modifier C6 S-S CE 单体修饰后须用 DTT 将二硫键还原成巯基。

脱氧尿嘧啶 (deoxyUridine, dU)

脱氧尿嘧啶可以插进寡核苷酸来增加双链的熔点温度从而增长双链的稳定性。每个脱氧胸腺嘧啶被脱氧尿嘧啶替代可以增长双链熔点温度 1.7°C。

脱氧次黄嘌呤 (deoxyInosine, dI)

脱氧次黄嘌呤是一个自然存在的碱基, 虽然不是真正意义上的通用碱基但当与其它碱基结合时会比其它碱基错配相对更稳定。脱氧次黄嘌呤与其它碱基的结合能力为 $dI:dC > dI:dA > dI:dG > dI:dT$ 。在 DNA 聚合酶的催化下, 脱氧次黄嘌呤首选与 dC 结合。

甲基化 Me-dC (MedC) :

MedC 替代 dC 可以与 dG 配对, 增加 DNA 双链稳定性并提高

Tm 值, 因此 Me-dC 可以用于杂交反应实验中。此外, 还可以用于如下应用: 增强 PCR 引物的结合能力; 反义寡核苷酸以及 DNA 甲基化研究。

双脱氧 ddC

此种碱基主要用于两类实验中: PCR 反应中 3 端阻止链延伸, 如 microarray 实验。另一类是在 miRNA 文库构建过程中, 阻止 3 端 5' -adenylated oligos 最为接头进行自联或者彼此连接。

Hydroxymethyl-dC

此种碱基主要用于 DNA 去甲基化研究中。

磷酸化 (Phosphorylation)

5' 磷酸化可用于接头, 克隆和基因构建以及连接酶催化的连接反应。3' 磷酸化可抗 3' 外切酶消化的相关实验中, 也用于阻止 DNA 聚合酶催化的 DNA 链延伸反应。

硫代 (Phosphorothioate)

硫代修饰的寡核苷酸主要用于反义实验中防止被核酸酶降解。你可以选择全硫代, 但随着硫代碱基的增加, 寡核苷酸的 Tm 值会降低, 为了降低这种影响, 可以对引物两端 2-5 个碱基进行硫代修饰 (许多人选择 5' 和 3' 各 3 个碱基进行硫代修饰)。

间隔 (Spacer)

Spacer 可为寡核苷酸标记提供必要的间隔和距离以减少标记基团与寡核苷酸间的相互作用, 主要应用于 DNA 发夹结构和双链结构研究。dSpacer 主要用于在 DNA 序列中插入一个失去配对能力的碱基 (脱碱基位点)。5' 和 3'-Spacer 引进一个间隔, 用于增加修饰基团和 DNA 序列之间的距离。3'-Spacer 还可以阻止 3' 端外切酶和 3' 端聚合酶发挥作用。中间 Spacer 主要用于模仿核糖的 3' 和 5' 羟基间的多原子间隔, 或“替代”一个序列中未知的碱基。Spacer 18 由于带有六聚乙二醇长链, 常用于引进一个强疏水基团。



第二章 探针应用

用于基因表达和基因分型探针的荧光染料修饰引物

修饰	代码	5' 修饰	3' 修饰	Internal	Prior Purification		
					DSL	PAGE	HPLC
AMCA*	AMC	√	√	√ dT	N/A	N/A	√
FAM	FAM	√	√	√ dT	N/A	N/A	√
TET	TET	√			N/A	N/A	√
JOE*	JOE	√	√	√ dT	N/A	N/A	√
HEX	HEX	√			N/A	N/A	√
VIC	VIC	√			N/A	N/A	√
CY3*	CY3	√	√	√ dT	N/A	N/A	√
NED	NED	√			N/A	N/A	√
Rhodamine Green*	RGA	√	√	√ dT	N/A	N/A	√
Rhodamine Red*	RRA	√	√	√ dT	N/A	N/A	√
TAMRA*	TAM	√	√	√ dT	N/A	N/A	√
TAMRA (amidite, for STR)	TMA	√			N/A	N/A	√
PET	PET	√			N/A	N/A	√
Texas Red-X*	TRX	√	√	√ dT	N/A	N/A	√
ROX*	ROX	√	√	√ dT	N/A	N/A	√
CY5*	CY5	√	√	√ dT	N/A	N/A	√

备注：同一条荧光基团修饰引物中不能同时存在两种不同带“*”标注的修饰种类。

除了以上荧光染料，我们还提供特色系列修饰染料，全面覆盖整个光谱区域。

Modification	Mod Code	5' 修饰	3' 修饰	Internal	Prior Purification		
					DSL	PAGE	HPLC
Alexa fluor series (350/430)*	350/430	√	√	√ dT	N/A	N/A	√
Alexa fluor series (405/488/514/532/546/555/568/594/633/647/660/680/700/750)*	405/488/514/532/546/555/568/594/633/647/660/680/700/750	√	√	√ dT	N/A	N/A	√
BODIPY® series (493/503;530/550;558/569;564/570;576/589;581/591;630/650)*	BDC/BDB/BDP/BDE/BDF/BDG/BDH/BDN	√	√	√ dT	N/A	N/A	√

备注：同一条荧光基团修饰引物中不能同时存在两种不同带“*”标注的修饰种类。

我们提供多个淬灭基团可供选择：

修饰	Mod Code	5' 修饰	3' 修饰	Internal	Prior Purification		
						PAGE	HPLC
BHQ1	BQ1	√ dT	√	√ dT	N/A	N/A	√
BHQ2	BQ2		√		N/A	N/A	√
BHQ3	BQ3		√		N/A	N/A	√
DABCYL	DAB		√		N/A	N/A	√
QSY®7	QSY	√	√	√ dT	N/A	N/A	√

该类淬灭基团本身为非荧光类染料。

常用荧光基团光谱特性:

荧光基团	最大激发波长	最大发射波长	Emission color*
AMCA	353nm	422nm	Blue
FAM	494nm	518nm	Green
TET	521nm	538nm	Green-Yellow
JOE	520nm	548nm	Green-Yellow
HEX	535nm	553nm	Yellow
VIC	538nm	554nm	Yellow
CY3	552nm	570nm	Orange
NED	546nm	575nm	Orange
Rhodamine Green	560 nm	580 nm	Orange
Rhodamine Red	560 nm	580 nm	Orange
TAMRA	560nm	582nm	Orange-Red
TAMRA (amidite,for STR)	560nm	582nm	Orange-Red
PET	556nm	595nm	Orange/Red
Texas Red-X	583nm	603nm	Orange/Red
ROX	587nm	607nm	Orange/Red
CY5	649nm	662nm	Red

Alexa Fluor 系列染料光谱特性:

荧光基团	最大激发波长	最大发射波长	Emission color*
Alexa Fluor® 350	346	442	Blue
Alexa Fluor® 405	401	421	Blue
Alexa Fluor® 430	433	541	Green/Yellow
Alexa Fluor® 488	496	519	Green
Alexa Fluor® 532	532	553	Yellow
Alexa Fluor® 546	556	573	Orange
Alexa Fluor® 555	555	565	Orange
Alexa Fluor® 568	578	603	Orange/Red
Alexa Fluor® 594	590	617	Red
Alexa Fluor® 610	612	628	Red
Alexa Fluor® 633	632	647	Far Red
Alexa Fluor® 635	633	647	Far Red
Alexa Fluor® 647	650	665	Near-IR***
Alexa Fluor® 660	663	690	Near-IR***
Alexa Fluor® 680	679	702	Near-IR***
Alexa Fluor® 700	702	723	Near-IR***
Alexa Fluor® 750	749	775	Near-IR***
Alexa Fluor® 790	784	814	Near-IR***

*** Human vision is insensitive to light beyond ~650 nm; it is not possible to view near-IR fluorescent dyes.

荧光基团和淬灭基团适配选择建议：

荧光基团	最大激发波长	最大发射波长	发射光颜色	可选择的淬灭基团					
				BHQ1	BHQ2	BHQ3	QSY7	DABCYL	TAMRA
				480-580 (535)	550-650 (579)	620-730 (672)	500-600 (560)	380-550 (453)	470-560 (544)
AMCA	353nm	422nm						√	
FAM	494nm	518nm		√			√	√	√
TET	521nm	538nm		√			√	√	√
JOE	520nm	548nm		√			√	√	√
HEX	535nm	553nm		√			√	√	√
VIC	538nm	554nm		√			√	√	√
CY3	552nm	570nm			√		√		
NED	546nm	575nm			√		√		
Rhodamine Green	560 nm	580 nm			√		√		
Rhodamine Red	560 nm	580 nm			√		√		
TAMRA	560nm	582nm			√		√		
TAMRA (amidite, for STR)	560nm	582nm			√		√		
PET	556nm	595nm			√		√		
Texas Red-X	583nm	603nm			√				
ROX	587nm	607nm			√				
CY5	649nm	662nm			√	√			

Applied Biosystems qPCR 仪器可以选用的探针发光基团：

Applied Biosystems qPCR Instrument Filter	7000/7300	7500/7500fast	7900HT Fast (490-645nm 激光扫描)	ViiA™ 7
1 blue(470-520nm)	SYBR Green I,FAM	SYBR Green I,FAM		SYBR Green I,FAM
2 green(520-558nm)	VIC, JOE, TET, HEX	VIC, JOE, TET, HEX	SYBR Green I,FAM	VIC, JOE, TET, HEX
3 yellow(549-586nm)	NED, TAMRA, Cy3	NED, TAMRA, Cy3	NED, TAMRA, Cy3	ROX, Texas Red
4 orange(580-623nm)	ROX, Texas Red	ROX, Texas Red		
5 red (640-682nm)		CY5, LIZ		
6 deep red (662-711nm)				

专利产品 -MGB 探针

产品名称	5' 荧光基团	3' 淬灭基团	规格	* 运输状态	SKU
TaqMan TAMRA PROBE	FAM	TAMRA	10 nmol	您可以选择液体或粉末状运输。液体状态的探针，我们以固定的浓度 100uM 提供给您。您选择的规格，是我们最终产品的最低保证量。	45002501
TaqMan TAMRA PROBE	FAM	TAMRA	20 nmol		45002401
TaqMan TAMRA PROBE	FAM	TAMRA	50 nmol		45000301
TaqMan TAMRA PROBE	VIC	TAMRA	10 nmol		45002502
TaqMan TAMRA PROBE	VIC	TAMRA	20 nmol		45002402
TaqMan TAMRA PROBE	VIC	TAMRA	50 nmol		45000302
TaqMan MGB PROBE	FAM/VIC/NED	MGB	10 nmol	MGB 探针只提供液体状态的产品，浓度为 100uM。您选择的规格，是我们最终产品的最低保证量。	431603401
TaqMan MGB PROBE	FAM/VIC/NED	MGB	20 nmol		431603301
TaqMan MGB PROBE	FAM/VIC/NED	MGB	50 nmol		431603201

TaqMan™ 探针可分为两种类型：MGB 和非 MGB。第一款 TaqMan™ 探针属于“非 MGB”。它们采用 TAMRA™ 染料作为淬灭剂。但对于很多遗传复杂性较高的应用领域，如真核基因表达和单核苷酸多态 (Singlenucleotide polymorphisms, SNP)，则需要更高的特异性。

TaqMan™ MGB 探针的 3' 端带有小沟结合物 (MGB) 分子，提高了熔解温度。探针与靶点能在更高的温度下，与靶点更特异地结合。TaqMan™ MGB 探针更短，一个碱基的错配对其结合的影响更大。由于 TaqMan™ MGB 探针具有更高的特异性，因此其被推荐用于大多数遗传复杂性高的应用领域。

多重 qPCR 染料组合推荐

Applied biosystems qPCR Instrument	Number of Filters and Dyes Available	Passive Reference Dye	Dyes Available for Multiplexing			
StepOne™	3	ROX™	FAM™	VIC™		
StepOnePlus™	4	ROX™	FAM™	VIC™	NED™	
7300	4	ROX™	FAM™	VIC™	NED™	
7900HT Fast	4	ROX™	FAM™	VIC™	NED™	
7500/7500 Fast	5	ROX™	FAM™	VIC™	NED™	CY5
ViiA™ 7	6	ROX™	FAM™	VIC™	NED™	CY5
QuantStudio™ 12K Flex	6	ROX™	FAM™	VIC™	NED™	CY5
QuantStudio™ 6 Flex	5	ROX™	FAM™	VIC™	NED™	CY5
QuantStudio™ 7 Flex	6	ROX™	FAM™	VIC™	NED™	CY5
QuantStudio™ 3	4	ROX™	FAM™	VIC™	NED™	CY5
QuantStudio™ 5 (96 well block)	6	ROX™	FAM™	VIC™	NED™	CY5
QuantStudio™ 5 (384 well block)	5	ROX™	FAM™	VIC™	NED™	CY5

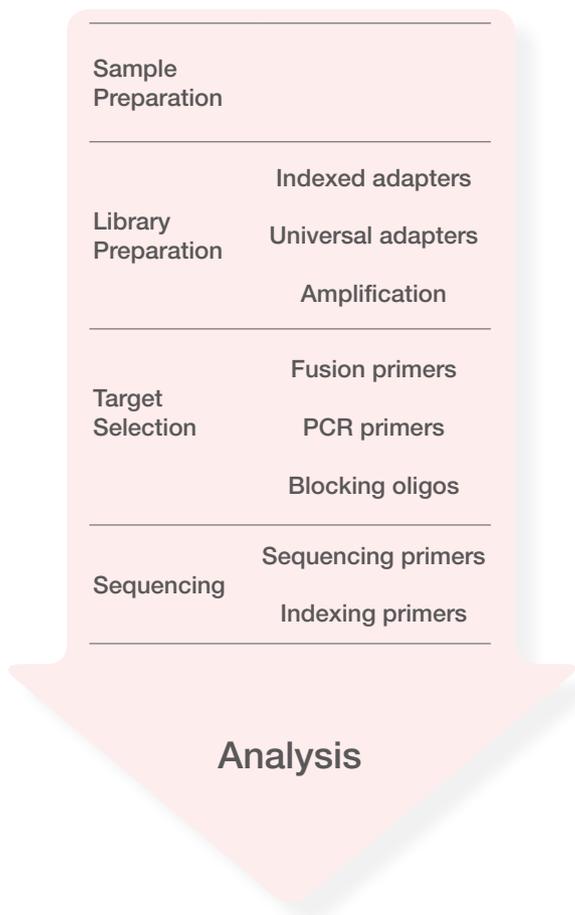
备注：在多重 qPCR 反应中，MGB 探针最多使用两重。

用于二代测序探针的荧光染料修饰引物

Let Invitrogen DNA Oligos serve you for Next Generation Sequencing

- 合成符合您工作流程的定制条形码，让您处理更多样品
- 提供多种合成规格，灵活性更高
- 专注于您的研究，让我们处理实验材料补给
- 直接从全球最大的制造企业之一获得供货，更高的可控性

工艺流程



产品规格

Product Category	Recommended Purification	Common Modifications	Suitable Applications
Indexed adapters	HPLC or PAGE	5'Phosphate Phosphorothiated DNA	Targeted sequencing DNA Seq RNA Seq
Universal adapters	HPLC or PAGE	5'Phosphate Phosphorothiated DNA	Targeted sequencing DNA Seq RNA Seq
Amplification primers	Std Desalt or HPLC	None	DNA Seq RNA Seq
Fusion primers	HPLC or PAGE	None	Amplicon sequencing
PCR primers	Std Desalt	None	Amplicon sequencing
Blocking oligos	HPLC or PAGE	3'ddC 3'C3-spacer deoxyinosine	Targeted sequencing via in-solution hybridization

寡核苷酸质量控制

Invitrogen 独特工艺的关键特性

- 作为国内最大的化学合成 DNA 专业公司之一，公司引入多种先进仪器，包括特有的合成仪、氨解仪、BIOTEK、高效液相仪、质谱仪和毛细管电泳仪等多种设备，为您的合成服务提供最高质量的保证。其中 BIOTEK 用于合成效率 100% 检测，帮助锁定合成效率低的引物；加强了在线控制能力，确保高质量引物流入下道工序。
- 与美国，日本及其他兄弟公司密切合作，运用飞行质谱（MALDI-TOF-MS）和电喷雾电离质谱（ESI-LC-MS）两种质谱仪对引物进行质量评估。MALDI-TOF 系统主要针对 50 碱基以下引物的分子量检测，简便快速，检测精度为 0.05%（10KD 差 5Da）；而 ESI-LC-MS 系统可用于分析各种引物的分子量大小，尤其针对长链引物；其检测精度为 0.01%（10KD 差 1Da），质谱检测能够查出引物中是否有缺失和突变。
- 我们的独特工艺包含分子量检测（MS），纯度检测（毛细管电泳 CE）和 OD 检测，确保寡核苷酸具有持续稳定的质量和准确的定量。

Invitrogen 流程的附加特性

- 根据在线和最终统计数据选择寡核苷酸进行检测，检测方法有毛细管电泳法（纯度），质谱法（分子量），高效液相仪法（纯度）来确认质量控制的连续性。
- 检测报告 (COA) 包含引物名称，合成规模，序列和长度，溶解温度（TM 值），总 OD 数， μg 和 nmole 数；以及根据您订购引物的准确序列（包含修饰基团）计算得到的分子量和消光系数。
- 每管引物贴有牢固的透明标签，方便客户观察内容物。
- 荧光修饰引物使用棕色塑料管包装，以保护光敏引物。
- 专业优秀的客户服务以及技术支持，为客户提供全方位的服务。

Invitrogen 网站在线设计和应用分析工具（Web Tool）

- 引物分析工具 Multiple Primer Analyzer
- OD 换算工具 Conversion Calculator for Nucleic Acids
- 双酶切和寻找酶切位点工具 Restriction digestion tools
- PCR, qPCR, cDNA 合成反应计算工具 Reaction setup calculators
- PCR 高保真酶反应保真性计算工具 PCR Fidelity Calculator
- 载体序列分析工具 REviewer - tools for sequence analysis
- DNA 模板量和拷贝数计算工具 DNA Copy Number and Dilution Calculator
- qPCR 扩增效率计算工具 qPCR Efficiency Calculator



扫描二维码进入工具

第三章 测序服务

毛细管测序服务 (一代测序)

我们拥有国际先进的测序仪器、科学技术及丰富的服务经验；具有从质量到周期，全方位、多角度的满足各种客户对不同层次测序要求的能力。公司将坚持为客户做到更好！我们可以接收菌株、质粒、PCR 产物等样品进行测序。我们的服务具有以下优势：

- 先进的设备：采用 ABI 3730xl 测序仪及配套的 BigDye Terminator 试剂盒，使测序达到最佳效果。
- 一流的质量：保证每个正常反应读取 800 碱基
- 精准的效率：收到样品 1~2 天出结果，通过在线系统实时下载结果。



选择要求

分类	具体要求
未纯化 PCR 产物	<ol style="list-style-type: none">1. 片段大于 150bp;2. 请提供 30-50μl PCR 扩增产物 (20ng/μl, 总量 >600ng), 取 3μl 样品, 应该能够清晰的分辨出目的条带
纯化后 PCR 产物	<ol style="list-style-type: none">1. PCR 产物溶于 ddH₂O 中 (请勿溶解在 TE 溶液中);2. 浓度大于 50ng/μl, 体积大于 10μl (仅限一个反应, 每增加一个反应, 多提供 5μl)3. 电泳检测条带专一
质粒	<ol style="list-style-type: none">1. 质粒溶于 ddH₂O 中 (请勿溶解在 TE 溶液中), 电泳检测浓度大于 50ng/μl; 体积大于 10μl (仅限一个反应, 每增加一个反应, 多提供 5μl);2. 建议用相关试剂盒提取质粒;3. 如有可能, 同时提供 1ml 含有相应质粒的菌液备用;4. 需注明载体和插入目的片段长度、以及测序要求。
菌液 (仅为大肠杆菌)	<ol style="list-style-type: none">1. 说明载体抗性类型, 我们提供氨苄青霉素、羧苄青霉素、卡那霉素、氯霉素、四环素抗生素; 其余类型抗生素需自备;2. 应为高拷贝质粒, 对于低拷贝质粒, 请直接提供纯化质粒 (浓度 300ng/μl, 其他满足质粒样品要求);3. 提供 >200μl 左右过夜培养 (12h) 的菌液, 于 Eppendorf 管中封口保存, 防止交叉污染或渗漏; (最好是 5ml 菌液, 这样我们更快处理您的样品);4. 大量样品测序, 建议在一次性塑料培养皿固体培养基上穿刺培养;
引物	<ol style="list-style-type: none">1. 浓度不低于 3.2pmol/μl, 溶液体积大于 10μl; (反应数多需多提供, 正常情况下, 按 2μl/ 个反应提供);2. 随机引物 (RAPD 引物) 和简并引物, 混合引物以及引物长度不足 17bp 不能用于测序;3. 引物长度一般在 18-23bp 比较适合测序, 特异性高;4. 尽可能提供引物全序列、PCR 退火温度, 以供参考。

测序常见问题解答：

常见问题	具体情况	可能的原因	处理办法	
样品准备问题	菌培养不好或失败	抗性不对	核对抗性，尽可能提供载体信息	
		培养条件特殊	提供 2μg 纯化质粒	
		菌液不新鲜	请提供新鲜菌液	
	质粒抽提失败	质粒拷贝数极低	客户自己采取大量提取的方法提供 2μg 纯化质粒。	
		片段很长		
自带质粒或已纯化 PCR 产物极低	是否为电泳法定量	质粒：电泳检测浓度大于 150ng/μl，体积大于 20μl。		
测序出现双峰或信号中断	双峰	重复序列，如 polyT、polyA 或几个碱基重复	用反向引物测互补链，通过拼接得到全长。	
		质粒测序在插入序列中出现套峰	可能是样品非单克隆，重新挑单克隆测序	
		PCR 产物测序中，某一点后序列变乱	可能是存在移码突变，这是正常的，也可以克隆后测序	
		PCR 产物中一个或多个位置有套峰	序列中存在突变，这是正常的，也可以克隆后进行测序	
		PCR 产物测序前部分双峰	引物二聚体污染或产物不纯，克隆后测序	
		质粒测序时整个结果双峰	引物特异性不好，序列中存在测序引物的同源序列；改用其他引物测序	
	信号迅速衰减或中断	模板二级结构区后	严重的重复结构	测反向互补序列
			模板质量差	重新提供菌液或纯化 PCR 产物
		信号极弱或无信号	质粒样品：引物不匹配	尽量提供载体详细信息，核查引物
			引物不适宜测序	测序引物比 PCR 引物要求高，随机引物和简并引物不能用于测序，较长的 PCR 引物也不能用于测序。重新设计引物测序。对 PCR 产物而言建议克隆到载体上用通用引物进行测序。
测序结果正常，与预期不符	找不到引物	模板量不足	重新提供足够的模板量	
		质粒模板	检测是否为空载体， T 载体插入没有方向性，互补链查找 测序引物选择位置错误，没有测到正确位置	
		PCR 模板	克隆位点离测序引物太近，因荧光干扰损失了测序引物后 20-30bp 长插入片段未测通 长片段由于没有测通，无法找到引物序列 因为荧光干扰原因，测序结果中无法找到测序引物 小于 800bp 的 PCR 产物，可以找到另一端的 PCR 引物互补序列	
	结果完全不对	请提供详细资料我们会根据结果具体分析。		
	测序方向不对	T 载体，没有方向性		
		pMD18-T 系列，pUC 系列等正方向引物可能会与客户认为的方向有出入，这些载体的引物客户需要准确填写，不能只写正向或者反向测序		

第四章 基因合成

1. 常规基因合成

特点

- 技术平台: Invitrogen DNA Oligo 合成; Invitrogen PCR 产品; GeneArt geneOptimizer™ 技术
- 序列优化服务: 可以利用 geneOptimizer™ 技术对基因序列进行优化, 包括密码子选择、GC 含量优化、RNA 二级结构优化等等, 极大程度地提高了目的基因的表达
- 根据客户下游的应用, 免费提供基因的设计方案, 包括酶切位点的设计, 载体的克隆方案等。
- 对于较长的片段或基因结构较复杂的片段 (含有重复序列, 高 GC 含量, 强发夹结构, 连续单一碱基重复等序列), 采用 Invitrogen 特有的合成策略, 为您取得最佳的结果

原理

所谓基因合成就是不用模板, 而是以一系列相互 overlapping 的引物进行“组装”, 最后得到完整的目的基因。这适用于克隆一些找不到模板的基因或者在克隆过程中进行稀有密码子的替换、氨基酸的突变等等。



服务流程

- 1) 我们将对您需要合成的基因全序列进行分析, 检查基因内部是否含有重复序列和复杂的二级结构。根据序列的难易程度准备方案并通过销售员给您报价。
- 2) 在得到您认可后我们将立即进行单链 Oligo DNA 的设计及合成、片段拼接等工作, 然后把全长序列克隆于载体中, 再通过 DNA 测序验证合成片段的正确性。
- 3) 测序结果如果发现有错误位点, 我们会采取相应的技术手段进行修复, 保证整个序列的正确性。

客户提供

提供所要合成的基因序列; 如果您需要克隆于特定载体中, 请提供该特定载体及相关信息 (客户所提供的载体必须经过明确地测序验证)

我们提供

提供克隆有全长基因的质粒、菌株、测序的原始文件。

质量保证

保证所合成的基因序列 100% 准确

货号	基因长度
KB010502V2	GENE SYNTHESIS 1~700BP
KB010504V2	GENE SYNTHESIS 701~1300BP
KB010506V2	GENE SYNTHESIS 1300~1900BP
KB010508V2	GENE SYNTHESIS 1901~2500BP
KB010510V2	GENE SYNTHESIS 2501~3100BP
KB010512V2	GENE SYNTHESIS 3101~3700BP
KB010503V2	GENE SYNTHESIS PLUS-KB

2. GeneArt- 基因合成及相关服务

GeneArt™- 您的基因合成与蛋白质制备服务伙伴

rogen DNA Oligo 合德国雷根斯堡是 GeneArt™ 品牌的诞生地；GeneArt 是全球合成市场的领跑者，是合成生物学领域的专家，生产世界级的合成基因；GeneArt 基因合成最经济高效、且省时省力，可获得几乎任何目的 DNA 重组载体，从时间和成本节省、表达性能、稳定性和质量等许多方面都优于传统的分子生物学技术。

GeneArt 基因合成工具除了超越传统合成外，还可以：

- 利用 GeneOptimizer™ 专利技术改善蛋白表达
- 获得难以克隆的重组载体，获得长链、复杂 DNA 及定制载体
- 构建无数突变体，用于筛查实验
- 序列准确，避免 RNAi 失活
- 改造蛋白质，提高酶活性，对抗体进行人源化改造并 / 或增加抗体结合的亲和力

质量

- 所有过程均经过 ISO 9001:2008 质量认证
- 包括全面的质量文件
- 全部生产过程均高度自动化

SuperSPEED 基因合成服务

- 5 个工作日多达 1,200bp
- 7 个工作日多达 1,800bp
- 根据要求提供紧急基因合成
- 生产地在德国，物流时间根据收货地点各异

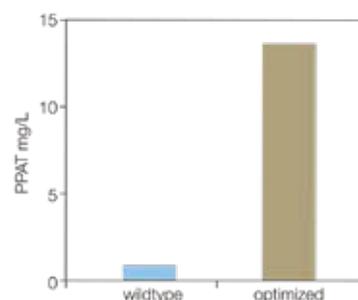


图 1. GeneOptimizerR 大肠杆菌表达优化。

性能

- 项目设计帮助和单个项目支持
- GeneOptimizer™ 序列优化工具 - 我们具专利的工业客户首选的优化算法，可保证获得最佳性能 (参见图 1)
- 最快的生产和全球供货速度；GeneAssembler™ 技术 - 全球唯一的工业化基因处理平台，可确保性能和可靠性 (参见图 2)

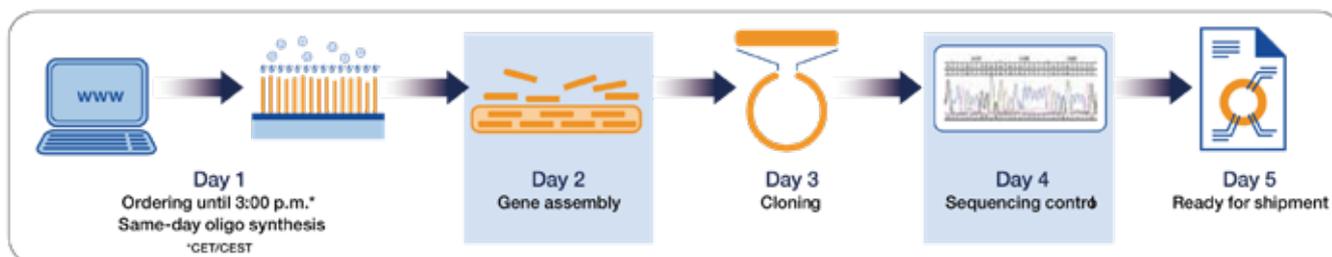


图 2. SuperSPEED 生产计划 - 可在五天内为您提供目的基因。

用于多参数基因优化的 GeneOptimizer 程序

利用基因优化，使蛋白表达量最大化

定制基因合成是指无需传统的克隆质粒即可设计 DNA。对研究人员而言同样重要的是，利用合成基因获得高产量的 mRNA 并最终生成蛋白质。我们开发出了 GeneOptimizer™ 软件，可实现在所有常用表达系统中合成基因表达的最大化。这是一款采用复杂算法的专利软件，该算法考虑到了单次操作的所有转录和翻译相关优化参数，并提供了符合您规格的 DNA 序列，可在您的系统中实现最高的性能 (图 1)。

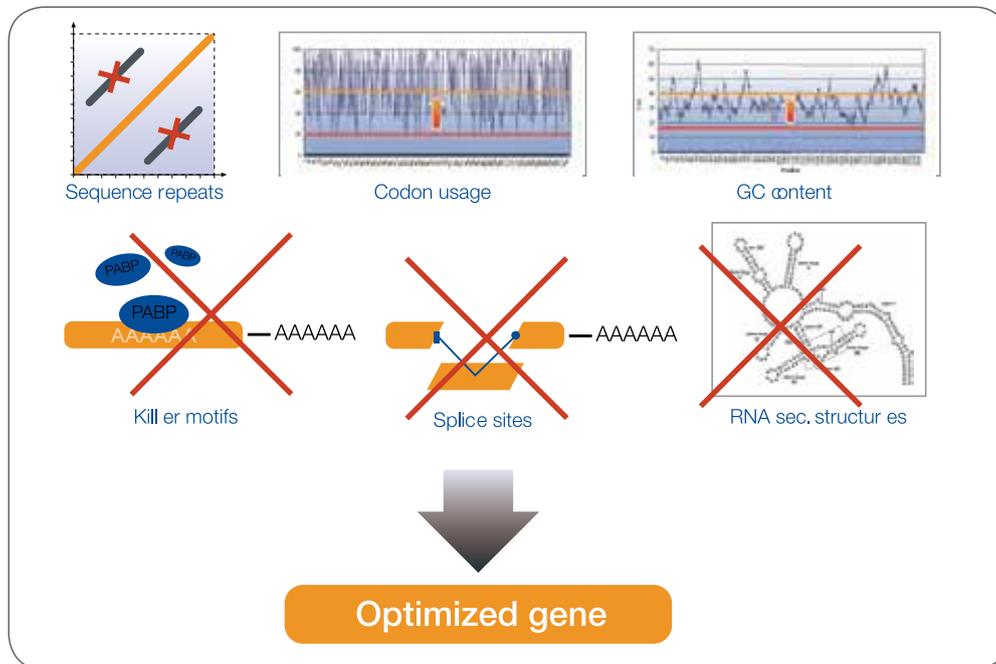


图 1. GeneOptimizer™ 软件工具优化序列，可最大程度实现转录 / 翻译。

我们的专利 GeneOptimizer™ 算法可以通过序列优化，提高蛋白产量 (图 2)。GeneOptimizer™ 技术通过同时评估多个重要的表达参数，以渐进方法生成多达 500,000 个不同的目的序列，并从中选择出最符合您特定要求的序列。

在您需要的时候选择 GeneOptimizer 技术：

- 内含子去除
- 去除潜在剪接位点和 RNA 不稳定序列元件，提高 RNA 稳定性
- 密码子优化和 G/C 核苷酸编校
- 大规模突变
- 功能结构域的灵活组合
- 引入限制性酶切位点
- 表位改组
- 审核免疫调节性 CpG 基序

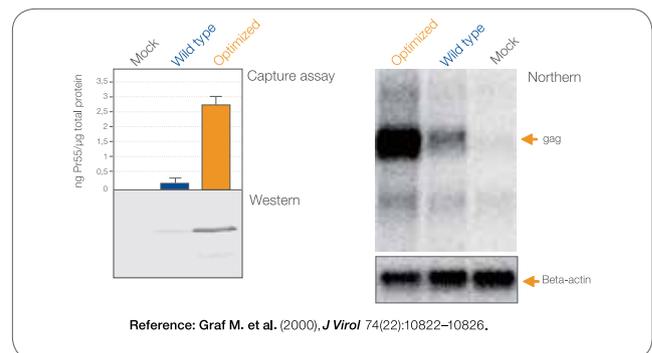
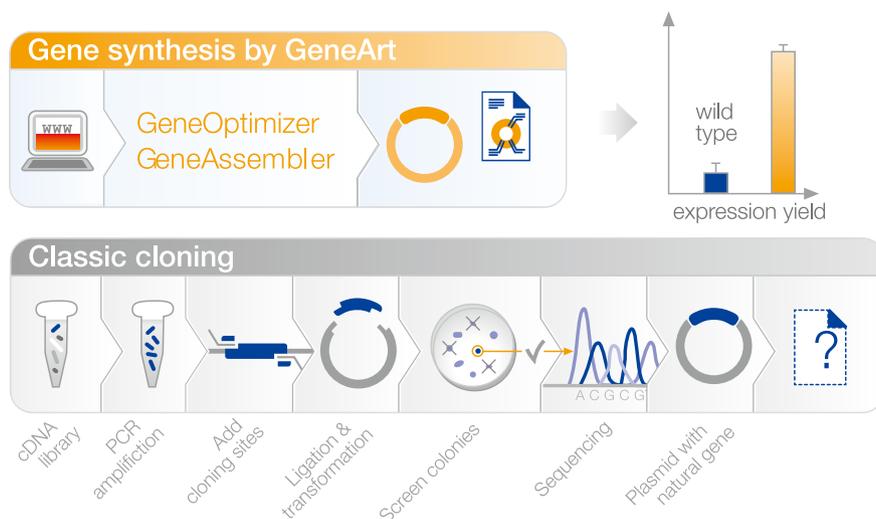


图 2. 采用 GeneArt™ GeneOptimizer™ 过程进行序列优化大大提高了表达量。

2.1. GeneArt 基因合成服务

无论您是克隆领域的初学者，亦或是想要节省时间，GeneArt™ 基因合成服务均可帮助您更快地从规划阶段迈向实验。GeneArt™ 已成功生产出超过 180,000 种重组载体，客户覆盖面极广，包括大型制药公司、生物技术公司及基础研究机构。下图的比较显示，与传统克隆技术相比，采用 GeneArt™ 基因合成方法可节省时间和精力。



GeneArt 基因合成的优点

- **灵活的定制流程：**在您选择的载体中获得您所需要的序列 - 包括难以构建的复杂重组载体和定制载体。
 - **最大程度提高蛋白质产量：**利用 GeneOptimizer™ 软件进行可选的序列加工，生成 mRNA 稳定性和翻译效率更高的序列变体。
 - **快速合成和组装：**标准实验周期少至 10 个工作日 (取决于序列长度)。我们还可提供加速方案。
 - **出色的准确度：**作为 ISO 9001:2008- 认证的质量管理体系的一部分，所有定制合成基因均经过测序；我们只提供具有序列同源性的重组载体。
 - **经济和高效率：**GeneArt™ 基因合成服务的成本不比购买基因合成所需的寡核苷酸和分子生物学试剂费用高。这有待您的决策。
- 将基因合成和克隆过程外包出去，可节省时间和劳动力，这样您就可以专注于您的研究。
 - 客户提交的 DNA 序列由科学家团队设计，包括 / 排除所需的限制性酶切位点和翻译元件，还可以利用 GeneOptimizer™ 软件进行优化，最大程度提高蛋白质的产量。
 - 在公司内部合成具有最高的序列准确度的寡核苷酸，用作定制基因合成的组块。
 - 采用 GeneAssembler™ 流程组装基因，简化了工业级的高通量基因组，实现了快速订购。
 - 每个重组体附有详细的合成报告，包括质粒图谱、序列比对和限制酶图谱。



我们提供

- GeneArt™ 基因合成服务包括几乎任何遗传序列的化学合成、克隆和序列验证。
- 您将收到穿刺菌和 / 或含有合成基因的纯化质粒 - 可立即用于下游应用领域。
- 标准和复杂基因合成 / 快速合成服务

2.2. GeneArt Strings DNA Fragments

GeneArt™ Strings™ DNA Fragments 是一种传统基因合成产品的替代品，快速且经济实惠，可在 5–7 天内可靠地提供定制双链 DNA，直接克隆至载体中。

特点：

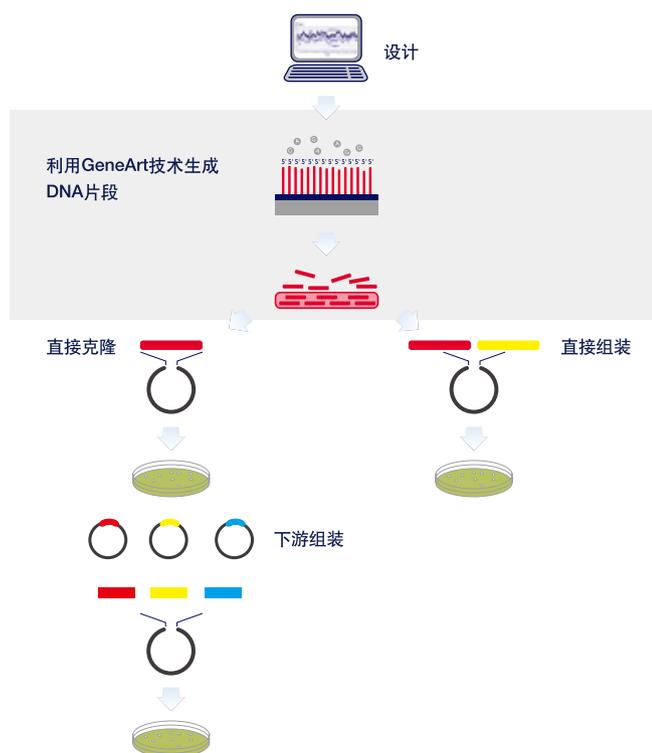
- 快速：GeneArt™ Strings™ DNA Fragments 可提供至多 1,000bp 的片段，在 5 个工作日内生成，物流时间根据收货地点各异
- 灵活：在我们的在线门户中输入您的序列，并直接编辑、优化：GeneArt™ 优化软件可以避免减缓其他合成方法的复杂问题
- 经济实惠：如果您的基因长达 1,000 bp，或者需要订购多个片段组装成较长的基因，GeneArt™ Strings™ DNA Fragments 片段是一种经济高效的基因合成替代品



产品	生产时间	价格 (RMB)
GeneArt Strings DNA 100–600 bp	5 个工作日	980
GeneArt Strings DNA 601–750 bp	5 个工作日	1277
GeneArt Strings DNA 751–1,000 bp	5 个工作日	1475

GeneArt Strings DNA Fragments 订购流程

您可以从我们的 GeneArt 客服邮箱 CN-GenArtOrder@thermofisher.com 索取订购表，然后将填好的表格发送至该邮箱，我们会与德国生产部门进行沟通，及时将服务信息回复给您。



更多信息，请登录 thermofisher.com/genartstrings

服务流程

客户提供

首先确定克隆系统，然后根据各自的要求设计 GeneArt™ Strings™ DNA Fragments 片段序列。根据您的目标克隆系统，您需要对序列的 5' 和 3' 端进行修饰，使之正确地插入目标载体（如添加限制性位点和所需的缓冲液核苷酸，用于常规的限制性克隆）中。

交付产品及储存

GeneArt™ Strings™ DNA Fragments 交付时为干燥产品，可重悬后直接使用。为实现长期储存，重悬的 GeneArt™ Strings™ DNA Fragments 片段应分装并置于 -20°C 冻存。请勿反复冻融。

技术和品质

GeneArt™ Strings™ DNA Fragments 采用与 GeneArt™ 基因合成同样可靠的技术生产。GeneArt™ Strings™ DNA Fragments 可提供至多 1,000 bp 的长度。

GeneArt™ Strings™ DNA Fragments 采用大规模测序，以确认您的目标基因具有高表达水平。如果您测序 4–8 个集落，则鉴别出正确克隆的几率 >90%。

GeneArt Strings DNA Fragments 的组装

我们推荐采用 GeneArt™ 无缝克隆与组装试剂盒组装 GeneArt™ Strings™ DNA Fragments 片段。在室温下，只需不到 30 分钟即可组装至多 4 个克隆片段。请登录网站，进一步了解有关组装方法的提示；

2.3. GeneArt 定向进化服务

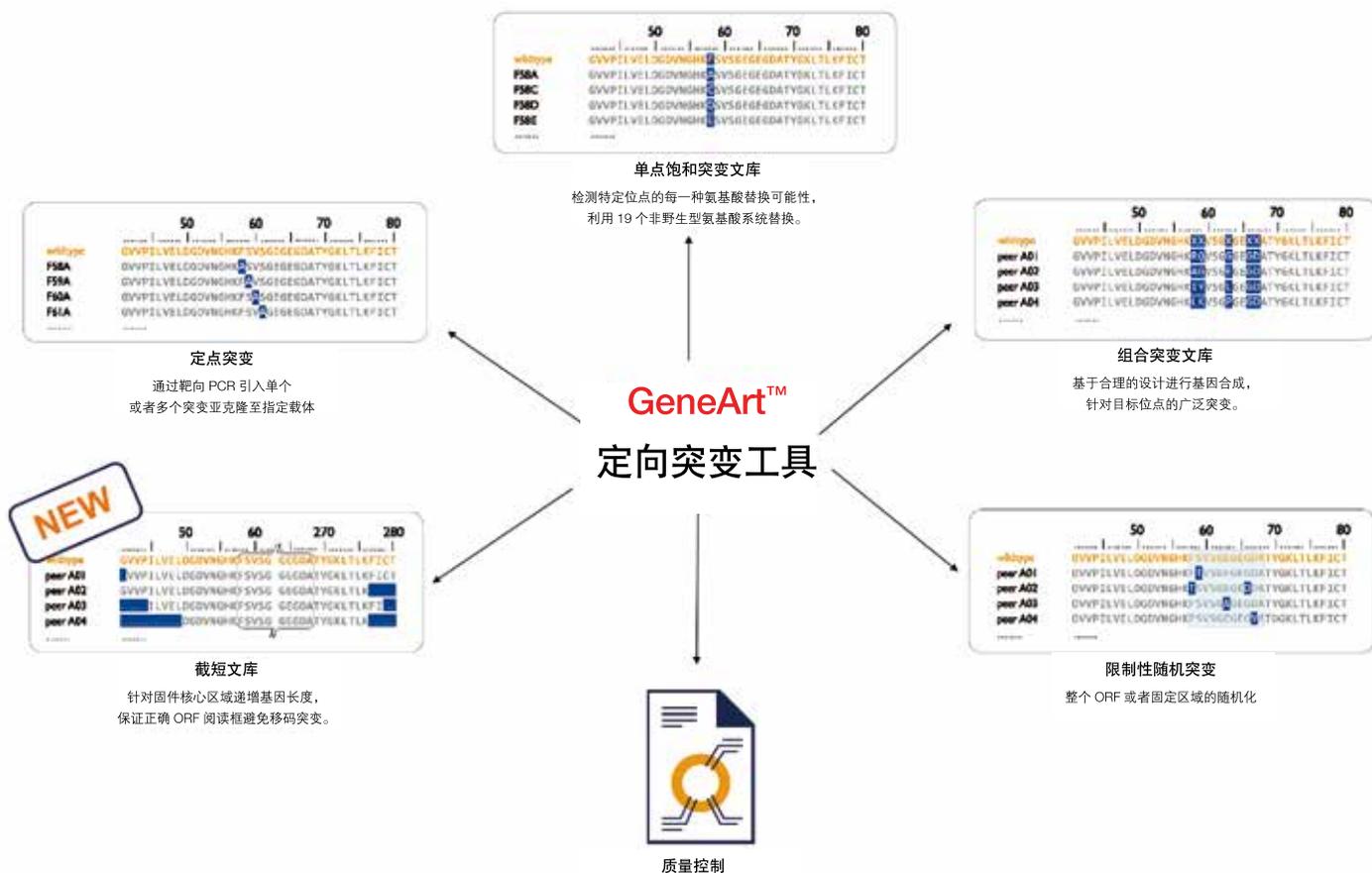
体外分子进化策略 被认为是生产具有改良或全新特性的蛋白质和调控序列的最高效方法。GeneArt™ 定向进化服务提供了各种不同的方法形成基因变异。将我们的定向进化技术与适当的筛选技术配合使用，可以创造出基因多样性，从而获得具有所需特性的蛋白质。合成变异体文库可帮助您更快地查找蛋白质

GeneArt 定向进化服务的主要特点

- 获得采用传统突变方法无法获得的基因变异型
- 在非突变区域具有最大的序列完整性，在您希望的区域获得最多的变异型，且插入片段大小最大化
- 提高了获得有用变异型的可能性
- 大多数服务产品不需要 DNA 模板：利用您的序列信息合成 DNA
- 完全掌控文库的每个重要特性：创造合理的多样性，获得最佳效果
- 与传统突变方法相比，大大减少了筛选任务

服务内容

- GeneArt™ 组合文库：适用于目标变异的引入，同时保持框架的最大完整性。
- GeneArt™ 突变服务：利用基于 PCR 的方法快速、经济地完成现有 DNA 模板的诱变
- GeneArt™ 定点饱和突变：系统诱变，利用系统诱变置换特定位点的野生型密码子，生成各种 19 个非野生型氨基酸。
- GeneArt™ 随机对照服务：随机置换，利用先进技术，在您指定的基因区域，引入您要求频率的无偏差随机突变。诱变整个 ORF 或者将变异局限于所选区域 (至多 1011 种变异体)
- GeneArt™ 截短文库：无移码截短，客户自定义的截短，包括 5' 和 3' 同时缺失，不引起移码突变。



2.4. GeneArt 细胞系和蛋白质服务

GeneArt™ 细胞系和蛋白质服务可以简化哺乳动物细胞系中的蛋白质表达。该过程的每个步骤我们都可以为您提供帮助，包括基因设计、合成、克隆、蛋白质生产甚至稳定细胞系的建立。或者，我们亦可只针对您需要的部分提供帮助。

针对哺乳动物细胞中的高产量的蛋白生产，我们可提供下列服务和优势：

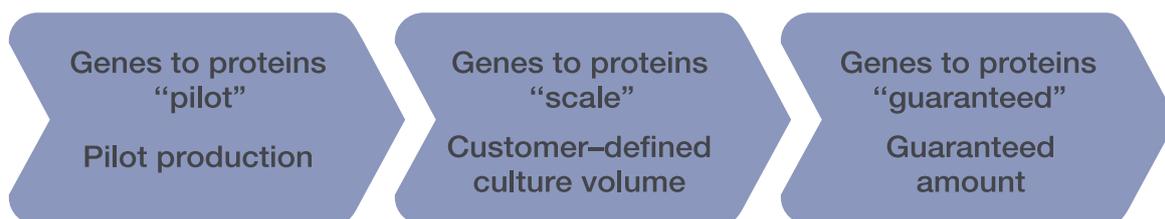
通过基因优化改善蛋白表达

从基因到表达：确认您的转染细胞系可以产生蛋白质，识别最佳优化基因，或者查找最佳基因变异体，满足您的蛋白生产需要。



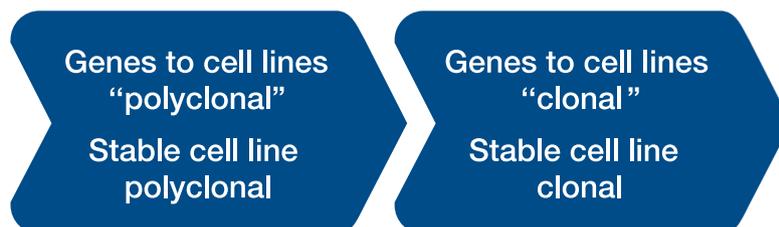
从哺乳动物细胞系中快速、可靠地生产蛋白质

从基因到蛋白：从瞬时转染的细胞系中生产蛋白质。



具有稳定蛋白表达的高性能细胞系的构建

从基因到细胞系：表达目的蛋白的克隆或未克隆的稳定细胞系的构建。



我们的特色系统

GeneArt 蛋白表达服务

- 从 FreeStyle™ 或 Bac-to-Bac™ 蛋白表达系统进行快速而可靠的蛋白表达及纯化；
- 通过优化基因而得到可靠的高效蛋白表达；
- 便利：直接联系 tech-service@thermofisher.com，或者将您的项目详情发送给 geneartprotein@thermofisher.com

GeneArt 细胞系服务

- 基于现有的宿主细胞系进行稳定可诱导表达的细胞系开发；
- 可以选择 Flp-In™, T-REx™, Freedom™ DG44™ 系统
- 整合基因优化后的基因，保证更高的表达量。

更多信息，请登录 thermofisher.com/geneart

附录

引物常见问题解答

1. 怎样按照使用浓度溶解引物？

了解以下几个参数：

- 1OD 引物干粉约为 33 微克；
- 碱基的平均分子量为 324.5；
- 引物的分子量 = 碱基数 × 碱基的平均分子量；
- 引物的摩尔数 = 质量数 / 引物分子量

举例：如果您拿到一管标明为 2OD 的 20 碱基的引物，分子量 = $20 \times 324.5 = 6490$ 质量数 = $2 \times 33 = 66\mu\text{g}$ 摩尔数 = $66 / 6490 = 0.010 \mu\text{mol} = 10 \text{ nmol}$ 若您需要溶解为 $10\mu\text{M}$ ($=10\text{pmol}/\mu\text{l}$) 的溶液，只需加 1ml ddH₂O 充分溶解即可。

同时请您注意：真空干燥的 DNA 呈干膜状或粉末状在离心管底部，开启瓶盖时小心不要丢失；请加入足量的水充分振荡溶解。

2. 引物 (含修饰) 的分子量是如何确定的？

非修饰的引物的 Molecular Weight 在随引物提供的报告单上都有明确的标示。如果需要估计一个引物的分子量按每个碱基的平均分子量为 324.5，引物的分子量 = 碱基数 × 碱基的平均分子量。

或按下列公式计算 $MW = (NA * WA) + (NC * WC) + (NG * WG) + (NT * WT) + (N_{\text{mod}} * W_{\text{mod}}) + (N_x * W_x) + (N_i * W_i) + 16 * N_s - 62$ 。

NA, NG, NC, NT, Ni 分别为引物中碱基 A 或 G 或 C 或 T 或 I 的数量，WA, WC, WG, W, Wi 分别为引物中碱基 A 或 G 或 C 或 T 或 I 的分子量，Nmod, Wmod 分别为修饰基团的数目和分子量。

对于混合碱基的分子量为混合碱基的分子量总合除以混合数，例如 G+A 混合的分子量为 $(313.21 + 329.21) / 2 = 321.21$ 。Ns 为硫代数，硫代每个位置增加分子量 16。

常规碱基分子量	常规修饰基团	分子量	常规修饰基团	分子量
Base Molecular Weight	5'-Biotin	405.45	3'-TAMARA	623.60
A 313.21	5'-(6 FAM)	537.46	3'-Dabsyl	498.49
C 289.18	5'-HEX	744.13	3'-(6 FAM)	569.46
G 329.21	5'-TET	675.24	3'-Amino Modifier C3	153.07
T 304.19	5'-Cy5	533.63	3'-Amino Modifier C7	209.18
I 314.2	5'-Cy3	507.59	3'-Thiol Modifier C3	154.12
U 290.17				

3. 如何计算引物的 Tm 值？

引物设计软件都可以给出 Tm，引物长度，碱基组成，引物使用缓冲的离子强度有关。

长度为 25mer 以下的引物，Tm 计算公式为： $Tm = 4^{\circ}\text{C} (G + C) + 2^{\circ}\text{C} (A + T)$

对于更长的寡聚核苷酸，Tm 计算公式为： $Tm = 81.5 + 16.6 \times \text{Log}_{10}[\text{Na}^+] + 0.41 (\%GC) - 600/\text{size}$

公式中，Size = 引物长度。上下游引物的 Tm 值 (melting temperature) 是寡核苷酸的解链温度，即在一定盐浓度条件下，50% 寡核苷酸双链解链的温度。

DNA 合成常见问题解答

1. 如何保存引物?

我们提供的干粉 DNA 从有机溶剂中干燥出来, 无菌, 无核酸酶。可以室温或 -20°C 密闭长期保存; 溶解以后的 DNA 最好保存在 -20°C, 溶解引物的水的 PH 要求大于 7, 并且无菌。带有荧光标记的引物请注意避光保存。

2. 如何测定引物的 OD 值?

用紫外分光光度计在 260nm 波长测定溶液的光密度来定量。请注意紫外分光光度计的使用, 测定时溶液的光密度最好稀释到 0.2-0.8 之间。DNA 干粉用一定体积的水充分振荡溶解以后, 取部分溶液稀释到 1ml 并在 1ml 标准比色杯中测定其光密度, 即为所测体积的 OD 值, 进而可以计算出母液的 OD 值。

举例: 您拿到一管干粉的 DNA, 用 1ml 水溶解成母液, 取该母液 50 微升稀释成 1ml 并在 1ml 标准比色杯中测定的光密度为 0.25, 说明该 50 微升中含有 0.25OD 的 DNA, 也即说明原来 1ml 母液中含有 5OD 的 DNA。

3. 如何检测引物的纯度?

实验室方便的作法是用 PAGE 方法。使用加有 7M 尿素的 16% 的聚丙烯酰胺凝胶进行电泳。取 0.2-0.5OD 的引物, 用尿素饱和液溶解或引物溶液中加入尿素干粉直到饱和, 上样前加热变性 (95°C, 2min)。加入尿素的目的一是变性, 二是增加样品比重, 容易加样。600V 电压进行电泳, 一定时间后 (约 2-3 小时), 剥胶, 用荧光 TLC 板在紫外灯下检测带型, 在主带之下没有杂带, 说明纯度是好的。有时由于变性不充分, 主带之上可能会有条带, 乃是引物二级结构条带。

4. 为什么说用 EB 染色合成 DNA 片段来定量是不正确的?

通常可以用 EB 染色的方法来判断双链 DNA 的量 (如质粒 DNA), 是因为 EB 可以嵌合到双链 DNA 中。而合成的单链 DNA, 由于碱基组成不同, 形成二级结构的可能性不同, EB 的染色程度也会不同, 比如 Oligo (dT) 等不形成二级结构, EB 根本无法染色。所以不要用 EB 染色的方法来定量, 而用紫外分光光度计检测。同样道理, 用 EB 染色来拍照不适合所有引物。

5. Primer 设计的基本原则是什么?

- 引物长度一般在 18-35mer。
- G-C 含量控制在 40-60% 左右。
- 避免近 3' 端有酶切位点或发夹结构。
- 如果可能避免在 3' 端最后 5 个碱基有 2 个以上的 G 或 C。
- 如果可能避免在 3' 端最后 1 个碱基为 A。
- 避免连续相同碱基的出现, 特别是要避免 GGGG 或更多 G 出现。
- 退火温度 Tm 控制在 58-60°C 左右。
- 如果是设计点突变引物, 突变点应尽可能在引物的中间。

6. TaqMan 探针设计的基本原则是什么?

- TaqMan 探针位置尽可能靠近扩增引物 (扩增产物 50-150bp)
- 但不能与引物重叠。
- 长度一般为 18-40mer。
- G-C 含量控制在 40-80% 左右。
- 避免连续相同碱基的出现, 特别是要避免 GGGG 或更多 G 出现。
- 在引物的 5' 端避免使用 G。
- 选用比较多的碱基 C。
- 退火温度 Tm 控制在 68-70°C 左右。

常见荧光修饰的波长及颜色

荧光基团	最大激发波长	最大发射波长	Emission color*
AMCA	353nm	422nm	Blue
FAM	494nm	518nm	Green
TET	521nm	538nm	Green-Yellow
JOE	520nm	548nm	Green-Yellow
HEX	535nm	553nm	Yellow
VIC	538nm	554nm	Yellow
CY3	552nm	570nm	Orange
NED	546nm	575nm	Orange
Rhodamine Green	560 nm	580 nm	Orange
Rhodamine Red	560 nm	580 nm	Orange
TAMRA	560nm	582nm	Orange-Red
TAMRA (amidite,for STR)	560nm	582nm	Orange-Red
PET	556nm	595nm	Orange/Red
Texas Red-X	583nm	603nm	Orange/Red
ROX	587nm	607nm	Orange/Red
CY5	649nm	662nm	Red

发光基团与淬灭基团如何搭配

淬灭基团种类	发光报告基团种类
BHQ1	FAM,TET,JOE,HEX,VIC
BHQ2	CY3,NED, Rhodamine Green, Rhodamine Red, TAMRA,PET, Texas Red-X,ROX,CY5
BHQ3	CY5
QSY7	FAM,TET,JOE,HEX,VIC,CY3,NED, Rhodamine Green, Rhodamine Red, TAMRA,PET,
DABCYL	AMCA,FAM,TET,JOE,HEX,VIC
TAMRA	FAM,TET,JOE,HEX,VIC



赛默飞
官方微信



赛默飞
生命科学官方微信

免费服务电话：800 820 8982/400 820 8982
 销售服务信箱：sales.china@thermofisher.com
 技术咨询信箱：LifeScience-CNTS@thermofisher.com

ThermoFisher
SCIENTIFIC