

invitrogen



Invitrogen 合成生物学服务产品手册

- 高品质引物和探针

ThermoFisher
SCIENTIFIC

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和生物工厂，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获取能源、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。我们致力于为科研人员提供卓越的技术和解决方案。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 认证
- ISO 13485 认证
- 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，服务内容包括引物合成和探针合成。苏州、北京和广州工厂均获得 ISO 9001 认证，其中苏州工厂另有 ISO 14000 认证。



我们有多样化的仪器：

- 25+ 台 Jurassics 合成仪
- 3 台 Applied Biosystems 3900 合成仪
- 3 台 Mermade12 高通量合成仪
- 1 台 AKTA 大规格合成仪
- 5 台 LCMS 质检仪器
- 1 台 Agilent 96CE PRO II
- 15+ 台 HPLC 纯化仪

满足不同类型的应用需求：

- PCR
- qPCR
- 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	8
第三章 附 1: 引物常见问题解答	13
附 2: 荧光基团选择	15

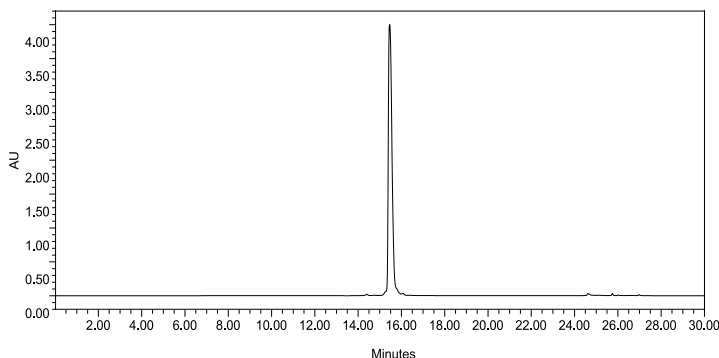


第一章 引物合成

Invitrogen 合成服务

- 源头保障 — 重要关键合成原料使用进口高品质产品，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 — 经典高效高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 是中国引物合成业内拥有多台毛细管电泳仪并将其应用到产品质量检测中的公司，其检测精度可达 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%

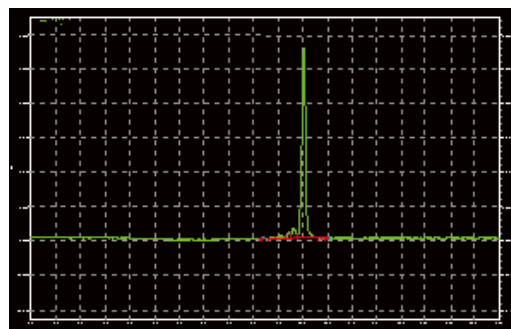
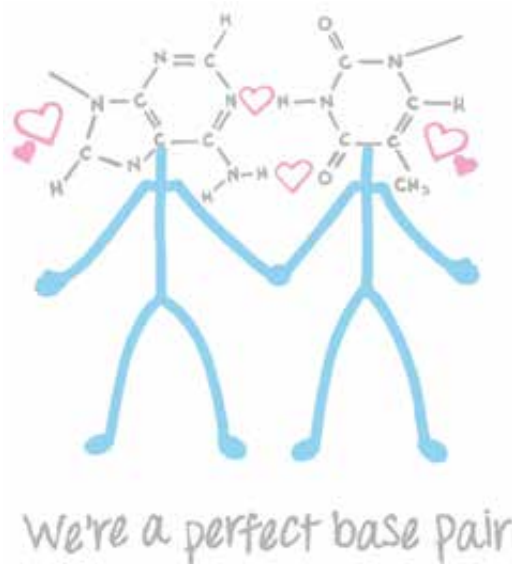


图 A 及图 B 说明：同一引物使用 HPLC 分析显示主峰面积比 96.87%，而用 CE 分析只有 89.61%。HPLC 图谱中看似单一的峰形，在 CE 分析图中则显示仍然有部分杂峰存在，因此使用 CE 毛细管电泳仪对合成的引物进行质量检测，能保证引物的更高品质。一个 HPLC 鉴定纯度为 95% 的 20 个碱基的引物 (图 A)，CE 结果往往仅有 88% 左右 (图 B)，因此，CE 的分辨率远高于 HPLC 和 PAGE 分析胶。

- 独特质检工艺 — 采用 Trityl 在线监控和 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。



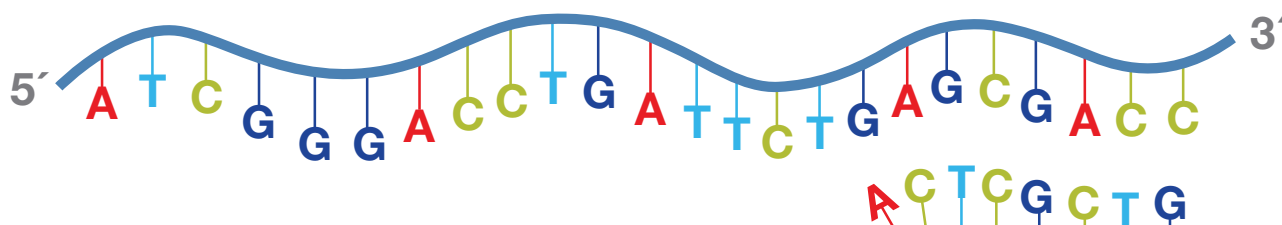
普通引物

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	1OD 起	6-99 bp	80 bp 之内
COP/TON/iPAGE	1OD 起	15-45 bp	45 bp 之内
PAGE	1OD 起	15-99 bp	80 bp 之内
HPLC	1OD 起	6-50 bp	50 bp 之内

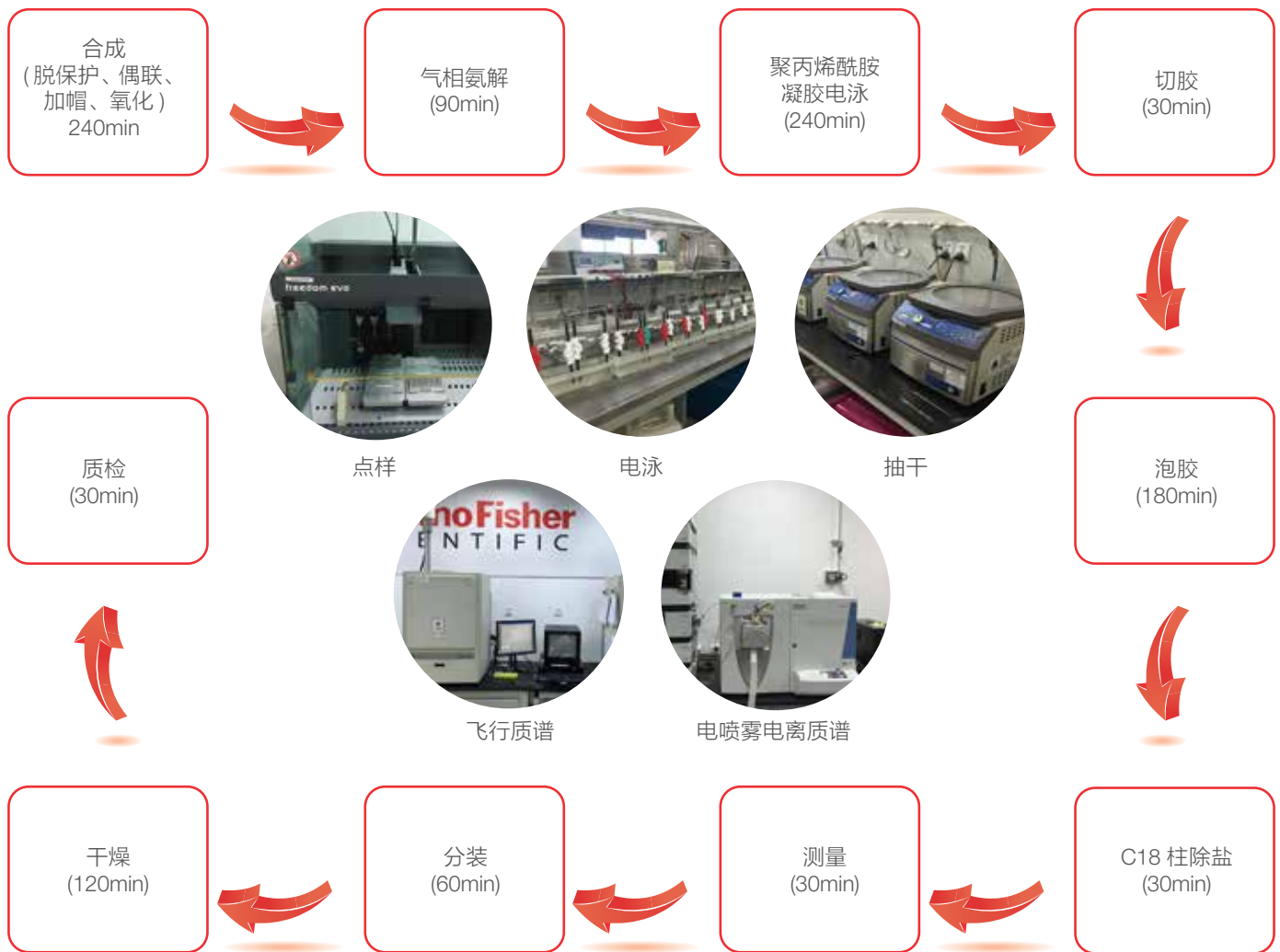
备注：荧光修饰引物合成范围及质控范围请额外询问本公司。



应用推荐

应用	建议纯化方法 (可保证应用所需纯度)
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)
含 5' 端关键序列 (如限制性酶切位点) 的 PCR 引物	高亲和纯化 (COP/TON/iPAGE)
指定位点突变	高亲和纯化 (COP/TON/iPAGE)
合成文库时的第一条链 cDNA 合成	高亲和纯化 (COP/TON/iPAGE)
合成克隆接头	高亲和纯化 (COP/TON/iPAGE)
凝胶迁移分析	高亲和纯化 (COP/TON/iPAGE)
GeneTrapper 筛选	PAGE
用于克隆表达研究或基因重组等的 PCR 产物	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	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/TON/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' 修饰和中间修饰的多种修饰引物合成服务。

修饰	代码	5' 修饰	3' 修饰	中间修饰	优先推荐纯化方式		
					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。

***Hydroxymethyl-dC: 该修饰所需生产周期请额外询问本公司。

****Phosphorylation and Phosphorothioates : 代表磷酸化和硫代修饰。

氨基修饰 (AMN, AMB)

中间氨基修饰

主要用 C6-dT aminolinker 加到胸腺嘧啶残基上来进行中间修饰。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，广泛应用在 DNA 芯片(DNA Microarray)和多重标记诊断系统中。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

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

生物素 (BIO)

生物素修饰的寡核苷酸能紧紧地结合在链霉亲和素蛋白上，链霉亲和素蛋白可以标记荧光染料和酶或作为附着的中间结合物附着在固相表面。生物素标记技术应用广泛，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。

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制作巯基连接的荧光探针。5' 巯基修饰主要用 5' 巯基修饰单体 (5'-Thiol-Modifier C6-CE Phosphoramidite 或 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使双链熔点温度增加 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 MedC 可以用于杂交反应实验中。此外，还可用于增强 PCR 引物的结合能力和反义寡核苷酸以及 DNA 甲基化研究等。

双脱氧 (ddC)

此种碱基主要用于两类实验，一类是 PCR 反应中阻止 3' 端的链延伸如 microarray 实验。另一类是在 miRNA 文库构建过程中，阻止 3' 端 5'-adenylated oligos 作为接头进行自连或者彼此连接。

羟甲基化 (Hydroxymethyl-dC)

此种碱基主要用于 DNA 去甲基化研究。

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。在可抗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)

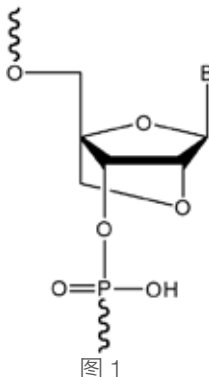
硫代修饰的寡核苷酸主要用于反义实验中防止被核酸酶降解。您可以选择全硫代，但随着硫代碱基的增加，寡核苷酸的 Tm 值会降低，为了降低这种影响，可以对引物两端 2-5 个碱基进行硫代修饰，通常可以选择 5' 和 3' 各 3 个碱基进行硫代修饰。

间臂 (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 引进一个间臂，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' 羟基间的三碳间隔，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。

锁核苷酸 (LNA)

常见的 LNA 共有四类，其对应修饰在 Oligo 中的结构参见图 1，这四类主要区别在于该结构中的 B (Base) 基团可以分别为 A、T、G、C。LNA 修饰引物适用于常规 DNA 引物的固相亚磷酰胺三酯法合成，该化学合成是从脱氧核苷酸单体的 3' 端向 5' 端合成。此过程由无数个循环构成，每个循环会在固相载体上镶嵌一个脱氧核苷酸，LNA 作为一种修饰后的核苷酸单体参与常规 DNA 单体的序列中。



特点

- 技术平台：使用自动化 DNA 引物合成仪进行化学合成，经聚丙烯酰胺凝胶电泳或 HPLC 纯化，自动化分装，使用 LCMS、CE、HPLC 等多种检测仪器质检
- 可接受引物序列中任意位置任意数量的 LNA 修饰，多环节严格质量监测，确保引物质量

- 可提供大规模制备

客户提供

- 1) 引物序列信息
- 2) LNA 修饰类型（包括 LNA-A、LNA-C、LNA-G、LNA-T）以及修饰位点
- 3) 需要的纯化方式（包括 PAGE、HPLC）
- 4) 技术要求（包括 OD 值或 nmol 量、纯度、是否 NGS）

服务流程

- 1) 将客户提供的序列信息、修饰类型以及修饰位点转译成合成代码的格式
- 2) 生产部门收到序列和代码等信息，进一步整理，完成合成氨解等工作
- 3) PAGE 或 HPLC 纯化后，经分光光度仪精确定量完成分装，离心抽干
- 4) 质量部门对合成引物进行 LCMS/HPLC/CE 等检测
- 5) 质检合格后包装发货

我们提供

长度 10-45 mer 的 LNA 修饰引物，45 mer 以上的 LNA 修饰引物需联系生产部门确认，产品性状为白色干粉或透明薄膜

质量保证

- 1) LCMS 检测分子量与理论分子量误差比例 $\leq 0.1\%$
- 2) PAGE、HPLC 纯化样品在 260nm 波长下 HPLC 检测纯度 $\geq 90\%$ ，254nm 波长下 CE 纯度 $\geq 85\%$

第二章 探针应用

用于基因表达和基因分型的荧光染料修饰引物

修饰	代码	5' 修饰	3' 修饰	中间修饰	优先推荐纯化方式		
					DSL	PAGE	HPLC
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。

除上述荧光染料外，我们还提供特色系列修饰染料，全面覆盖整个光谱区域。

修饰	代码	5' 修饰	3' 修饰	中间修饰	优先推荐纯化方式		
					DSL	PAGE	HPLC
Alexa Fluor 系列 (350/430)*	350/430	√	√	√ dT	N/A	N/A	√
Alexa Fluor 系列 (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® 系列 (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。

**BODIPY® 系列：该修饰系列生产周期请额外询问本公司。

我们同时有多种淬灭基团可供选择。

修饰	代码	5' 修饰	3' 修饰	中间修饰	优先推荐纯化方式		
					DSL	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	√

备注：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	发射光颜色 *
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	560nm	580nm	Orange
Rhodamine Red	560nm	580nm	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	发射光颜色 *
Alexa Fluor® 350	346nm	442nm	Blue
Alexa Fluor® 405	401nm	421nm	Blue
Alexa Fluor® 430	433nm	541nm	Green/Yellow
Alexa Fluor® 488	496nm	519nm	Green
Alexa Fluor® 532	532nm	553nm	Yellow
Alexa Fluor® 546	556nm	573nm	Orange
Alexa Fluor® 555	555nm	565nm	Orange
Alexa Fluor® 568	578nm	603nm	Orange/Red
Alexa Fluor® 594	590nm	617nm	Red
Alexa Fluor® 610	612nm	628nm	Red
Alexa Fluor® 633	632nm	647nm	Far Red
Alexa Fluor® 635	633nm	647nm	Far Red
Alexa Fluor® 647	650nm	665nm	Near-IR***
Alexa Fluor® 660	663nm	690nm	Near-IR***
Alexa Fluor® 680	679nm	702nm	Near-IR***
Alexa Fluor® 700	702nm	723nm	Near-IR***
Alexa Fluor® 750	749nm	775nm	Near-IR***
Alexa Fluor® 790	784nm	814nm	Near-IR***

9 *** 人眼对超过 650nm 的光不敏感；近红外荧光染料是无法被人眼看到的。

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	QSY-7	DABCYL	TAMRA
				480-580 (535)	550-650 (579)	620-730 (672)	500-600 (560)	380-550 (453)	470-560 (544)
FAM	494nm	518nm	Green	√			√	√	√
TET	521nm	538nm	Light Green	√			√	√	√
JOE	520nm	548nm	Yellow-Green	√			√	√	√
HEX	535nm	553nm	Yellow	√			√	√	√
VIC	538nm	554nm	Yellow	√			√	√	√
CY3	552nm	570nm	Orange		√		√		
NED	546nm	575nm	Orange		√		√		
Rhodamine Green	560nm	580nm	Orange		√		√		
Rhodamine Red	560nm	580nm	Orange		√		√		
TAMRA	560nm	582nm	Orange		√		√		
TAMRA (amidite, for STR)	560nm	582nm	Orange		√		√		
PET	556nm	595nm	Orange		√		√		
Texas Red-X	583nm	603nm	Orange		√				
ROX	587nm	607nm	Orange		√				
CY5	649nm	662nm	Red		√	√			

Applied Biosystems qPCR 仪可选用的荧光基团

Applied Biosystems qPCR 仪滤光片	7000/7300	7500/7500 Fast	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, NED, TAMRA, Cy3, ROX, Texas Red	VIC, JOE, TET, HEX
3 Yellow(549-586nm)	NED, TAMRA, Cy3	NED, TAMRA, Cy3		NED, TAMRA, Cy3
4 Orange(580-623nm)	ROX, Texas Red	ROX, Texas Red		ROX, Texas Red
5 Red (640-682nm)		CY5, LIZ		CY5, LIZ
6 Deep red (662-711nm)				

多重 qPCR 染料组合推荐

Applied Biosystems qPCR 仪	可供使用的滤光片和染料数量	参比染料	可提供用于多重 qPCR 的染料			
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。

用于二代测序的引物或修饰探针

让 Invitrogen DNA 寡核苷酸为您的二代测序服务

- 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

产品类别	推荐纯化	常见修饰	适合应用
Indexed adapters	HPLC 或 PAGE	5' 磷酸化 DNA	靶向测序 DNA 测序 RNA 测序
通用 adapters	HPLC 或 PAGE	5' 磷酸化 DNA	靶向测序 DNA 测序 RNA 测序
扩增引物	标准 DSL 或 HPLC	无	DNA 测序 RNA 测序
融合引物	HPLC 或 PAGE	无	扩增子测序
PCR 引物	标准 DSL	无	扩增子测序
封闭寡核苷酸	HPLC 或 PAGE	3'ddC 3'C3-spacer deoxyinosine	通过溶液内杂交进行靶向测序

寡核苷酸质量控制

Invitrogen 独特工艺的关键特性

- 作为国内专业的化学合成 DNA 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高质量的保证。其中 BIOTEK 用于合成效率检测，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，运用电喷雾电离质谱仪 (ESI-LC-MS) 对引物进行质量评估。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 Oligo 的附加服务

- 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)、高效液相色谱法 (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、熔解温度 (T_m 值)、总 OD 数、μg 和 nmol 数，以及根据您定购引物的准确序列 (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，方便您观察内容物。
- 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，为您提供全方位的服务。

Invitrogen 网站在线设计和应用分析工具 (在线工具)

- 熔解温度计算工具
- 引物分析工具
- OD 换算工具
- 双酶切和寻找酶切位点工具
- PCR 反应计算工具
- PCR 高保真酶反应保真性计算工具
- DNA 模板量和拷贝数计算工具
- qPCR 扩增效率计算工具



扫描二维码进入工具

附录

引物常见问题解答

1. 如何稀释引物？

化学合成的非荧光修饰引物一般采用冷冻真空进行干燥，其性状一般为附在离心管内壁上的白色或透明薄膜或粉末。稀释前，请将含有引物的离心管高速离心数秒，以使粘附在管盖或管壁的引物聚集到管底，小心开启管盖，以免粉末飞扬造成引物损失，加入适量的 TE(PH8.0) 缓冲液，盖好管盖，涡旋震荡混匀或用移液器反复吹打数次以使其充分溶解。建议将引物稀释于 ddH₂O 或 TE(PH8.0) (10mM Tris-HCl, PH8.0, 1mM EDTA) 溶液中，盖好管盖，涡旋震荡混匀或用移液器反复吹打数次以使其充分溶解。根据需要分装后于 -20°C 保存。具体稀释方法如下：

如需稀释为浓度 10 μ M 的工作液，加入 (管壁标签注明 nmol 值 \times 100) μ l 的溶液

如需稀释浓度 100 μ M 的储存液，加入 (管壁标签注明 nmol 值 \times 10) μ l 的溶液

2. 引物 (含修饰) 的分子量是如何确定的？

非修饰引物的分子量在随引物提供的报告单上都有明确标示。如果需要估计一个引物的分子量，可以按照每个碱基的平均分子量即 324.5 来计算，引物的平均分子量 = 碱基数 \times 碱基的平均分子量。

或按下列公式计算 $MW = (NA * WA) + (NC * WC) + (NG * WG) + (NT * WT) + (Nmod * Wmod) + (Nx * Wx) + (Ni * Wi) + 16 * Ns - 62$ 。

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。

混合碱基的分子量为混合碱基的分子量总和除以混合数，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。

3. 如何估算引物的 Tm 值 (melting temperature) ?

引物的 Tm 值与碱基长度、碱基组成、体系盐离子浓度有关。

引物设计软件一般都可以给出 Tm，但是由于每种软件其计算公式不同，因此给出的参考 Tm 值是有差异的。我司合成报告单给出 2 种盐离子浓度下的参考 Tm 值，建议设置 PCR 反应退火温度时，在 50mM 钠离子浓度的 Tm 值基础上加 5-10°C 进行调整。

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

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
A	313.21	5'-Biotin	405.45	3'-TAMRA	623.60
C	289.18	5'-6 FAM	537.46	3'-DABCYL	498.49
G	329.21	5'-HEX	744.13	3'-6 FAM	569.46
T	304.19	5'-TET	675.24	3'-Amino Modifier C3	153.07
I	314.2	5'-Cy5	533.63	3'-Amino Modifier C7	209.18
U	290.17	5'-Cy3	507.59	3'-Thiol Modifier C3	154.12

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 -20°C 密闭长期保存 (建议不超过 1 年)。溶解以后的 DNA 最好保存在 -20°C (建议不超过 6 个月), 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. 实验室如何将引物定量？

用紫外分光光度计测定核酸溶液在 260nm 的吸光度值进行定量。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: 一管干粉 DNA, 用 1ml 水溶解成母液, 取该母液 50 μl 稀释成 1ml, 并在 1ml 标准比色杯中测定其光密度为 0.25, 说明该 50 μl 中含有 0.25OD 的 DNA, 即原来 1ml 母液中含有的 OD 值为: $0.25 \times 20 = 5\text{OD}$ 。

3. 如何检测引物的纯度？

使用加有 7M 尿素的一定浓度的聚丙烯酰胺凝胶 (16%) 进行电泳。取 0.2OD 左右的引物, 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 (约 2-3 小时) 后剥胶, 用荧光 TLC 板在紫外灯下检测带型, 除主带外无其它明显杂带, 说明引物纯度没有问题 (在变性不充分的情况下, 主带之上可能会有条带, 为引物二级结构条带)。

4. 是否能使用 EB 染色的琼脂糖凝胶电泳对引物进行纯度或定量检测？

不能根据 EB 染色的琼脂糖凝胶电泳条带的亮度对合成的 DNA 制品进行定量。因为 EB 是通过嵌入到核酸的双螺旋而显色的, 合成的 DNA 分子为单链, 只有通过自身回折形成局部发夹环结构或链间形成部分双螺旋结构, 才能被 EB 染色。不同序列的等量引物其条带亮度会有很大差异。不能根据 EB 或其它双链 DNA 染料进行染色的方法来对合成的 DNA 进行定量。

5. 引物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 T_m 控制在 $58-60^{\circ}\text{C}$ 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. MGB 探针设计的基本原则是什么？

- MGB 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 T_m 控制在 $68-70^{\circ}\text{C}$ 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	发射光颜色 *
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	560nm	580nm	Orange
Rhodamine Red	560nm	580nm	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
QSY	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

赛默飞世尔科技

上海

上海市浦东新区新金桥路27号3,6,7号楼
邮编 201206
电话 021-68654588*2570

生命科学产品和服务业务

上海市长宁区仙霞路99号21-22楼
邮编 200051
电话 021- 61453628 / 021-61453637

北京

北京市东城区北三环东路36号环球贸易中心C座7层/8层
邮编 100000
电话 010-87946888

广州

广州国际生物岛寰宇三路36、38号合景星辉广场北塔204-206 单元
邮编 510000
电话 020-82401600

成都

成都市临江西路1号锦江国际大厦1406 室
邮编 610041
电话 028-65545388*5300

沈阳

沈阳市沈河区惠工街10号卓越大厦3109 室
邮编 110013
电话 024-31096388*3901

西安

西安市高新区科技路38号林凯国际大厦
1006-08单元
邮编 710075
电话 029-84500588*3801

南京

南京市中央路201号南京国际广场南楼1103室
邮编 210000
电话 021-68654588*2901

武汉

武汉市东湖高新技术开发区高新大道生物园路
生物医药园C8栋5楼
邮编 430075
电话 027-59744988*5401

昆明

云南省昆明市五华区三市街6号柏联广场写字
楼908单元
邮编 650021
电话 0871-63118338*7001

欲了解更多信息，请扫描二维码关注我们的微信公众号

赛默飞世尔科技在全国有共21个办事处。本资料中的信息，说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。



赛默飞
官方微信



赛默飞
生命科学小助手

免费服务电话：800 820 8982/400 820 8982
信息咨询邮箱：cnbidmarketing@thermofisher.com

ThermoFisher
S C I E N T I F I C