

生工® Sangon Biotech

生工生物

# 引物探针定制合成手册

Sangon Oligo and Probe Synthesis

▶ 第三版 (V3.0)



扫描微信二维码

生工生物工程（上海）股份有限公司  
Sangon Biotech (Shanghai) Co., Ltd.



生工®  
Sangon Biotech

生工®  BBI Diamond

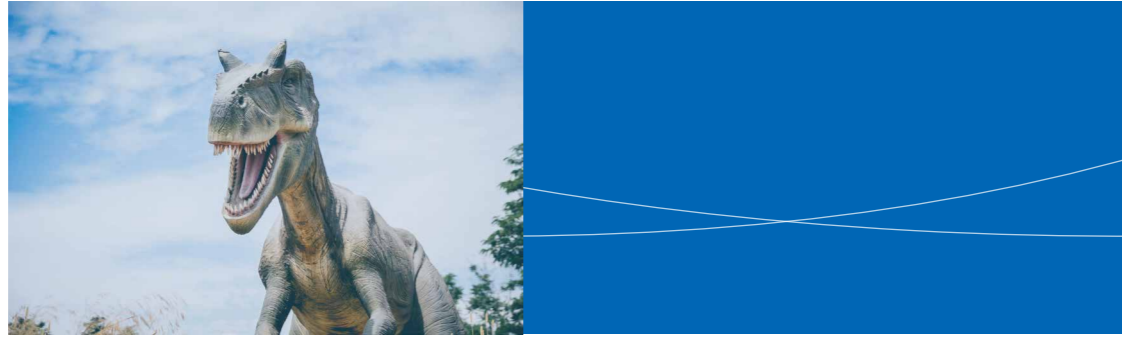
服务热线: 400-821-0268  
邮 箱: sales@sangon.com  
网 址: <http://www.sangon.com>

本手册最终解释权归生工生物市场部所有!

LIFE · BIOTECH · FUTURE

Preface

前言



## 幻想，从这里变为现实.....

1993 年 6 月，一部由著名科幻片导演史蒂文·斯皮尔伯格执导的影片《侏罗纪公园》在全球火热上映。影片中讲述了大批科学家利用凝结在琥珀中的史前蚊子体内的恐龙血液提取出恐龙的遗传基因，将已绝迹 6500 万年的史前庞然大物恐龙复生。当时看来，这只不过是遥不可及的科学幻想而已。

然而，随着 21 世纪以来生物技术的高速发展，DNA、RNA、蛋白和细胞都能被人工改造或复制。遥远的幻想离现实越来越近.....

## 生工生物与定制合成产品线

生工生物工程（上海）股份有限公司（简称：生工生物）是一家中外合资高新技术企业，隶属于集团公司 BBI LIFE SCIENCES。早在 1995 年，生工生物的前身“上海生工生物工程技术有限公司”就建立了国内第一条商业引物合成生产线，并于同年开始一代 DNA 测序服务；2000 年，于上海总部正式组建了基因合成生产线并开始基因定制服务；2003 年，组建了多肽合成生产线，更于 2017 年将生产线转移至宁波并建成了生产面积达 4 千平方米的宁波多肽合成工厂。截至 2020 年，我们已拥有上海总部、武汉、宁波、北京、广州、成都、南京、青岛、郑州和长春等数十个专用于定制合成产品生产的基地，生产场所面积达 11 万平方米。



# Contents

## 目录

### 01

关于生工生物引物合成 01

### 02

引物定制说明 02

### 03

引物合成定制产品	07
常规引物	07
体外诊断 qPCR 引物及探针	13
NGS 引物	17
引物池	19

### 04

引物合成目录产品	20
PCR 引物	20
测序引物	21
NGS 引物探针	24

### 05

相关说明及问题解答	26
引物设计服务	26
引物成品使用方法	29
引物的相关参数	31
常见问题解答	33

### 06

附录	36
附录 1：一代测序 (Sanger 法)	36
附录 2：联系方式	39

# 1 关于生工生物引物合成

生工生物是全球最主要的引物合成产品供应商之一。我们为高校、科研院所、医院、政府机构和医药诊断企业提供用于科学研究和研发生产用的引物产品。生工生物拥有符合生物医药诊断标准的洁净生产车间、先进的自动化生产设备、严格的质量控制体系和强大的研发创新能力。

## 为什么选择生工引物？

### 历史悠久

始于 1995 年，中国商业引物合成开创者，已拥有 25 年引物合成经验。

### 市场地位

生工生物所生产的引物合成类产品已获逾 874 所高等院校、1327 家科研院所、947 家医院、3933 家医药及生物技术公司以及 272 家政府检测及诊断中心使用。按订货人统计，用户总数超过 460,000 人。

### 研发创新

独创 HAP、ULTRAPAGE 纯化方式及 DBQ 双淬灭探针；中国首家在引物全系产品线实行 100% 质谱检测。

### 规模产能

拥有上海和武汉两大符合 10 万级洁净车间标准的 DNA 合成中心，及北京、广州、成都、南京、青岛、郑州和长春等数十个生产网点。总生产面积达 2 万平方米。

最大日均产能：碱基个数 120 万个；引物条数 6 万条。

### 生产制造

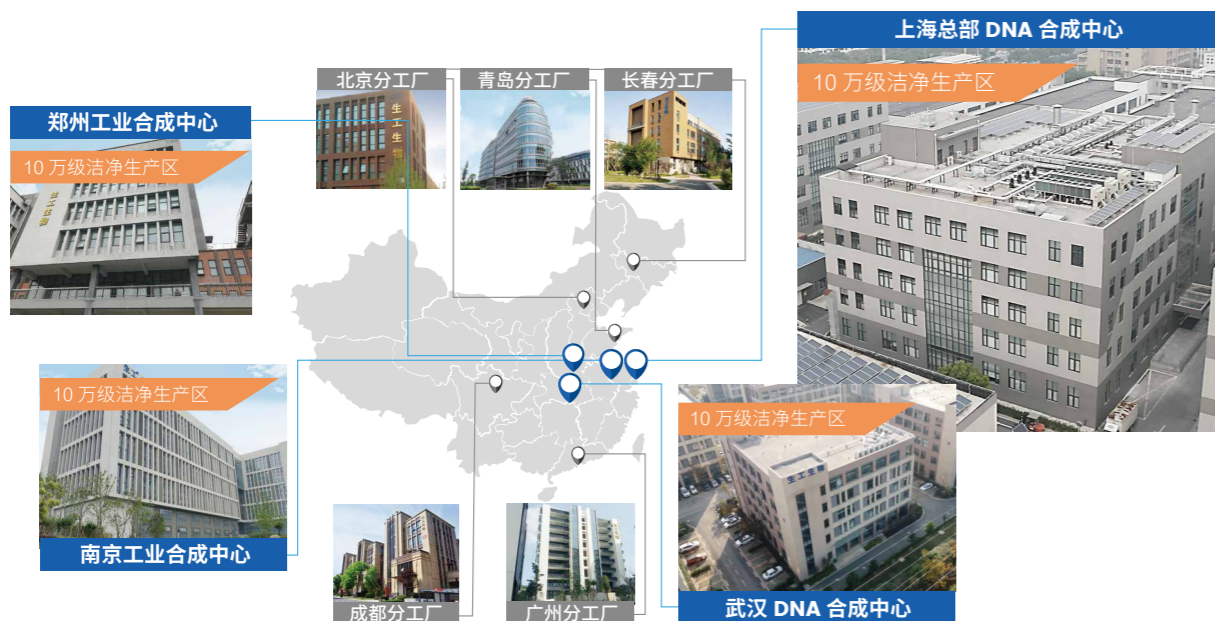
拥有部分自主研发的自动化生产线，数百台先进的生产设备。生产流程自动化程度高达 80%。

### 销售网络

业务覆盖全球大部分国家和地区，并在全球 7 个国家建有直销网点；

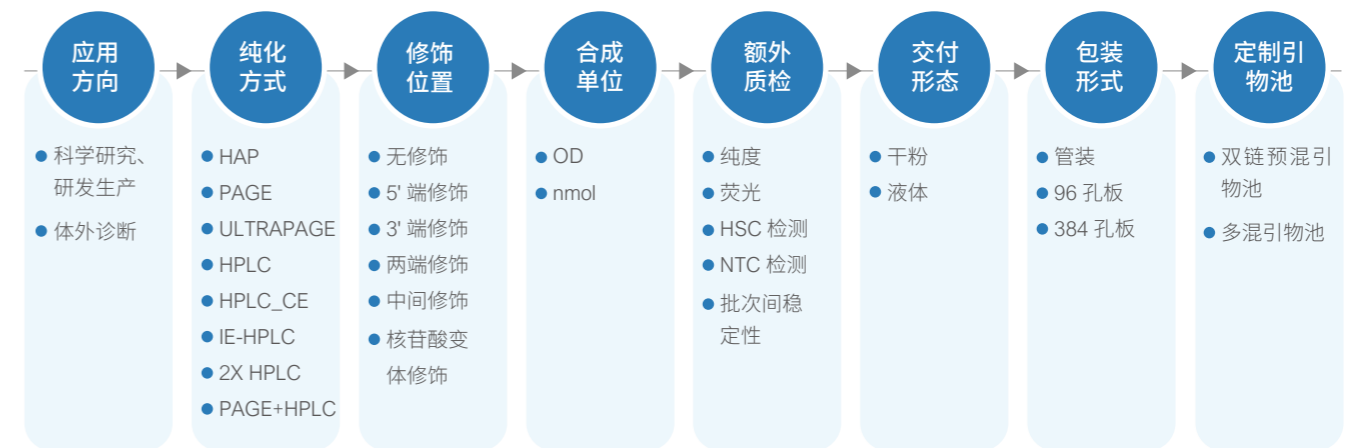
中国大陆拥有直销网点 40 个，销售人员超过 400 人。

备注：以上数据截至 2021 年 1 月。



# 2 引物定制说明

生工生物提供非常灵活且丰富的引物定制方案，通过阅读本说明或官方网站（www.sangon.com）引物在线订购指导，您可以非常方便地定制符合您应用需求的引物产品。我们的技术支持也可以实时给予您指导和帮助。



## 选择纯化方式

生工生物提供业内全面的纯化方式，包括 5 项常规纯化方式和 3 项加强纯化方式。大部分的情况下，使用常规纯化方式已能满足绝大部分客户的定制需求。

常规纯化方式	
纯化方式	简介
<b>HAP</b> 高效亲和吸附	即通过 HAP 树脂纯化柱专利技术进行纯化，和 OPC 比，负载量更大，且可避免一些短片段带入，提升了速度和纯度。HAP 的推出，成为了大幅降低当时国内 DNA 合成价格门槛的里程碑。
<b>PAGE</b> 聚丙烯酰胺凝胶电泳	生工在经典的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳基础上进行工艺流程优化，大幅提高纯化速度，对 DNA 片段进行分离，再回收目的 DNA。
<b>ULTRAPAGE</b> 增强聚丙烯酰胺凝胶电泳	生工独有，分辨率高于 PAGE，避免了人工切胶时回收到差别仅一个或几个碱基的引物，配合质谱检测，引物纯度和准确性均能得到提升。
<b>HPLC</b> 高效液相色谱	根据高效液相色谱的原理，依据 DNA 的疏水性分离纯化得到正确的产物。
<b>HPLC_CE (IVD)</b> 针对体外诊断应用的优化高效液相色谱	针对 IVD 应用优化，在毛细管电泳（CE）检测保证纯度的基础上，对 HPLC 纯化柱进行特殊去除残留工艺，尽可能地避免交叉污染。

增强纯化方式	
纯化方式	简介
<b>IE-HPLC</b> 离子交换 HPLC 纯化	离子交换 (IE) HPLC 基于相对电荷差将全长引物从截短的引物中分离纯化出来, 可以有效去除 N-1 短片段。适合大多数的修饰, 但不适合硫代、巯基等修饰。
<b>2X HPLC</b> 双重 HPLC 纯化	对于纯度要求更高的引物, 我们可提供双重 HPLC 纯化 (先反相, 后离子交换), 尤其适合长度高于 59 个碱基且带有修饰的引物。
<b>PAGE+HPLC</b> PAGE+HPLC 双重纯化	对于纯度要求更高的引物, 我们可提供 PAGE+HPLC 双重纯化, 即在一次 PAGE 纯化之后再进行一次 HPLC 纯化以进一步提高纯度, 尤其适合长度高于 59 个碱基的引物。

### 综合价格、引物长度、修饰等因素选择纯化方式

纯化方式	价格	纯度	引物长度 (mer)				带修饰	其他
			短片段 (~10)	中片段 (11~59)	长片段 (60~130)	超长片段* (131~)		
HAP	最低	较高	不适合	适合	不适合	不适合	不适合	
PAGE	低	较高	不适合	适合	不适合	不适合	不适合	
ULTRAPAGE	适中	高	不适合	推荐	适合	适合	不适合	
HPLC	适中	高	推荐	推荐	适合	适合	推荐	
HPLC_CE (IVD)	偏高	高	不适合	推荐	不适合	不适合	推荐	可降低交叉污染率
IE-HPLC	最高	极高	不适合	推荐	推荐***	推荐***	推荐**	
2X HPLC	最高	极高	不适合	推荐	推荐***	推荐***	推荐**	
PAGE+HPLC	最高	极高	不适合	适合	推荐	推荐	不适合	

#### 备注:

\* 由于超长片段合成难度较大, 我们无法保证其成功率及纯度等, 如需合成, 请提前与技术支持沟通咨询;

\*\* 某些修饰种类受限制;

\*\*\* 简并碱基不适用。

### 按应用来选择纯化方式

应用	纯化方式				
	HAP	PAGE	ULTRAPAGE	HPLC	HPLC_CE (IVD)
普通PCR / 多重PCR / 逆转录PCR (RT-PCR)	√	√	√	√	√
荧光定量PCR (qPCR) / 数字PCR (dPCR)	√	√	√	√	√
一代测序 (Sanger)	√	√	√	√	√
高通量测序 (NGS)	√	√	√	√	√
全基因合成	√	√	√	√	√
亚克隆 / 点突变		√	√	√	√
基因构建 / RNA 干扰		√	√	√	√

PCR 产物用于克隆表达研究或基因重组等	√	√	√
反义核酸		√	√
修饰或标记引物		√	√
化学或物理应用		√	√
体外诊断应用			√

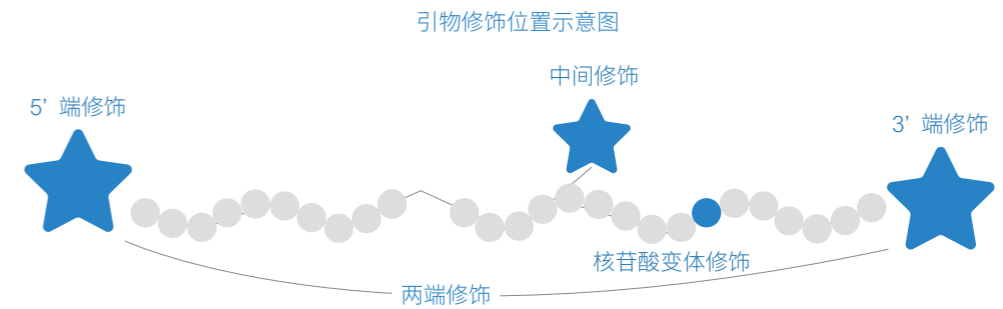
#### 备注:

IE-HPLC 和两种双重纯化方式可覆盖以上全部应用。

## ● 选择修饰位置与修饰基团

### 修饰位置选择

按引物修饰的位置可分为五种。分别是: 1) 5' 端修饰; 2) 3' 端修饰; 3) 两端修饰; 4) 中间修饰; 5) 核苷酸变体修饰。



### 修饰基团选择

生工生物提供多达 140 种不同类型修饰基团:

荧光基团	淬灭基团	空间子类修饰	化学连接类基团	核苷酸碱基修饰	其他修饰
AMCA Alexa Fluor 350 Alexa Fluor 405 Alexa Fluor 430 Alexa Fluor 488 Alexa Fluor 532 Alexa Fluor 555 Alexa Fluor 568 Alexa Fluor 594 Alexa Fluor 647 Alexa Fluor 680 Atto 425 Atto 590 AuqaFluor 593 BODIPY FL Cy3 Cy5 Cy5.5 Cy7 FAM HEX IR Dye 650 IR Dye 750 JOE NED Oregon Green 488 Pacific Blue Quasar 570 Quasar 670 R6G ROX TAMRA TET Texas Red VIC Yakima Yellow	BBQ 650 BHQ1 BHQ2 BHQ3 Dabcyl DBQ1 Eclipse MGB  简并碱基代码 IUB Base Codes  B=C/G/T D=A/G/T H=A/C/T I=Universal Base K=G/T M=A/C N=A/C/G/T R=A/G S=C/G V=A/C/G W=A/T Y=C/T	C3 Spacer C6 Spacer C12 Spacer dSpacer PC-linker Spacer 18 Spacer 9	Acrydite Aldehyde Alkyne Amino Azide Biotin Carboxy DBCO Digoxin Maleimide Thiol	2' Fluoro bases 2'-O-Methyl Base 2-Aminopurine 5-Aza-2'-dC 5-Bromo dU 5-Hydroxymethyl dC 5-Methyl dC 5-Nitroindole 8-Oxo deoxyguanosine deoxyInosine DeoxyUridine Dideoxycytidine Inverted dG Inverted dT LNA N6-Methyl dA phosphorothioate Phosphorylation Pyrrolo-dC RNA	Azobenzene Cholesterol Ferrocene Methylene Blue Puromycin Pyrene Ru Symmetric

140+  
不同修饰

关于修饰引物的更多内容详见 P8 页。

## ● 选择合成单位

我们可提供以 OD 和 nmol 为单位的合成量，您可以根据自己的习惯或实际需求灵活选择。引物合成订购表及官网引物合成订购界面均可填写两种单位定义下需要的合成量。

## ● 定制 QC

### 标准 QC

外观、定量和分子量是全部引物合成产品系列均标配的检测项，对此我们不会额外收取附加的费用。

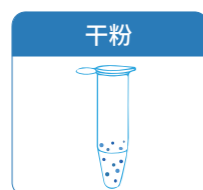
### 额外 QC

您可以根据自己所订购引物的类型和应用定制额外的 QC，我们强大的 DNA 合成质量检测中心能提供多达数十项额外 QC 检测项目。

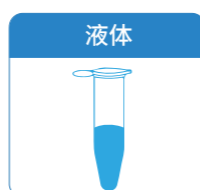
类型	检测项 (方法)	简要说明	适用范围
标准 QC	外观	是否存在异物等情况	全系
	分子量	引物的分子量是否正确	全系
	纯度	引物的纯度是否满足对应标准	全系
	荧光激发 / 发射波长	荧光修饰引物的吸收 / 发射光谱波长是否正常	荧光修饰引物、qPCR 探针
额外 QC	荧光值酶切增量	TaqMan 探针、分子信标等常规双标记引物的荧光、淬灭基团功能是否正常	双标记 qPCR 探针、分子信标
	人源污染检测 (HSC)	引物是否有污染人源基因组 DNA	全系
	无模板对照检测 (NTC)	qPCR 引物探针在无模板体系中是否会体现出不正常的扩增信号	qPCR 引物及探针
	交叉污染率	不同 Oligo 之间的交叉污染概率	NGS 引物
	批次间稳定性	针对特定客户，建立批次间质量稳定性动态数据并定期出具报告	全系
	定量	引物总量是否准确	全系

## ● 选择交付形态

根据您的需求，我们可以提供干粉和液体两种交付形态：



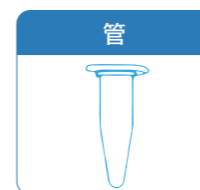
- 引物在干粉状态下能获得 2 年的有效期，使用时直接加入对应体积的稀释液。



- 专用的引物稀释液可以保证在 -20°C 下获得 6 个月的有效期限，液体浓度为 10/100 μM，可以作为 PCR 实验工作液和储存液。

## ● 选择分装方式

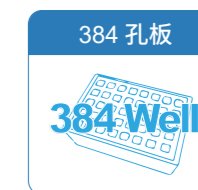
根据您的需求，我们可以提供管、96 孔板和 384 孔板三种分装方式：



- 使用离心管或螺旋盖保存管分装，多管订购按数量分别使用自封袋、20 孔、40 孔或 80 孔离心管盒进一步包装。



- 使用 96 孔深孔板，自动移液工作站分装，铝箔盖机器封板，安全可靠。



- 使用 384 孔微孔板，自动移液工作站分装，铝箔盖机器封板，安全可靠。

## ● 特殊定制：引物池引物

引物池 (Oligo Pools) 即通过专有的技术和生产工艺，将 2 条到数万条引物制备成混合干粉或溶液。

生工生物可提供 2 种类型的引物池定制：1) 双链预混引物池；2) 多混引物池。

关于引物池引物的更详细内容请见 P19 页。



### 3 引物合成定制产品

#### ● 常规引物

生工生物常规引物合成已有二十多年历史。使用我们引物的科研机构及企事业单位的科研人员及研发人员数量已超过 460,000 人，且遍布全球各地。我们提供极其灵活的个性化引物定制选择。您可以从价格、到货速度、纯化方式、合成单位、交付形态和分装方式等多个方面，以更好的选择和更便捷的订购方式获得符合您应用需求的引物。

#### 我们的优势

- 最快 24 小时内即可交付；
- 灵活的定制组合，提供 5 种标准纯化方式，3 种加强纯化方式，可满足全分子生物学研究应用；
- 全系标配核酸定量和分子量 (MASS) 质量检测，可选纯度检测 (CE) 等定制 QC 质检项目；
- 合成量完全由客户定制，OD 及 nmol 合成单位任选；
- 自 ULTRAPAGE 纯化开始，所有的生产过程均在拥有 10 万级洁净车间的环境中进行。

#### 订购信息

##### Rapid Oligos 快速引物

前端订购与生产系统无缝对接，加上优化的自动化设备及纯化流程，可实现最快 24 小时内交付成品；生工专有 HAP 及 PAGE 纯化，可满足常规 PCR、染料法 qPCR、一代测序、NGS、基因合成和基因亚克隆等下游实验应用。

纯化方式	碱基范围	交付形态	包装形式	额外 QC	合成周期
HAP	11~59 mer	干粉	管装	—	≤1 工作日
PAGE		液体	96 孔板 384 孔板		≤2 工作日

##### HiPure Oligos 高纯引物

采用生工独有的 ULTRAPAGE 和标准的 HPLC 纯化方式，适合对引物纯度要求较高的 PCR 实验、克隆表达研究或基因重组、反义核酸、修饰或标记引物、qPCR 荧光探针和化学或物理交叉学科等下游实验应用。

纯化方式	碱基范围	交付形态	包装形式	额外 QC	合成周期
ULTRAPAGE	11~59 mer	干粉	管装	—	≤3 工作日
	60~130 mer				≤5 工作日
HPLC	~10 mer	液体	96 孔板 384 孔板	纯度 (CE)	≤3 工作日
	11~59 mer				≤3 工作日
	60~130 mer				≤5 工作日

##### UltraPure Oligos 超纯引物

我们可以提供 IE-HPLC 纯化，以及 2X HPLC 和 PAGE+HPLC 两种双重纯化方式的超纯引物。2X HPLC 可以提供比高纯引物更高的纯度。而两种双重纯化除了能提供更高纯度的引物外，尤其适合长片段 (≥60 mer) 且带修饰的引物。

纯化方式	碱基范围	交付形态	包装形式	额外 QC	合成周期	
IE-HPLC	~10 mer	—	—	—	—	
	11~59 mer					咨询
	60~130 mer					—
2X HPLC	~10 mer	干粉 液体	管装 96 孔板 384 孔板	纯度 (CE)	咨询	
	11~59 mer					
	60~130 mer					
PAGE+HPLC	131~ mer*	—	—	—	—	
	~10 mer					
	11~59 mer					咨询
	60~130 mer					
—	131~ mer*	—	—	—	—	
	—					

备注：\* 由于超长片段合成难度较大，我们无法保证其成功率及纯度等，如需合成，请提前与技术支持沟通咨询。

##### Modified Oligos 修饰引物

按引物修饰的位置可分为五种。分别是：1) 5' 端修饰；2) 3' 端修饰；3) 两端修饰；4) 中间修饰；5) 核苷酸变体修饰。为保证质量和纯度，所有修饰引物均采用 HPLC 及以上的纯化方式。

修饰名	代码 (别称)	5' 端修饰	3' 端修饰	中间修饰	额外 QC
荧光类 (Fluorophres 系列)					
AMCA	AMCA	√	√	—	—
Pacific Blue	Pacific Blue	√	√	√dT	—
Atto 425	Atto 425	√	√	√dT	—
BODIPY FL	BODIPY FL	√	√	√dT	—
FAM	6-FAM	√	√	√dT	纯度 (CE)
Oregon Green 488	Oregon Green 488	√	√	√dT	荧光激发 / 发射 波长 (FS)
TET	TET	√	√	√dT	荧光值酶切增量 (FS)
JOE	JOE	√	√	√dT	—
Yakima Yellow	Yakima Yellow	—	√	—	—
VIC	VIC	√	—	—	—
HEX	HEX	√	√	√dT	—
Quasar 570	Quasar 570	√	√	√dT	—

修饰名	代码 (别称)	5' 端修饰	3' 端修饰	中间修饰	额外 QC
Cy3	Cy3	√	√	√dT √骨架	
NED	NED	√			
TAMRA	TAMRA	√	√	√dT	
ROX	ROX	√	√	√dT	
AquaPhluor 593	AquaPhluor 593		√		
Texas Red	Texas Red	√	√	√dT	纯度 (CE)
Atto 590	Atto 590	√	√		荧光激发 / 发射 波长 (FS)
IR Dye 650	IR Dye 650	√	√	√dT	荧光值酶切增量 (FS)
Cy5	Cy5	√	√	√dT √骨架	
Quasar 670	Quasar 670	√	√		
Cy5.5	Cy5.5	√	√	√dT	
Cy7	Cy7	√	√	√dT	
IR Dye 750	IR Dye 750	√	√	√dT	
<b>荧光类 (Alexa Flour 系列)</b>					
Alexa Flour 350	Alexa Flour 350	√	√	√dT	
Alexa Flour 405	Alexa Flour 405	√	√	√dT	
Alexa Flour 430	Alexa Flour 430	√	√	√dT	
Alexa Flour 488	Alexa Flour 488	√	√	√dT	纯度 (CE)
Alexa Flour 532	Alexa Flour 532	√	√	√dT	荧光激发 / 发射 波长 (FS)
Alexa Flour 555	Alexa Flour 555	√	√	√dT	荧光值酶切增量 (FS)
Alexa Flour 568	Alexa Flour 568	√	√	√dT	
Alexa Flour 594	Alexa Flour 594	√	√	√dT	
Alexa Flour 647	Alexa Flour 647	√	√	√dT	
Alexa Flour 680	Alexa Flour 680	√	√	√dT	
<b>淬灭基团类</b>					
Dabcyl	Dabcyl	√	√	√dT	
Eclipse	Eclipse		√		
MGB	MGB		√		
BHQ1	BHQ1	√	√	√dT	纯度 (CE)
BHQ2	BHQ2	√	√	√dT	
BHQ3	BHQ3		√		
BBQ 650	BBQ 650	√		√dT	
<b>化学连接类</b>					
Amino	-NH <sub>2</sub>	√C6 √C12	√C6 √C7	√dT	
	Int Uni-Link Amino	√		√dT	纯度 (CE)
Carboxy	-COOH	√C10			
Aldehyde	-CHO	√C2			

修饰名	代码 (别称)	5' 端修饰	3' 端修饰	中间修饰	额外 QC
Thiol	-SH	√C6	√C3 √C6		
	-S-S-	√C6	√C3 √C6	√骨架	
	-Dithiol	√	√	√dT √骨架	
	-Triple SH	√			
Maleimide	-Maleimide	√	√		
Acrydite	-Acrydite	√	√	√dT	
Alkyne	-C≡CH	√	√	√dT	
Azide	-N <sub>3</sub>	√	√	√dT	
DBCO	-DBCO	√	√	√dT	纯度 (CE)
	-Biotin	√	√	√dT	
	-Biotin TEG	√	√		
	-Desthio Biotin	√			
	-Desthio Biotin TEG	√	√	√dT	
Biotin	-Dual Biotin	√			
	-Triple Biotin	√			
	-Digoxin	-Dig	√	√	√dT
<b>空间子类</b>					
Spacer	C3 Spacer	√	√	√骨架	
	C6 Spacer	√	√	√骨架	
	C12 Spacer	√	√	√骨架	
	Spacer 9	√	√	√骨架	纯度 (CE)
	Spacer 18	√	√	√骨架	
	dSpacer	√	√	√骨架	
	PC-linker	√	√	√骨架	
<b>核苷酸变体类</b>					
2-Aminopurine	2-Aminopurine	√	√	√骨架	
5-Bromo dU	5-Br dU	√	√	√骨架	
DeoxyUridine	dU	√	√	√骨架	
Inverted dT	Inverted dT		√		
Inverted dG	Inverted dG		√		
Dideoxycytidine	ddC		√		纯度 (CE)
5-Methyl dC	5-Me dC	√	√	√骨架	
5-Hydroxymethyl dC	5-Hm dC	√	√	√骨架	
N6-Methyl dA	N6-Me-dA	√	√	√骨架	
5-Aza-2'-dC	5-Aza-2'-dC	√	√	√骨架	
Deoxyinosine	dI	√	√	√骨架	
5-Nitroindole	5-Nitroindole	√	√	√骨架	

修饰名	代码(别称)	5' 端修饰	3' 端修饰	中间修饰	额外 QC
LNA	XNA	√	√	√骨架	
2'-O-Methyl Base	2'-O-Methyl Base	√	√	√骨架	
RNA	rA	√	√	√骨架	
2' Fluoro bases	2-F RNA	√	√	√骨架	纯度 (CE)
Pyrrolo-dC	Pyrrolo-dC	√	√	√骨架	
8-Oxo deoxyguanosine	8-oxo-dG	√	√	√骨架	
Phosphorylation	P	√	√		
Phosphorothioate	*			√骨架	
<b>其他</b>					
Pyrene	Pyrene	√			
Symmetric	Symmetric	√		√	
Puromycin	Puromycin		√		
Cholesterol	Cholesterol	√	√		纯度 (CE)
Azobenzene	Azobenzene	√		√	
Methylene Blue	Methylene Blue	√	√	√dT	
Ferrocene	Ferrocene	√	√	√dT	
Ru	Ru	√	√	√dT	

## 常用修饰简介

### 空间子类修饰

#### 间臂 (Spacer)

Spacer 可为寡核苷酸标记提供必要的间隔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。C3/C6 Spacer 起到增加空间距离的 linker 作用，可以修饰在 5' 端、3' 端以及中间，并且中间可以修饰多个，当修饰在引物 3' 端时，能够起到阻止 DNA 聚合酶延伸的封闭作用。PC (Photo-Cleavable) spacer/linker 可放置在 DNA 碱基之间。它可以在 300-350 纳米光谱范围内的紫外线照射下被劈裂，释放具有 5'-磷酸基的 Oligo。

### 化学连接类修饰

#### 氨基修饰 (Amino)

伯氨基可用于将多种修饰剂 (例如荧光染料) 连接至寡核苷酸或用于将寡核苷酸连接至固体表面。在使用过程中不反应。氨基修饰广泛应用在 DNA 芯片 (DNA Microarray) 和多重标记诊断系统。目前提供 C6 氨基修饰和 C12 氨基修饰两种，C6、C12 等代表了 NH<sub>2</sub> 与 DNA 之间的直链亚甲基长度，起到增加空间距离的作用。前者可用于连接一些即使靠近寡核苷酸也不会影响其功能的化合物，后者用于亲和纯化基团的连接和一些不能太靠近 DNA 链的基团 (如容易被 DNA 淬灭的荧光基团) 的连接。

#### 生物素 (Biotin)

生物素修饰的 Oligo 与链霉亲和素紧密结合。链霉亲和素可以用荧光染料和酶标记，也可以介导固体表面的吸附。各种分子生物学分析和纯化方法都采用生物素。引物生物素标记，可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、离子通道构象变化等。

#### 地高辛 (Digoxin)

地高辛是一种可与氨基修饰的寡核苷酸偶联的小半抗原。抗地高辛抗体允许捕获或检测 Dig 标记的寡核苷酸。地高辛标记的探针可用于各种杂交反应，如 DNA-DNA 杂交 (Southern blotting)、DNA-RNA 杂交 (Northern blotting)、斑点杂交 (Dot blotting)、克隆杂交、原位杂交以及酶联免疫分析 (ELISA)。

#### 巯基 (SH / HS-SH)

巯基用于将 Oligo 连接到很多固相载体表面上，含有巯基修饰的 Oligo 容易被氧化生成二硫键，使用前需要用二硫苏糖醇 (DTT) 或三 (2-羧乙基) 膦酸盐 (TCEP) 进行化学还原。

### 碱基修饰

#### 2-氨基嘌呤

2-氨基嘌呤是最常用的核苷类似物，可以替代寡核苷酸中的 dA。它是一种对局部环境敏感的天然荧光基团，能够监测 DNA 发夹的结构和动力学。2-氨基嘌呤可能会稍微降低 T<sub>m</sub> 值。

#### 脱氧次黄嘌呤 (deoxyInosine dI)

脱氧次黄嘌呤是一个自然存在的通用碱基，与 ATCG 都能配对，当与其它碱基结合时，会比其它碱基错配相对更稳定。然而其并不是真正意义上的通用碱基，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。

#### 脱氧尿嘧啶 (deoxyUridine dU)

在 DNA 寡核苷酸中可取代 dT。尿嘧啶 -DNA 糖基化酶 (UNG) 可以去除该碱基，使 Oligo 断链。这种策略的一个常见用途是消除前一轮扩增的 DNA 并防止交叉污染。另外，脱氧尿嘧啶可以插进寡核苷酸来增加双链的 T<sub>m</sub> 值从而提高双链的稳定性，但这种 T<sub>m</sub> 值的增加效果有限。

#### 5-溴脱氧尿嘧啶 (5-Bromo dU)

5-溴脱氧尿嘧啶是一种光反应卤化碱基，5-BrdU 是一种核苷类似物，可与胸苷竞争掺入 DNA。5-BrdU 通常用于检测增殖细胞。

#### 双脱氧胞嘧啶核苷 (DiDeoxyCytidine ddC)

ddC 为双脱氧胞嘧啶核苷，修饰在 Oligo 最后一个碱基，能够防止 Oligo 链的延伸。

#### 锁核酸 (LNA)

LNA 碱基对核糖的主链进行修饰，将碱基锁定在 C3-内侧位置，有利于 RNA A 型螺旋双链结构。这种修饰能显著增加 T<sub>m</sub> 值，并且对核酸酶有很强的抵抗力。

### 磷酸相关修饰

#### 磷酸化修饰 (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，作为 DNA 连接酶的底物。3' 磷酸化可抗 3' 外切酶消化，也用于阻止 DNA 聚合酶催化的 DNA 链延伸反应。

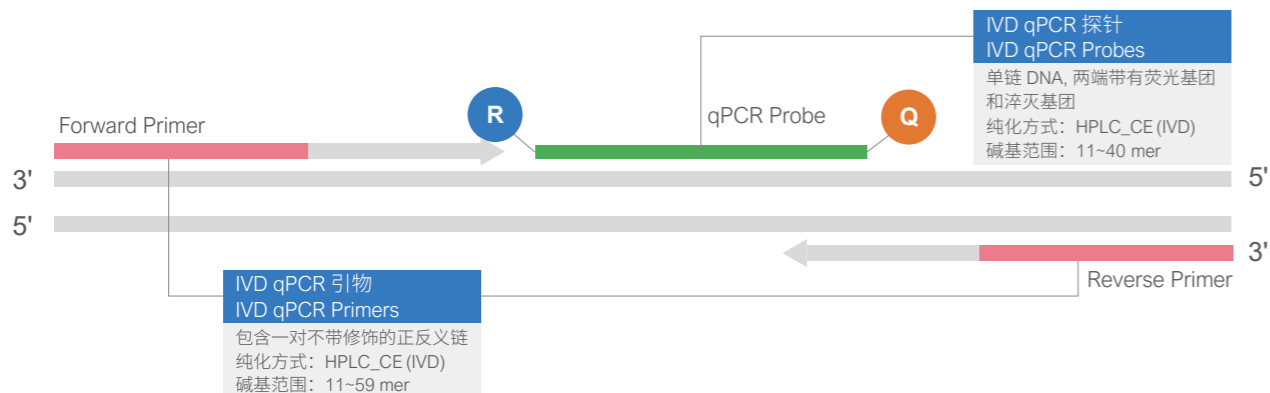
#### 硫代修饰 (Phosphorothioate)

硫代修饰 (PS) 用硫原子代替 Oligo 磷酸骨架中的非桥氧原子。这种修饰使得核苷酸间的连接抗核酸酶降解。



## ● 体外诊断 qPCR 引物及探针

作为分子诊断 qPCR 试剂盒中的核心原料，qPCR 引物及探针的质量对于样本靶标检测的准确性，起到了极其关键的作用。而对于分子诊断的应用，引物及探针的纯度、荧光强度和洁净度等一系列指标需要更高的要求。自以 qPCR 技术为基础的分子诊断应用在国内外兴起开始，生工生物即不断对生产工艺进行优化升级。目前，我们生产的引物及探针，已被国内外大量的分子诊断试剂盒生产商采用。



### 我们的优势

- 专用于生产分子诊断应用产品的 10 万级洁净生产车间和实验室，其中上海总部 DNA 合成中心获得了 ISO 13485 和 GMP 认证；
- 专门经过优化的 HPLC\_CE (IVD) 纯化，在保证纯度的前提下，避免外源性污染；
- 可选择额外定制 QC 检测：qPCR 探针荧光检测、NTC 检测及关键指标批次间差异检测；
- 建立周期性质量跟踪体系并定期出具质量跟踪报告。

### 订购信息

#### IVD qPCR Primers IVD qPCR 引物

包含一对正反义链，常规情况下不带修饰。IVD 专用的 qPCR 引物全部在符合医药诊断级的 10 万级洁净车间生产及纯化，可选择多种纯化方式，推荐专门针对 IVD 优化的 HPLC\_CE (IVD) 纯化。

纯化方式 *	碱基范围 **	交付形态	包装形式	额外 QC	合成周期
HPLC_CE (IVD)	11~59 mer	干粉 液体	管装 96 孔板 384 孔板	纯度 (CE)	3~5 工作日

#### 备注：

\*HPLC\_CE (IVD) 为推荐纯化方式，如需考虑成本，也可考虑 ULTRAPAGE 及标准 HPLC 纯化方式，如对引物纯度要求更高，则可选择 2X HPLC 纯化方式。选择这些纯化方式的引物均保证按医药诊断级的标准在 10 万级洁净车间内安排生产；

\*\* 如引物长度在碱基范围之外，请在订购前与技术支持进行咨询沟通。

#### IVD qPCR Probes IVD qPCR 探针

通常为一条双端分别修饰荧光和淬灭基团的单链 DNA。IVD 专用的 qPCR 探针全部在符合医药诊断级的 10 万级洁净车间生产及纯化，推荐专门针对 IVD 优化的 HPLC\_CE (IVD) 纯化，可在保证纯度的基础上有效避免外源性污染。

纯化方式 *	碱基范围 **	交付形态	包装形式	额外 QC	合成周期
HPLC_CE (IVD)	11~40 mer	干粉 液体	管装 96 孔板 384 孔板	纯度 (CE)	≤5 工作日

#### 备注：

\*HPLC\_CE (IVD) 为推荐纯化方式，如需考虑成本，也可考虑标准 HPLC 纯化方式，如对探针纯度要求更高，则可选择 2X HPLC。选择这些纯化方式的探针均保证按医药诊断级的标准在 10 万级洁净车间安排生产；

\*\* 如引物长度在碱基范围之外，请在订购前与技术支持进行咨询沟通。

## IVD qPCR 探针修饰基团

### 常用荧光修饰基团

#### Fluorophres 系列荧光修饰基团

修饰名	5' 端修饰	3' 端修饰	中间修饰	最大激发波长	最大发射波长	发射光颜色
AMCA	√	√		350 nm	440 nm	Blue
Pacific Blue	√	√	√dT	410 nm	455 nm	
Atto 425	√	√	√dT	436 nm	484 nm	
BODIPY FL	√	√	√dT	503 nm	512 nm	
FAM	√	√	√dT	494 nm	518 nm	Green
Oregon Green 488	√	√	√dT	496 nm	524 nm	
TET	√	√	√dT	521 nm	536 nm	Yellow-Green
JOE	√	√	√dT	520 nm	548 nm	
R6G	√	√	√dT	530 nm	548nm	
Yakima Yellow		√		530 nm	549 nm	Yellow
VIC	√			538 nm	554nm	
HEX	√	√	√dT	535 nm	556 nm	Orange
Quasar 570	√	√	√dT	547 nm	570 nm	
Cy3	√	√	√dT √骨架	552 nm	570 nm	
NED	√			546 nm	575 nm	
TAMRA	√	√	√dT	565 nm	580 nm	Red-Orange
ROX	√	√	√dT	585 nm	605 nm	
AquaPhluor 593		√		593 nm	613 nm	
Texas Red	√	√	√dT	595 nm	615 nm	
Atto 590	√	√		594 nm	624 nm	
IR Dye 650	√	√	√dT	650 nm	665 nm	

Cy5	√	√	√dT √骨架	643 nm	667 nm	
Quasar 670	√	√		647 nm	667 nm	
Cy5.5	√	√	√dT	684 nm	710 nm	
Cy7	√	√	√dT	750 nm	773 nm	
IR Dye 750	√	√	√dT	756 nm	776 nm	

#### Alexa Flour 系列荧光修饰基团

修饰名	5' 端修饰	3' 端修饰	中间修饰	最大激发波长	最大发射波长	发射光颜色
Alexa Flour 350	√	√		346 nm	442 nm	
Alexa Flour 405	√	√	√dT	401 nm	421 nm	
Alexa Flour 430	√	√	√dT	433 nm	541 nm	
Alexa Flour 488	√	√	√dT	490 nm	525 nm	
Alexa Flour 532	√	√	√dT	532 nm	553 nm	
Alexa Flour 555	√	√	√dT	555 nm	565 nm	
Alexa Flour 568	√	√	√dT	578 nm	603 nm	
Alexa Flour 594	√	√	√dT	590 nm	617 nm	
Alexa Flour 647	√	√	√dT	650 nm	665 nm	
Alexa Flour 680	√	√	√dT	679 nm	702 nm	

#### 常用淬灭基团

修饰名	5' 端修饰	3' 端修饰	中间修饰	淬灭范围	最大吸收波长
Dabcyl	√	√	√dT	380 nm-530 nm	453 nm
Eclipse		√		390 nm-625 nm	522 nm
MGB		√		390 nm-625 nm	522 nm
BHQ1	√	√	√dT	480 nm-580 nm	534 nm
BHQ2	√	√	√dT	550 nm-650 nm	579 nm
BHQ3		√		620 nm-730 nm	672 nm
BBQ 650	√		√dT	550 nm -750 nm	650 nm

#### 常用荧光基团与淬灭基团适配选择

##### 荧光基团与淬灭基团搭配选择 1

修饰名	Taqman 探针淬灭基团				MGB 探针淬灭基团	分子信标淬灭基团	DBQ 探针双淬灭基团
	BHQ1	BHQ2	BHQ3	BBQ650	MGB	Dabcyl	DBQ1
AMCA							
Pacific Blue							
Atto 425	√				√		√

修饰名	Taqman 探针淬灭基团				MGB 探针淬灭基团	分子信标淬灭基团	DBQ 探针双淬灭基团
	BHQ1	BHQ2	BHQ3	BBQ650	MGB	Dabcyl	DBQ1
BODIPY FL	√				√	√	
FAM	√				√	√	√
Oregon Green 488	√				√	√	
TET	√				√	√	
JOE	√				√	√	
R6G	√				√	√	
Yakima Yellow	√				√	√	
VIC	√				√	√	√
HEX	√				√	√	√
Quasar 570		√		√			
Cy3		√		√			
NED		√		√			
TAMRA		√		√			
ROX		√		√			
AquaPhluor 593		√		√			
Texas Red		√		√			
Atto 590		√		√			
Cy5			√	√			
Quasar 670			√	√			
Cy5.5			√	√			
Cy7							
IR Dye 750							

##### 荧光基团与淬灭基团搭配选择 2

修饰名	Taqman 探针淬灭基团				MGB 探针淬灭基团	分子信标淬灭基团	DBQ 探针双淬灭基团
	BHQ1	BHQ2	BHQ3	BBQ650	MGB	Dabcyl	DBQ1
Alexa Flour 350							
Alexa Flour 405							
Alexa Flour 430	√				√	√	
Alexa Flour 488	√				√	√	
Alexa Flour 532	√				√	√	
Alexa Flour 555		√		√			
Alexa Flour 568		√		√			
Alexa Flour 594		√		√			
Alexa Flour 647			√	√			
Alexa Flour 680			√	√			

## ● NGS 引物

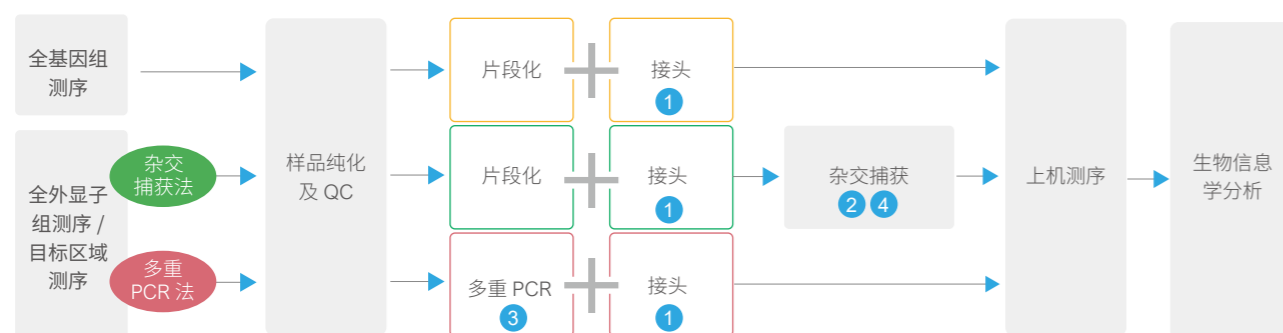
继 qPCR 技术成为分子诊断的主流技术平台后，第二代测序（NGS）技术的迅速发展给予了科学研究和医药诊断领域更高的技术平台及更广阔的发挥空间。作为 NGS 应用的重要原料组成，NGS 引物和常规 PCR 引物相比，对于纯度、定量精确度、碱基序列准确性及交叉污染率提出了更高的要求。生工生物拥有二十多年引物合成经验，我们针对 NGS 应用优化产品性能和质量，并提供全面的质量检测。我们同样拥有先进的 NGS 技术平台，能对 NGS 引物的交叉污染率进行检测。

### 我们的优势

- 优选合成原料，优化生产流程，确保极低的碱基错误率；
- NGS 接头引物交叉污染率≤0.05%；
- 关键质量指标动态批次间差异控制；
- 建立周期性质量跟踪体系并定期出具质量跟踪报告。

### NGS 流程及对应的引物原料

NGS 实验流程包含样品制备（核酸抽提 / 核酸制备）、文库构建、上机测序和生物信息学分析几个步骤。NGS 相关引物的应用主要体现在文库构建的步骤中。其中，全基因组测序仅需要进行片段化和加接头的文库构建步骤，而全外显子组测序和目标区域捕获除了文库构建的步骤还需要目标区域捕获的步骤。



类型	NGS 引物名称
文库构建	① 接头引物
	② 杂交捕获探针
目标区域捕获	③ 多重 PCR 引物
	④ 封阻引物 (Blocker)

### 订购信息

#### 1. 文库构建

NGS Adapter Primers  
NGS 接头引物

#### 定制接头引物

接头的本质是一段短的碱基序列，基本包括三个部分：与 Flow-cell 上面寡核苷酸相同或互补的片段 P5/P7；测序时测序引物结合部分 R1/R2；用于区分不同样本的 Index。接头是待测 DNA 片段与 Flow-cell 连接的桥梁，目的片段连接接头后可以在 Flow-cell 上扩增再测序。生工生物可以按您的要求定制各种不同类型的接头引物，并可提供独立单链、双链混合和双链退火三种不同形式分装的接头引物。

纯化方式	碱基范围	交付形态	包装形式	额外 QC	合成周期
<b>NGS 接头引物单链</b>					
HPLC_CE (IVD)	20~70 mer	干粉 液体	管装	纯度 (CE)	咨询
<b>NGS 接头引物双链预混 (不退火)</b>					
HPLC_CE (IVD)	20~70 mer	液体	管装	纯度 (CE)	咨询
<b>NGS 接头引物双链预混 (退火)</b>					
HPLC_CE (IVD)	20~70 mer	液体	管装	纯度 (CE)	咨询

#### 2. 目标区域捕获

##### Hybrid Capture Probes 杂交捕获探针

杂交捕获探针根据 DNA 碱基互补原理，设计与目标捕获区互补的 DNA 捕获探针（带 biotin 修饰）。在实验过程中，先将待捕获的基因组 DNA 构建标准 NGS 文库，进一步使用捕获探针与 NGS 文库杂交，然后使用链霉素磁珠富集杂交后的 DNA 文库，洗脱探针后进一步 PCR 文库即可 NGS 测序。

纯化方式	碱基范围	交付形态	包装形式	额外 QC	合成周期
<b>杂交捕获探针单管合成</b>					
HPLC	80~120 mer	干粉 液体	管装、96 孔板、 384 孔板	纯度 (CE)	咨询
<b>杂交捕获探针 (≥1000 条，可合成上万条)</b>					
HPLC	80~120 mer	干粉 液体	管装、96 孔板、 384 孔板	—	咨询

##### Multiplex PCR Primers 多重 PCR 引物

通过多重 PCR 的方法来进行目标区域捕获，适合大规模的样本和小片段 / 少位点的富集。和杂交探针捕获的方法比，常规情况下，多重 PCR 的费用也更加经济。

纯化方式	碱基范围	交付形态	包装形式	额外 QC	合成周期
<b>多重 PCR 引物单管合成</b>					
不限	18~60 mer	干粉 液体	管装、96 孔板、 384 孔板	纯度 (CE)	咨询
<b>多重 PCR 引物池</b>					
不限	18~60 mer	干粉 液体	管装、96 孔板、 384 孔板	—	咨询

## Blocker Primers 封阻引物 (Blocker)

### 定制 Blocker

NGS Blocker 引物通常用于捕获建库过程中阻止探针和接头的杂交，提高捕获测序的特异性。生工生物提供定制 Blocker 引物，并可出具包含纯度、分子量等信息的检测报告。

纯化方式	碱基范围	交付形态	包装形式	额外 QC	合成周期
HPLC	—	干粉 液体	管装	纯度 (CE)	咨询

## 引物池

引物池 (Oligo Pools) 即通过常规合成或芯片合成的方式，将 2 条到数万条引物制备成混合干粉或溶液。2 条双混引物可用于减少 PCR 制备反应体系的步骤，而多条引物混合的引物池可广泛用于高通量基因合成、CRISPR 的向导 RNA (sgRNA) 文库构建、NGS 靶向测序等。尤其是电化学半导体芯片引物合成技术，能在一张硅芯片上同时合成数万条引物，故也被称为“下一代的 DNA 合成技术”。

### 我们的优势

- 拥有三种不同的生产平台，可满足从小量到大量不同条数的需求；
- 能合成 120 mer，5' 端 Biotin 修饰的引物池，适合作为 NGS 测序靶向捕获探针；
- 可提供 COA 报告。

## Dual Premixed Oligo Pools 双链预混引物池

两条引物混合分装入一管 / 孔，免去了进行 PCR 实验前的预混步骤，可灵活选择纯化方式和修饰方式。可应用于 PCR、qPCR 等下游实验。

每池引物数	合成量 / 条	单条长度	可选修饰	额外 QC	合成周期
2	不限	≤ 130 mer	不限	纯度 (CE)	咨询

## Multiple Premixed Oligo Pools 多混引物池

通过专有的技术和生产工艺可一次性合成上万条从 fmol 级到大规模的引物或探针，可灵活选择纯化方式和修饰方式。可应用于高通量基因合成、CRISPR 的向导 RNA 文库 (sgRNA) 构建、NGS 靶向测序等下游实验。

每池引物数 *	合成量 / 条	单条长度 **	可选修饰	额外 QC	合成周期
3~10,000	不限	≤ 200 mer	不限	纯度 (CE)	咨询

备注:

\* 芯片引物池合成技术尚在测试阶段；

\*\* 合成长度 ≥ 130 mer 的情况请咨询技术支持。

## 4 引物合成目录产品

### PCR 引物

## Random Amplified Polymorphic DNA Primers RAPD 引物

RAPD 技术是以 10 mer 的随机寡核苷酸片段作为引物，对基因组进行 PCR 扩增，扩增产物通过琼脂糖凝胶电泳或 PAGE 电泳检测，研究 DNA 的多态性，即反应了基因组相应片段由于碱基发生缺失、插入、突变、重排等所引发的 DNA 多态性。

纯化方式	碱基长度	交付形式	包装形式	额外 QC	合成周期
HPLC	10 mer	液体 / 干粉	管装	-	≤ 5 工作日

备注:

具体详见生工官网。

## Endogenous Reference Genes Primers 内参引物

在研究不同细胞类型、发育阶段、和 / 或样品处理时，内源性参照基因的选择就至关重要。内参基因通常是各种看家基因，在细胞内组成稳定性表达，有助于保持细胞的功能。生工根据 GenBank 上公布的序列，通过 BLAST 搜索和实验验证，推出了高特异性的内源性参照基因的引物。

内参基因名称	种属	内参基因名称	种属
ACTB	大鼠、小鼠、鸡、猪、人	RPLP0	小鼠、人
B2M	大鼠、小鼠、人	RPLP1	大鼠
GAPDH	大鼠、小鼠、鸡、猪、人	RPS16	大鼠
HMBS	大鼠	RPS18	大鼠、小鼠、人
HPRT1	大鼠、小鼠、人	SDHA	大鼠、小鼠
PGK1	大鼠	TBP	大鼠、小鼠、人
PPIA	大鼠、小鼠、人	TFRC	人
RPL13A	大鼠	UBC	大鼠、小鼠、人
RPL32	人	YWHAZ	大鼠、人

备注:

具体详见生工官网，直接搜索“内参引物”即可。

## ● 测序引物

### Universal Primers 通用引物

通用引物是一般和载体多克隆位点两旁的序列匹配，或是与载体里面的一些启动、终止元件匹配，目的是扩出 DNA 片段，主要用来进行测序。

名称	通用引物序列	名称	通用引物序列
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	C-MYCREV	CTCTTCTGAGATGAGTTTTTG
1492R	GGTTACCTTGTACGACTT	Colidown	ATCAGCCTAGGAACGCCAAC
86F	GCTCAGTAACACGTGG	CYC1	GCGTGAATGTAAGCGTGAC
1340R	CGGTGTGTGCAAGGAG	DuetDOWN1	GATTATGCGGCCGTGTACAA
357F	CCTACGGGAGGCAGCAG	DuetUP1	GATCTCGACGCTCTCCCT
518R	ATTACCGCGGCTGCTGG	DuetUP2	TTGTACACGGCCGCATAATC
8F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	EBV-R	GTGGTTTGTCCAACTCATC
1541R	AAGGAGGTGATCCAGCC	GAL4AD	TACCACTACAATGGATG
16F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	GAL4BD	TCATCGGAAGAGAGTAG
1405F	TGYACACACCGCCCGT	GLp1	TGTATCTTATGGTACTGTAACTG
456R	CCTTCCCTCACGGTACTG	GLp2	CITTTATGTTTTTGGCGTCTTCCA
907R	CCGTC AATTCCTTTRAGTTT	GPD-promoter-F	CGGTAGGTATTGATTGTAATTCTG
341F	CTAGGGMSGCAGCAG	H1	TCGCTATGTGTTCTGGGAAA
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	M13+	AGGGTTTTCCAGTCACG
ITS2	GCTGCGTTCATCATGATGC	M13-47	AGGGTTTTCCAGTCACG
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	M13	GAGCGGATAACAATTCACAC
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	M13-48	GAGCGGATAACAATTCACAC
-96III	CCCTCATAGTTAGCGTAACG	M13F	GTTGTAACGACGCGCCAG
5AD	AATACCACTACAATGGATGATG	M13-20	GTTGTAACGACGCGCCAG
3AD	GAGATGGTGCACGATGCACAGT	M13R	CAGGAAACAGCTATGAC
5BD	GTGCGACATCATCATCGGAAG	M13-26	CAGGAAACAGCTATGAC
3BD	TAAGAGTCACITTTAAAATTTGTATC	M13-40	GTCGTGGACTGGGAAAAC
5AOX	CTGGTTCCAATTGACAAGC	M13-D	AGGGTTTTCCAGTCACG
3AOX	TGGCATTCTGACATCCTC	RV-M	GAGCGGATAACAATTCACAC
a-factor	TACTATTGCCAGCATTGCTGC	malefor	GGTCGTCAGACTGTCGATGAAGCC
BAC1	AACCATCTCGCAATAAATA	MSCV-F	CCCTTGAACCTCCTCGTTCCGACC
BAC2	ACGCACAGAATCTAGCGCTT	PMSCV-R	GAGACGTGCTACTTCCATTTGTC
BGH	CAGGGTCAAGGAAGGCAC	N26FOR	CATCATAACGGTTCTGGC
CaMV35S-f	GCTCCTACAAATGCCATCA	NL1	GCATATCAATAGCGGAGGAAAAG
CaMV35S-r	GATAGTGGGATTGTGCGTCA		

名称	通用引物序列	名称	通用引物序列
PBI121(35S)	GACGCACAATCCCACTATCC	NL4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG
CMV-F	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG	NOS-F	CACCTGATCCCAGCTTGC
CMV-R	TCGTTGGGCGGTCAGC	NOS-R	CGTCCAGCTCCATGTTGC
CMV-24	TATTAGGACAAGGCTGGTGGGCAC	NS1	GTATCATATGCTTGTCTC
CMV-30	AATGTCGTAATAACCCCGCCCGTTGACGC	NS6	GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC
NS8	TCCGCAGGTTACCTACGGA	PETBlueDOWN	ATAGCTTTAATGCGGTAGTT
P1	CCAGGCTTTACTTTATGC	pETUpstream	ATGCGTCCGCGTAGA
P2	GCGATTAAGTTGGTAACGC	pFastBac-F	TGAAGTGGTTCGCATCCTC
P5	TGCGTACTGCGGTGATCAAC	pFastBac-R	TGGACAAACCACAAGTAGAATG
P3	CTGCAAGGCGATTAAGTTGG	pFastBac-PH	AAATGATAACCATCTCGC
P10-PROFOR	CGGACCTTTAATTCACCC	pGAPforward	GTCCCTATTTCATCAATTGAA
PACGP67RV	TTGGTCTTTCGCGGTC	pGEX5	GCAAGCCACGTTTGGTG
pADTrack-F	GGGCCATTTACCGTAAGT	PGEX3	GAGCTGCATGTGTCAGAGG
PAS2-1F	TCATCGGAAGCGAGTAG	pGL3+	TAGCAAATAGGCTGTCCC
PAS2-1R	CGTTTTAAACCTAAGAGTCAC	pGL3-	CTTTATGTTTTTGGCGTCTTC
PB42ADF	CCAGCCTCTTGTGAGTGGAGATG	PinPoint-Primer	CGTGACGCGGTGCAGGGCG
PB42ADR	AAGCCGACAACCTTGATTGGAG	PIRES2-EGFP.P5	GTAGGCGTGTACGGTGGGAG
PBABE3	ACCCTAACTGACACACATTCC	PIRES2-EGFP.P3	AACGCACACCGCCTTATTC
pBABE5	CTTTATCCAGCCCTCAC	pFlag-CMV-F	GGTAGGCGTGTACGGTGG
PBAD-F	ATGCCATAGCATTTTTATCC	pFlag-CMV-R	GCACTGGAGTGGCAACTT
PBAD-R	ATCTGTATCAGGCTGAAAATC	pJET1.2F	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC
PBRrevBam	GGTGATGTCGGCGATATAGG	pJET1.2R	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG
PBV220+	GGGCAGCATTCAAAGCAG	pLEXA-F	CGTCAGCAGAGCTTCCACCAT
PBV220-	TTATCAGACCGCTTCTGC	pLEXA-R	TAAAACCTAAGAGTCACTTT
PCDNA3.0F/F2	CTCTGGCTAACTAGAGAACC	pLNCX-F	AGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCG
PCDNA3.0R/R2	GGCAACTAGAAGGCACAGTC	pLNCX-R	ACCTACAGGTGGGCTTTTCCATTCCC
PCDNA3.1F	CATGAGAACCCACTGCTTAC	pLVX-R	ACTTGTGGCCATTACAT
PCDNA3.1R	TAGAAGGCACAGTCGAGG	PLXSN-5	CCCTTGAACCTCCTCGTTCCGACC
PCEP-F	AGAGCTCGTTTAGTGAACCG	PLXSN-3	GAGCCTGGGGACTTCCACACCC
pCMV5-F	TCTAAAAGCTGCGGAATTGT-3	PPC86-F	TATAACGCGTTTGAATCACT
pCMV5-R	TCCAAACTCATCAATgTATC-3	PPC86-R	GTAATTTCTGGCAAGGTAGAC
PDC316-F	ACGTGGGTATAAGAGGCG	pQE30+	GTGAGCGGATAACAATTTAC
PDC316-R	CGATGTAGACGATCCAG	pQE30-	CTGAACAAATCCAGATGGAG
pDSRED-C1-F	AGCTGGACATCACCTCCCACAACG	pRNA-U6Forward	TACGATACAAGGCTGTTAGAGAG
pDsRed1-N	GTAAGGAACTGGGGGACAG		
pDonr-For	CTGGCAGTTCCTACTCTCG		
pDonr-Rev	TGTAACATCAGAGATTTTGGACAC		



名称	通用引物序列
PEF-F	TCAAGCCTCAGACAGTGGTTC
pEGFP-N5	CGGTGGGAGGTCTATATAAG
pEGFP-N3	GTCGCCGTCCAGCTCGACCAG
pEGFP-C5	CATGGTCTGCTGGAGTTCGT
pEGFP-C3	TATGTTTCAGGTTTCAGGG
pShuttle-CMV-R	GTGGTATGGCTGATTATGATCAG
PT5	TCCGAGATCTGGACGAGC
pTarget.F	CCAGGATTTCCAGTCAC
pTarget.R	GGCTTTACACTTTATGCTTC
PTARGET-SEQ	TTACGCCAAGTTATTTAGGTGACA
PTRC99C-F	TTGCGCCGACATCATAAC
PTRC99C-R	CTGCGTTCTGATTTAATCTG
PTRCHISA-F	CTGCGTTCTGATTTAATCTG
PTRCHISA-F	CATGGTATGGCTAGCATGAC
PTRCHISA-R	CAGGCTGAAAATCTTCTCTC
RFP-Nrev	GTTACGGTGCCCTCC
RV3	CTAGCAAAATAGGCTGTCCC
RV4	GACGATAGTCATGCCCGCG
S1	CAACGTGAAAAAATTATTATTCGC
S6	GTAAATGAATTTCTGTATGAGG
SP6	ATTTAGGTGACACTATAGAA
S-TAG	CGAACGCCAGCACATGGACA
SV40	GGAGGCTTTTTGGAGGC
T7	TAATACGACTCACTATAGG
T3	ATTAACCCTCACTAAAGG
T7-TER	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
TRX-FORWARD	TTCCTCGACGCTAACCTG
TRX-REVERSE	TGTAACGACGGCCAGTGC
TRX-F	CATATGAGCGATAAAATTATTCAC
TRX-R	GGATCCCTTGTCATCGTCATCACCA
U6-renyuan	ATGGAATCATATGCTTACCGTA
U6-shuyuan	CAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGAC
U6-PROFOR	CCGTAACCTGAAAGTATTTCCG
2.0revprimer	AGGCGATTAAGTTGGGTA
3.0rev	GAGTTAGCTCACTCATTAGGC
5TriplEx2	CTCCGAGATCTGGACGAGC
17BASE	ACATCCACTTTGCCCTTCTC

名称	通用引物序列
psi-check2-F	ATGGGTAAGTACATCAAGAG
psi-check2-R	GAGGTCCGAAGACTCATTAA
PSilencer4.1-F	AGGCGATTAAGTTGGGTA
PSilencer4.1-R	CGGTAGGCGGTGACGGTG
pShuttle-CMV-F	GGTCTATATAAGCAGAGGTG
Amp-F	TGAGATCCAGTTCGATGTAA
Amp-R	TCAGGCAACTATGGATGAAC
Kan-F	ATTCTCACCGGATTCAGT
Kan-R	GTCTGACCATCTCATCTGTA
pCold-F	GTAAGCACGCCATATCGC
pCold-R	CCAAATGGCAGGGATCTTAG
PA	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
PB	AGGAGGTGATCCAGCCGC
PLL3.7-F	AACTATAGAGGCTTAATGTG
puc57-F	GCCATTCGCCATTTCAGG
puc57-R	TAGCTCACTCATTAGGCAC
Kan-P1	AACTCATCGAGCATCAAATG
Kan-P2	CTCTAGGCCGCGATTAAATTC
3C-forward	CTTCCTGTTAGTTAGTTACTTAAGC
3C-reverse	GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC
PCAG-F	GCAACGTGCTGGTTATTGTG
PTRCHISA-RV	ATCTGTATCAGGCTGAAAATC
PBAD-RV	ATCTGTATCAGGCTGAAAATC
PYES2-R	GCGTGAATGTAAGCGTGAC
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC
V5reverse	ACCGAGGAGAGGGTTAGGAT
L14724	GACTTGAAAAACCACCGTTG
H15915	CTCCGATCTCCGATTACAAGAC
EF-1aF	TCAAGCCTCAGACAGTGGTTC
PLKO.1-5	GACTATCATATGCTTACCGT
Lco1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG
Hco2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA
WPRE-R	CATAGCGTAAAAGGAGCAACA
LR0R	GTACCCGCTGAACTTAAGC
LR5	ATCCTGAGGGAAACTTC
PCAGGS-F	ATGTTTCATGCCTTCTTCTTT
PCAGGS-R	TTCCTTTATTAGCCAGAAGT

## ● NGS 引物探针

### 文库构建相关引物

#### SanNGS UDI Adapters for Illumina SanNGS UDI 接头引物 (适用于 Illumina)

本试剂盒是适配 Illumina 高通量测序平台文库构建的接头试剂盒，包含两种组分，其中 Adapter 用于末端修复 tail A 之后 DNA 或者 cDNA 的连接反应；index 引物用于后续扩增文库，文库经过长度分选之后，即可上机测序。本试剂盒 index 采用主流的 8 碱基双端唯一（也称 UDI）接头，可以有效防止 Illumina 平台标签跳跃（index hopping）现象导致的数据交叉污染。本试剂盒可满足多样品 Illumina 文库构建，试剂盒内的组分经过严格质检，尽可能地降低了交叉污染比例，可以尽力保证文库构建过程的稳定性及可靠性。

特点：

- Adapter 序列更短些，结构更稳定；
- DNA 连接产物可以通过少数几个 PCR 循环，快速获得新 index 组合文库。当文库出现 index 重复的时候，只需要将其中一个文库的连接产物更换 index 引物重新扩增 8~10 个循环即可快速获得新的 index 文库，几乎不耽误测序进度。

产品编号	品牌	组分
<b>SanNGS UDI 接头引物用于 Illumina 平台，index 1~12 (48 Rxn/192 Rxn)</b>		
H591001	生工	index 1~12 10 µl each + short Adapter, 120 µl
		index 1~12 40 µl each + short Adapter, 120 µl x 4
<b>SanNGS UDI 接头引物用于 Illumina 平台，index 1~24 (96 Rxn/384 Rxn)</b>		
H591002	生工	index 1~24 10 µl each + short Adapter, 120 µl
		index 1~24 40 µl each + short Adapter, 120 µl x 4
<b>SanNGS UDI 接头引物用于 Illumina 平台，index 1~96 (384 Rxn/1536 Rxn)</b>		
H591003	生工	index 1~96 10 µl each + short Adapter, 120 µl
		index 1~96 40 µl each + short Adapter, 120 µl x 4

### 靶向捕获相关引物

#### SanNGS Universal Blocker for Illumina TruSeq Library SanNGS 通用 Blocker 引物 (适用于 Illumina TruSeq 文库)

SanNGS 通用 Blocker 引物（适用于 Illumina TruSeq 文库）在进行液相探针杂交捕获时使用，可有效阻断 Adapter 之间互相结合，提高探针捕获的特异性和中靶率。如果不添加 Blocker 引物，液相 DNA 杂交捕获过程中，极有可能形成杂交结构。Blocker 的主要作用就是阻止上述结构的形成，从而提高捕获中靶率。

特点：

- 阻封效能高，价格低；
- 不需要一对一的添加，可以一对多使用，主要是阻封 Illumina TruSeq 系列双端 8 碱基接头；
- 可接受定制。

产品编号	品牌	规格
<b>通用 Blocker 引物 (适用于 Illumina TruSeq 文库)</b>		
H592001	生工	8/16/96 Rnx

## 全基因组扩增引物

### Multiple Displacement Amplification Primers MDA 引物

MDA 技术即多重置换扩增技术，需要使用多种引物六聚体和 φ29DNA 聚合酶。引物六聚体先随机结合到 DNA 模版上，在 φ29 DNA 聚合酶调节下延伸，当遇到另一条新链随机引物时，φ29 DNA 聚合酶替换引物，继续延伸，形成支链结构，新的引物和聚合酶会在支链上重新结合延伸，所形成的 DNA 片段一般为 50~100 kb。引物六聚体是由 6 个随机核苷酸组成的，用于扩增全基因组。

纯化方式	碱基长度	交付形态	包装形式	额外 QC	合成周期
HPLC	6 mer	干粉 液体	管装	—	≤5 工作日

### Degenerate Oligonucleotide Primed PCR Primers DOP PCR 引物

DOP PCR 技术即退化寡核苷酸引物 PCR，是随机扩增得到全基因组序列的。该技术需要使用简并配对引物，即类脱氧肌苷引物，它可以结合到 DNA 任何部位。引物的 3' 端为 6 bp 退化寡核苷酸，5' 端为正常的碱基，引物中间部分含有 6 个随机碱基。3' 端和 DNA 链随机结合，最初几个循环退火温度要低（30°C 左右），然后延伸直到 5' 端引物配对处。

纯化方式	碱基长度	交付形态	包装形式	额外 QC	合成周期
HPLC/ULTRAPAGE	20~35 mer	干粉 液体	管装	—	≤5 工作日

### Multiple Annealing and Looping-Based Amplification Cycles Primers MALBAC 引物

MALBAC 技术即多次退火环状循环扩增技术，MALBAC 所用引物 5' 端为固定的 27 个碱基通用序列，3' 端 8 个随机碱基序列。

纯化方式	碱基长度	交付形态	包装形式	额外 QC	合成周期
HPLC	35 mer	干粉 液体	管装	—	≤5 工作日

### Primerextension Preamplification Primers PEP 引物

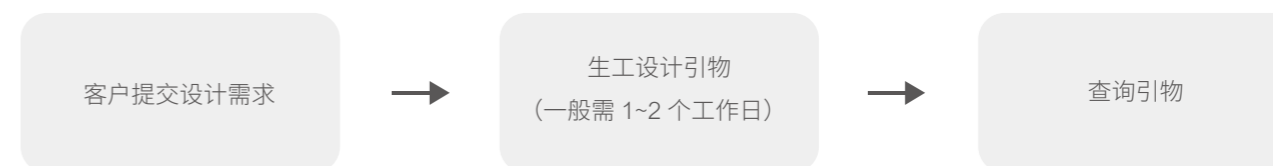
PEP 技术即引物延伸预扩增技术，使用 15 个碱基长的随机引物（N15），在 37°C 的低退火温度下进行较长时间的退火，然后缓慢升温至 55°C 进行长时间的引物延伸，如此反复多个循环。

纯化方式	碱基长度	交付形态	包装形式	额外 QC	合成周期
HPLC	15 mer	干粉 液体	管装	—	≤5 工作日

## 5 相关说明及问题解答

### ● 引物设计服务

#### 服务流程



生工生物官网（www.sangon.com）为注册用户提供免费引物设计服务。您可以登录官网后通过首页导航栏或引物合成详情页中点击对应的按钮或链接进入，您也可以直接在浏览器网址栏中输入以下链接地址进入：

<https://www.sangon.com/newPrimerDesign#>



引物设计服务的范围，可满足分子生物学研究的绝大部分需求，具体如下：

类型	对应实验需求
扩增全长	基因克隆、载体构建、常规 PCR 扩增目的基因等
常规 PCR	基因表达的半定量研究，测序检测靶标位点的序列等
染料法 qPCR	染料法 qPCR 检测长链 RNA 的表达量、靶基因含量等
探针法 qPCR	TaqMan 探针法 qPCR 检测长链 RNA 的表达量、靶基因含量，MGB 探针法 SNP 分型等
miRNA qPCR	qPCR 检测小 RNA 的表达量（包含加尾法、茎环法逆转录方式）

生工生物引物设计服务均由人工完成，采用的设计软件均为业界权威设计软件，能在一定程度上保证引物设计结果的可靠性及准确性。

## 引物设计需求表

生工® Sangon Biotech

产品中心 技术服务 客户专区 在线订购 联系我们

编号/名称/别名/CAS/MDL/EC/分子式

首页

**订购中心**

免费引物设计

DNA 合成

DNA 测序

基因 订购

**我的订单**

我的购物车

产品订单

合成订单

测序订单

引物设计列表

基因订单

**积分优惠券**

查看积分记录

查看优惠券

积分商城

积分订单

**账户中心**

账户信息

试用装申请

地址管理

负责人管理

**交易对帐**

对帐单

发票信息

**小E在线**

有问题找小E, 小E来帮您!

我要提问

**免费引物设计** 上传您的引物设计订单 批量上传条数上限为20, 超过将上传失败, 如超过此值, 请分开批量上传。

**服务说明**

我们为在生工生物网站注册的用户提供免费的引物设计服务。我们在设计时尽可能选择理论上最佳的结果, 但不保证引物的应用效果, 请您务必自行检测引物的可行性, 并确认是否符合您所实验的要求。

请仔细以下表单, 如需帮助请点击帮助按钮 或联系人工在线客服

**1. 您所要的引物是用于以下哪种实验的?**

1. 扩增全长 (如需添加酶切位点, 请在备注中注明)

2. 常规PCR (产物长度200~400 bp, 可用于半定量检测)

3. mRNA染料法荧光定量PCR (可用于定量检测)

4. mRNA Taqman探针法荧光定量PCR

5. mRNA MGB探针法荧光定量PCR

6. microRNA加尾法荧光定量PCR

7. microRNA茎环法荧光定量PCR

**2. 您的目的基因属于哪个物种?**

Human  rat  mouse  其他 (请注明)

**3. 基因名称 (只能填写一个)**

**4. 请您填写基因序列 (只能填写一个)**

模板序列查找方法请点击序列框上方的绿色问号按钮

**5. 基因ID**  (选填, 仅用于人和鼠的mRNA染料法荧光定量PCR, 填写NCBI的基因ID, 您将有可能立即得到引物数据库中的结果。如果提交重新设计的订单, 请勿填写此项。 [点此查看详细说明](#))

**6. 备注**

注: 1. 若是microRNA, 请注明逆转录使用的是茎环法还是加尾法, 如果是加尾法请提供下游引物Tm值 (Tm值具体咨询试剂盒公司)  
2. 若需要扩增序列全长, 请在备注中注明 3. 若需要扩增特定位置的碱基或序列, 请注明其在序列中的bp范围 4. 若需要设计探针, 请在备注中注明其类型, 目前提供Taqman及MGB探针的设计

## 填写说明

### 1. 选择设计引物的实验类型

#### 1) 扩增全长

该 PCR 类型常用于基因回路或质粒构建等, 设计出的引物将会把您提交的序列的全长都扩增出来。如需添加酶切位点, 请务必将 5' 端、3' 端的酶切位点填写在备注栏中。如涉及到序列的改变 (如去除终止密码子或移码等), 请在备注中说明。

#### 2) 常规 PCR

该 PCR 类型常用于粗略检测 mRNA 表达量变化或者检测目的 DNA 片段的有无等。在提交序列的任意位置进行设计, 设计出的引物扩增产物的大小为 200~400 bp, 方便观察电泳条带或进行半定量检测。

#### 3) mRNA 染料法荧光定量 PCR

染料法是荧光定量 PCR 的类型之一, 体系中含有 SYBR Green I 或者 Eva Green 等染料, 用于实时检测样本中基因的表达量变化。该 PCR 类型的扩增产物大小通常为 80~300 bp, 需提交基因的编码序列, 在提交序列的任意位置进行设计, 设计出的引物序列可以进行 Primer-Blast 特异性预测。

#### 4) mRNA TaqMan 探针法荧光定量 PCR

探针法是荧光定量 PCR 的类型之一, 扩增产物大小通常为 80~200 bp, 设计结果包括一对扩增引物和一条特异性探针序列。TaqMan 探针的长度为 25~32 bp, Tm 值为 69~72°C。合成探针时需在 5' 端添加荧光基团, 3' 端添加对应的淬灭基团。得到结果后可先合成引物进行扩增性质的检测, 引物扩增没问题后再进行探针的合成。

#### 5) mRNA MGB 探针法荧光定量 PCR

MGB 探针通常用于 SNP 分型检测。合成探针时建议在 5' 端添加 FAM 荧光基团, 3' 端必须选择 MGB 基团。得到结果后可先合成引物进行扩增性质的检测, 引物扩增没问题后再进行探针的合成。

#### 6) microRNA 加尾法荧光定量 PCR

该 PCR 类型需搭配 microRNA 加尾法逆转录试剂盒使用, 设计结果仅包括一条正向引物 F。逆转录 RT 引物与 qPCR 的反向引物 R 通常包含在逆转录试剂盒中。提交基因序列时请提交成熟 miRNA 的编码序列。需在备注中标明逆转录试剂盒中提供的反向引物 R 的 Tm 值。

#### 7) microRNA 茎环法荧光定量 PCR

该 PCR 类型需搭配 microRNA 茎环法逆转录试剂盒使用, 不建议使用常规逆转录试剂盒。设计结果包括正反引物以及茎环法逆转录引物。提交基因序列时请提交成熟 miRNA 的编码序列。

### 2. 填写靶序列对应的物种

填写物种的目的主要用于设计引物的特异性预测, 保证设计出的 qPCR 引物在对应物种中, 理论上只能结合靶标基因并进行扩增。

### 3. 填写靶标序列的名称

用于客户识别订单, 客户提交序列核实等。





## 引物溶液的保存

通过检测引物处于不同温度下的稳定性，我们发现储存引物的最佳温度为 -20°C。在此温度条件下，已经溶解在 TE 缓冲液中的液体引物可以获得至少 6 个月的有效期；而干粉引物，可以获得至少 12 个月的有效期。引物在 4°C 温度下至少能够维持一个月的时间，不推荐在更高的温度下保存引物，其降解速率会明显升高。

虽然推荐将引物溶液储存在 -20°C，但是再次使用时需要将其完全融化，切勿未融化完全就吸取。需注意的是，反复冻融会降低引物的纯度，因为体系物理状态的变化会加速引物的降解。所以推荐先配制母液后稀释配制工作液的使用方法，如果您的引物要在短时间内反复使用，建议将母液放置于 -20°C，工作液可以放在 4°C。

除了上述要点，对于有荧光标记的引物如探针，还需要做额外的避光处理。通常情况下，TE 储存的荧光标记引物在 -20°C 储存两年后，荧光信号值会下降 20%。对于荧光标记引物，尤其是 Cy 系列及 FAM 荧光基团，必须采用避光包装进行储存，生工生物的所有荧光标记引物均采用了避光棕色管储存。如果配制工作液时使用透明管，可以用锡箔将工作液管完全包裹以避免长时间的光漂白作用。

## ● 引物的相关参数

以下介绍以 FAM-ATATTCGTAC-BHQ1 链为例：

### 长度

这里的长度并不是指其物理拉伸状态下的长度，而是指寡核苷酸链中单核苷酸残基的数量，如果修饰基团属于单核苷酸残基类似物，则也计算在内。案例中的引物链，寡核苷酸链序列为 ATATTCGTAC，其长度为 10 mer，mer 是 Monomeric Unit 的缩写，也有使用 nt 或 base 为单位的，以上三种单位的含义完全一致，单位使用时可直接互换。

### GC 含量

寡核苷酸链中鸟嘌呤（G）和胞嘧啶（C）核苷酸的摩尔百分比。案例中 10 mer 的引物链含有 3 个 G 和 C，因此其 GC 含量为 30%。

### Tm 值（熔解温度）

熔解温度 (Melting Temperature, Tm) 是指体系中有 50% 的引物与其模板互补配对时的温度。生工生物引物合成报告单中，Tm 计算是按照最近邻二态模型进行的，并加入了盐离子的矫正。基本算法为：

$$Tm(K) = \frac{\Delta H}{\Delta S + R \times \ln[Oligo]}$$

$$\frac{1}{Tm^*} = \frac{1}{Tm(K)} + (4.29 \times f^{GC} - 3.95) \times 10^{-5} \times \ln[Na^+] + 9.40 \times 10^{-6} \times \ln^2[Na^+]$$

参考文献：DOI: 10.1021/bi962590c, DOI: 10.1021/bi034621r。

#### 注意：

- 1) 此数值仅供参考，并不代表实际实验数据。不同的工具采用的公式和参数可能不同，因此得到的结果会略有差异；
- 2) 如果序列中存在简并碱基，则按照简并碱基所代表碱基数据的平均值进行计算；
- 3) 某些会改变 Tm 值的修饰，如锁核酸、MGB 基团等对 Tm 值的贡献不在计算范围内。

## 分子量

分子量指 1 摩尔寡核苷酸链的质量，计算方式为组成寡核苷酸链中所有原子质量的累加。算法为：

$$MW = (A \times 313.209) + (C \times 289.184) + (G \times 329.208) + (T \times 304.196) - 61.964 + \text{修饰基团分子量}$$

算式中 ACGT 指引物中相应碱基的数量。按照此算法，案例中的引物的分子量为 MW = (3 × 313.209) + (2 × 289.184) + (1 × 329.208) + (4 × 304.196) - 61.964 + 537.6 (FAM) + 554.5 (BHQ1) = 4094.15 g/mol。

## 摩尔消光系数

摩尔消光系数 (ε<sub>260</sub>) 是指 1 摩尔寡核苷酸链水溶液在 260 nm 处的吸光值。该数值决定于寡核苷酸链质量与合成 OD 值的关系。组成碱基种类随机的情况下，可以近似认为 DNA 双链 1 OD 的量为 50 μg，单链寡核苷酸 1 OD 的量为 33 μg。但对于客户定制的寡核苷酸链，需要根据序列进行计算。生工生物采用最近邻二态模型进行消光系数的计算，参考数据为 Michael 于 2003 年发表于《Nucleic Acids Research》的文章 (DOI: 10.1093/nar/gnh015)。

算法公式：

$$\epsilon_{260} (L/(\text{mole} \cdot \text{cm})) = 2 * \sum_1^{n-1} \epsilon_{NN} - \sum_2^{n-1} \epsilon_N + \sum_1^n \epsilon_{mod}$$

其中 ε<sub>NN</sub> 是相邻两个核苷酸的综合摩尔消光系数，ε<sub>N</sub> 是单碱基的摩尔消光系数，ε<sub>mod</sub> 是修饰基团的摩尔消光系数。

## 定量

生工生物引物 DNA 采用多种定量方式，主要是以 OD<sub>260</sub> 值来计量的。在 1 cm 光程标准石英比色皿中，260 nm 波长下吸光度为 1 的引物溶液，其浓度定义为 1 OD<sub>260</sub>/ml。虽然对于每种特定的寡核苷酸来说，其碱基的组成不尽相同，但 1 OD<sub>260</sub> 引物 DNA 的重量约为 33 μg，每个碱基的平均分子量约为 330 Da。

对于 DNA 的精确定量，生工生物采用的是朗伯比尔定律 (Lambert-Beer law) 计算方法。根据引物 DNA 的摩尔消光系数，可计算出每 OD 所含的寡核苷酸链的分子量以及质量。经过简化的计算公式为：

$$\text{nmole}/OD_{260} = 10^6/\epsilon_{260}$$

$$\mu\text{g}/OD_{260} = \text{nmole}/OD_{260} \times \text{molecular weight} \times 10^{-3}$$

由上述两个公式，继而可以推导出，某个引物溶液的浓度 (μM) = A<sub>260</sub>/ε<sub>260</sub> × 10<sup>6</sup> (A<sub>260</sub> 指该引物溶液在 260 nm 处，1 cm 光程时的吸光值)



## ● 常见问题解答

### Q：引物在常温下运输，会降解吗？

A：不会降解，干燥的引物在常温至少可以稳定存放两周以上。而一般的运输时间通常都在 1~3 天，所以您收到的引物不会降解。

### Q：如何测定引物溶液的 OD 值？

A：用紫外分光光度计在 260 nm 波长下测定溶液的吸光度来定量，测定时溶液的吸光度最好稀释到 0.2~0.8 之间（吸光度太高或太低会有较大的误差）。引物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 1 ml 并在 1 ml 标准比色皿中测定其吸光度，即为所测体积的 OD 值，进而可以计算出母液的 OD 值。

举例：您拿到一管干粉的引物，用 1 ml 水溶解成母液，取该母液 50  $\mu$ l 稀释成 1 ml 并在 1 ml 标准比色皿中测定的吸光度为 0.25，说明该 50  $\mu$ l 中含有 0.25 OD 的 DNA，也即说明原来 1 ml 母液中含有 5 OD 的 DNA。

### Q：怎样溶解引物？

A：我们的的合成报告单给出了每 OD 引物稀释为 100  $\mu$ mol/L（即 100 pmol/ $\mu$ l）浓度的加水量，您可以根据您的实验需要加入适量的无核酸酶的双蒸水（pH $\geq$ 7.0）或 TE 缓冲液（pH 7.5~8.0），开启瓶盖溶解之前最好在 3,000~4,000 rpm 的转速下离心 1 min，防止开盖时引物散失。我们强烈建议引物使用 TE buffer（产品编号 B548106）溶解，TE buffer 的组分为 10 mM Tris, 1 mM EDTA（pH 8.0），但高浓度的 EDTA 同样会干扰后续相关实验，如 PCR 和测序。因此，为了后续实验的正常进行，建议使用 TE 配制母液，用水稀释工作液，或者使用 0.1X TE buffer 配制工作液。

### Q：使用 DEPC 水溶解引物可以吗？

A：不推荐，DEPC 水偏酸性，会使引物降解。

### Q：能否根据引物电泳后 EB 染色后条带的亮度对合成的引物进行定量？

A：不能。因为 EB 是通过嵌入到核酸的双螺旋而使其着色的。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。由于不同引物的序列不同，形成双螺旋的能力不同，因此染色能力不尽相同，也就不能根据 EB 染色条带的亮度来对合成的引物进行定量。

### Q：如何使用 PAGE 检测引物的纯度？

A：使用加有 7M 尿素的一定浓度的聚丙烯酰胺凝胶进行电泳，小于 12 个碱基的引物用 20% 的胶，12~60 个碱基的引物用 16% 的胶，大于 60 个碱基的引物用 12% 的胶，取 0.2 OD 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 $^{\circ}$ C, 2 min）后再进行电泳，一定时间后检测带型，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，可能是引物多聚体条带，主带之下也可能会有条带，可能是引物自身形成高级结构导致）。

### Q：可以根据引物的 $A_{260}/A_{280}$ 来判断引物的纯度是否合格吗？

A：不推荐。合成的 DNA/RNA 序列很短（通常在 20~30 个碱基之间），其中 A、G、C、T、U 各种碱基所占比例不相同，由于各种碱基的摩尔消光系数不同，因此不同碱基构成的引物的  $A_{260}/A_{280}$  比值也不同，例如当序列中 C、T 碱基的含量高时，该比值会大大低于 1.8，所以不能用  $A_{260}/A_{280}$  的比值来判断引物的纯度。下表是一个 20 mer 同聚体引物的  $A_{260}/A_{280}$  的比值，清楚表明  $A_{260}/A_{280}$  的比值与引物的碱基组成密切相关。

引物序列	$A_{260}/A_{280}$
5-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-3	2.50
5-GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG-3	1.85
5-CCCCCCCCCCCCCCCCCCC-3	1.15
5-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3	1.14
5-AAAAAGGGGGTTTTTCCCC-3	1.66

### Q：使用琼脂糖凝胶电泳分析合成的引物，发现有很多条带，为什么？

A：对引物进行电泳一定要使用变性 PAGE 电泳。由于引物是单链 DNA，容易形成复杂的立体结构，因此进行 Agarose 电泳时，容易出现多条泳带，更无法用 Agarose 电泳进行定量了。

### Q：一般合成的引物在 5' 和 3' 末端有磷酸基团吗？

A：没有，5' 和 3' 末端均为 -OH 基。如需要加磷酸基团，订货时请特别注明，此时需收取磷酸化的费用。

### Q：PCR 产物经克隆后，测序发现引物区与合成序列不相符合，怎么办？

A：我们认为这多数是 PCR 过程和克隆过程中引入的错误。遇到这种情况，请您：

- 1) 可以要求我们重新免费合成引物；
- 2) 重新挑取克隆测序，会有找到正确克隆的可能。

### Q：引物合成粗产物中含有什么杂质？

A：DNA 合成仪合成的粗产物，其中除了含有所需的目的 DNA 片段以外，还含有合成反应过程中产生的目的片段短的失败片段以及脱保护基团产生的铵盐，生工生物提供的引物已全部通过纯化去除短片段、通过脱盐去除盐分。

### Q：有时候干燥后的引物呈黄褐色，这是 DNA 的本身颜色吗？

A：合成的引物可能呈黄褐色，白色或者透明色，这与引物的碱基组成和合成的制备过程有关，序列中 A 和 G 含量多的以及 OD 值大的引物通常呈黄褐色，呈黄褐色的引物不会对实验产生任何影响。

### Q：合成的引物进行 PCR 反应时无目的条带，怎么办？

A：PCR 反应失败的原因很多，可以从以下几个方面考虑：

- 1) 引物和模板是否配对，同源性有多大？
- 2) 引物本身是否有立体结构，或者二条引物之间是否形成高级结构？
- 3) PCR 反应用试剂是否能正常工作？
- 4) PCR 仪是否工作正常？
- 5) PCR 反应条件是否合适？

如果一切正常，仍无法解决问题时，我们可以免费重新合成引物一次。反复重合都无法实现正常扩增时，可以排除引物质量问题，推荐重新优化引物序列。

### Q：PCR 扩增有很强的非特异条带，说明引物有污染吗？

A：不是。我们曾分析过一些非特异条带，测序发现在这些非特异性片段的两头至少可以发现一条引物序列。因此非特异性扩增一般是模板污染（如 RNA 中污染基因组）或扩增条件不合适所致。

## 6 附录

### Q: 为什么我用的引物设计软件得到 Tm 值与合成报告单上的不太一样?

A: 引物的 Tm 值是一个理论值, 有很多种计算方法。生工合成报告单上的算法是采用邻二态模型通过热力学公式计算得到的, 如果您的引物要进行 PCR, 推荐采用引物设计软件得到的参数, 在引物 Tm 值的基础上减去 3~5°C 作为退火温度, 如果上下游引物有不同的 Tm 值, 以较低的那条为准进行退火温度计算。

### Q: 文献上找到的引物和探针序列能否直接使用?

A: 如果文献可信度比较高, 可直接使用; 但为了保险起见, 最好用 Blast 对引物探针的序列进行必要的验证; 或者再进一步用引物设计软件对引物探针的二级结构和退火温度进行分析, 这样更有利于您对整个实验的把握。不过, 有的引物也无法保证对所有模板都能达到很好的扩增效果。

### Q: 巯基修饰引物的还原步骤?

A: 如果用于与金电极相连, 将 1  $\mu$ l 的 1 mM TCEP 与 99  $\mu$ l 的巯基修饰的 DNA (浓度为 0.2  $\mu$ M) 混合, 室温下还原 30~60 min, 还原之后的 DNA 可以不去除 TCEP 用于后续实验。如果需要更高浓度的 DNA 溶液, 比如 100  $\mu$ M, 则需要使用 10 mM TCEP 进行还原。TCEP 物质的量需要是 DNA 物质的量的 100 倍以上。如果用于与纳米金连接, 可将 200  $\mu$ l 的 15  $\mu$ M 的巯基修饰的 DNA 与 5  $\mu$ l 的 1 M 的 TCEP 混合, 室温下还原 30 min。后续可以直接与纳米金溶液混合。

### Q: 如何将两条互补的单链退火形成双链?

A: 用退火缓冲液 (10 mM Tris, pH 7.5~8.0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA) 溶解引物, 将要退火的引物等摩尔数混合, 总体积不要超过 500  $\mu$ l, 加热到 95°C 2 min, 然后缓慢冷却至室温 (低于 30°C, 降温过程控制在 1 小时左右) 即可。退火的产物可以放在 4°C 待用。

### ● 附录 1: 一代测序 (Sanger 测序)

一代测序被称为基因测序的“金标准”, 生工测序拥有数十台 ABI 3730XL 测序仪, 最大能力每天可处理 30,000 多个反应。

生工生物作为国内商业常规测序行业领导者之一, 已有 20 多年的丰富经验。团队拥有超过二百名经验丰富且技术过硬的实验技术人员, 对不同领域的客户均能够提供满足不同需求的测序服务, 从而保证稳定高效的测序质量。

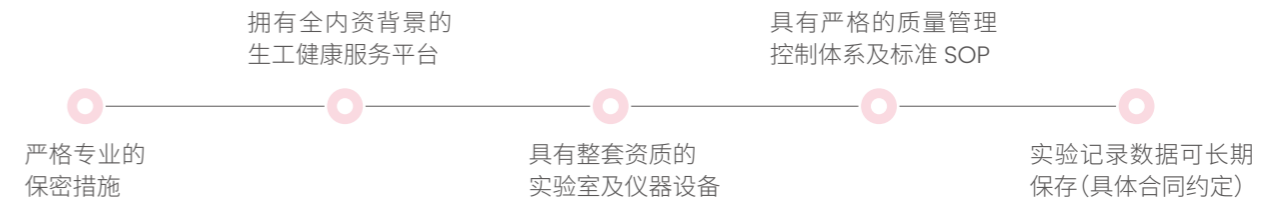


针对菌株、纯化或未纯化的 PCR 产物、或者质粒等样品, 我们均能为客户提供测序服务, 根据项目需求设计引物, 进而针对不同的样品采用不同的处理方式进行检测。

### IVD 检测试剂盒注册申报验证服务

一代测序可作为分子诊断试剂及试剂盒获批前临床试验对比方法之一。截至 2021 年 4 月, 生工生物已有 43 家 IVD 企业完成了 216 项 Sanger 测序验证服务。

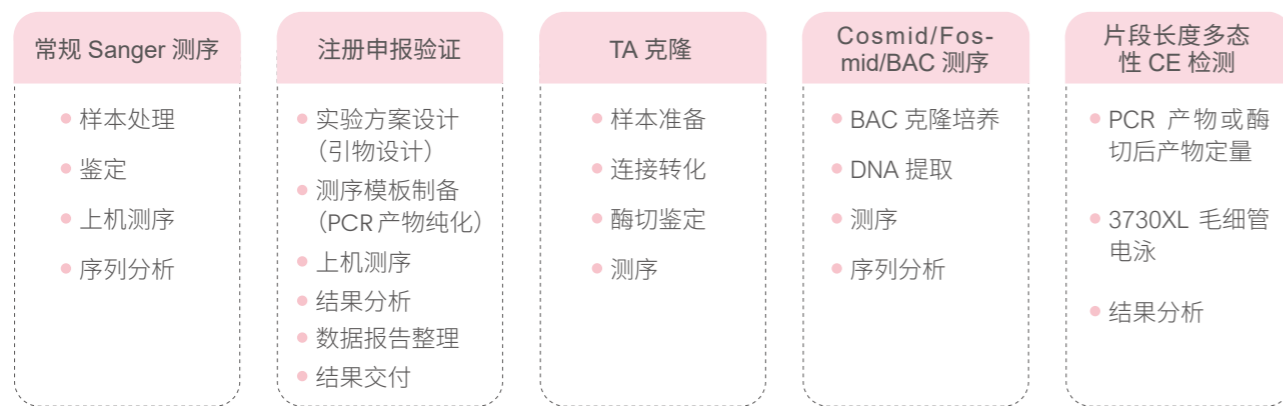
#### 服务优势:



### 订购信息

测序服务名称	服务介绍	服务周期
Sanger 测序	常规测序样本可为菌液、质粒和 PCR 产物, 操作简便, 有效测序长度一般可达到 850 bp, 测序结果可自行至官网查询结果。	1~3 个工作日
	注册测序验证服务样本可为血液、组织、鼻咽拭子、核酸、菌体、PCR 产物等, 最终交付原始测序结果、分析报告以及详细的试验记录文件。	详询
TA 克隆	我司 pUCm-T 载体为一种高效克隆 PCR 产物的专用载体, 能高效地与“A”尾的 PCR 产物连接, 极大地提高克隆效率。	5~7 个工作日
Cosmid/Fosmid/BAC 测序	测序样本可为菌液和质粒, BAC 末端测序技术通过测定插入片段两端的序列, 能够迅速而精确地进行序列拼接, 并确定基因组序列结构的多态性, 如倒置和易位等。	3~5 个工作日
片段长度多态性 CE 检测	针对 STR、T-RFLP、AFLP、MLPA 等具有片段长度多态性的样品, 我司提供毛细管电泳分离检测服务, 与传统的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测技术相比, 具有通量高、检测灵敏、可自动化分析等优点。	1~3 个工作日

## 基本流程



## DNA 测序样品准备

模板	准备
未纯化 PCR 产物	片段大于 200 bp;
	提供 30 $\mu$ l 以上的 PCR 扩增产物 (浓度大于 100 ng/ $\mu$ l);
	取 3 $\mu$ l 样品, 能够清晰地检测出目的条带; 自带引物。
已纯化 PCR 产物	PCR 产物溶于双蒸水中 (请勿溶解在 TE 溶液中);
	浓度大于 100 ng/ $\mu$ l, 体积大于 20 $\mu$ l, 长片段需适当增加提供量;
	电泳检测条带单一明亮; 自带引物。
质粒	需提供 20 $\mu$ l 以上质粒 (浓度大于 100 ng/ $\mu$ l), 质粒溶于双蒸水中 (请勿溶解在 TE 溶液中);
	建议用相关试剂盒提取质粒;
	如有可能, 同时提供 200 $\mu$ l 含有相应质粒的菌液备用;
	需注明载体全称和插入目的片段长度及测序要求。
菌样	说明载体、抗性类型; 我们提供氨苄青霉素和卡那霉素两种抗生素; 其余类型抗生素需自备并附使用说明;
	应为高拷贝质粒, 对于低拷贝质粒, 请直接提供约 1 $\mu$ g 纯化质粒;
	提供 200 $\mu$ l 以上过夜培养 (12 h) 的新鲜菌液, 于 EP 管中封口保存, 防止交叉污染或渗漏;
	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; 建议尽量提供穿刺培养或斜面培养的菌种 (装在 EP 管中)。
自带引物	浓度不低于 10 pmol/ $\mu$ l (即 10 $\mu$ mol/L), 体积 10 $\mu$ l 以上, 并注明浓度;
	随机引物 (RAPD 引物)、简并引物、长度不足 15 bp 或大于 30 bp 引物、有特殊标记的引物或不纯的引物均不能用于测序;
	尽可能提供引物全序列、PCR 退火温度等信息, 以供参考。
免费提供的通用引物	M13+[M13-47], M13-[M13-48], M13(-20), M13(-26), T7promoter, T7terminator, SP6, T3, BGH;
	5'/3'AOX, $\alpha$ -factor, -96g III, pBV220+/-, pEGFP-N5/3', pEGFP-C5/3', pCMV5-F/R, pQE30+/-, 5'/3'AD;
	pGEX5/3', pGL3+/-, 27F, 1492R, CMV, U6promoter, S-Tag 等通用引物; 如您需要的引物不在此列, 请电话咨询或自带引物, 如需生工合成, 请注明。

## 常见问题

**Q: 测序无信号? 序列峰图杂乱无章, 测序干扰较大, 没有明显主峰。**

A: 测序模板与引物无法配对, 或者配对能力较差, 造成测序信号弱甚至无信号; 样品浓度太低, 造成纯化之后的模板浓度太低, 测序无法产生足够信号。  
建议: 请提供足够浓度的新鲜菌液 1ml 或 30  $\mu$ l 以上 PCR 产物 (取 3  $\mu$ l 进行电泳, 能检测到明亮清晰的条带); 请提供载体正确信息, 如果是非常见载体, 请提供载体序列及酶切位点, 以及引物序列。

**Q: 测序结果信号弱? 测序结果在无信号和正常结果之间, 有主峰, 但是噪音干扰很大 (并非重叠峰型), 测序信号弱, 或者提前中断。**

A: 可能由于样品浓度太低, 测序反应无法正常延伸。长时间的运输、不稳定的温度, 都有可能使样品发生降解, 造成浓度降低。  
建议: 信号弱的样品, 建议重新制备成符合要求的样品。

**Q: 测序信号衰弱? 前面信号平均, 背景较低, 后面随着信号衰减, 背景加强。**

A: 可能样品纯度或浓度达不到测序要求; 或纯化过程中, EDTA 处理不好; 亦或遇到单一重复结构或复杂结构。  
建议: 提高模板质量, 亚克隆成较小的片段进行测序; 针对二级结构, GC rich 等困难模板采用特殊的反应体系, 使成功率大大提高。

**Q: 测序出现双峰——移码? 每个碱基的主峰底下都有一个相邻碱基相同的小峰。**

A: 可能是引物不纯, 包含 n+1 或 n-1 的引物序列; 或样品不纯, 尤其是单一结构或重复结构后的序列。  
建议: 可能是存在移码突变, 这是正常的, 也可以克隆后测序。

**Q: 测序出现双峰——底峰? 主峰峰形单一或副峰出现在主峰底下。**

A: 可能测序引物有二级结构, 或样品引物有污染。  
建议: 重新设计合成引物, 制备符合要求的样品。

**Q: 测序出现双峰——前双峰? 序列前端开始有双峰, 后期恢复单一峰形。**

A: 可能 PCR 样品中含有引物二聚体, 或样品不纯, 含有不止一条 PCR 片段; 或者引物在样品中有多个结合位点。  
建议: 重新设计合成引物, 制备符合要求的样品。

**Q: 测序出现双峰——从头到尾双峰? 从一开始就出现双峰, 直到最后; 无法区分主峰与副峰, 单一峰形不明显。**

A: 可能引物在样品序列上有两个以上结合位点或样品不纯。  
建议: 重新设计合成引物, 制备符合要求的样品。

**Q: 测序出现双峰——单一结构或重复序列后双峰? 双峰出现在单一结构或重复序列后。**

A: 当聚合酶遇到序列中的 polyA 或 polyT 时, 往往会发生移滑, 进而导致测序结果的非特异性或不理想。  
建议: 用反向引物测互补链, 通过拼接可能得到全长。

**Q: 测序出现双峰——后双峰? 双峰出现在测序序列中后期。**

A: 可能样品 (或引物) 不纯。  
建议: 重新合成引物或提供符合要求的样品。

**Q: 测序结果不正确? 找不到引物, 或结果完全不正确, 测序方向不对。**

A: 可能是模板错误或者引物设计有误。  
建议: 检查模板, 并提供该样品及引物的详细资料, 针对性地分析。



## ● 附录 2: 联系我们

### 总部

地址: 上海市松江区香闵路 698 号

邮编: 201611

热线: 400-821-0268

传真: 400-821-0268 按 9

邮箱: sales@sangon.com (中国大陆) order@sangon.com (国际及港澳台)

### 投诉与建议

电话: 400-821-0268 按 3

邮箱: mbts@sangon.com

### 合成测序服务网点

地区	引物合成网点联系方式	测序网点联系方式
上海	电话: 021-57072171/72/73/74 邮箱: synth@sangon.com	电话: 021-57072160/61/62 邮箱: shseq@sangon.com
北京	电话: 010-81767585/86 传真: 010-81767586 邮箱: beijing@sangon.com	电话: 010-81767529/79 邮箱: bjseq@sangon.com
武汉	电话: 027-65522298 邮箱: whsynth@sangon.com	电话: 027-87002907 邮箱: whseq@sangon.com
广州	电话: 020-38452026 传真: 020-32207701 邮箱: gz_synth@sangon.com	电话: 020-38455693/38452693 邮箱: gzseq@sangon.com
成都	电话: 028-64259944 邮箱: cdsynth@sangon.com	电话: 028-64259946 邮箱: cdseq@sangon.com
南京	电话: 025-85383702 邮箱: njsynth@sangon.com	电话: 025-85383701 邮箱: njseq@sangon.com
郑州	电话: 0371-63313093 或 0371-61652655 邮箱: zzzynth@sangon.com	电话: 0371-61171352 邮箱: zzseq@sangon.com
青岛	电话: 0532-68012226 邮箱: qdsynth@sangon.com	电话: 0532-68012178 邮箱: qdseq@sangon.com
昆明		电话: 15021124412 邮箱: kmseq@sangon.com
长春		电话: 13636536956 邮箱: ccseq@sangon.com
西安		电话: 021-57072160/13361920267 邮箱: xaseq@sangon.com
长沙		电话: 18373141571 邮箱: csseq@sangon.com
杭州		电话: 021-57072160 / 61 / 62 邮箱: hzseq@sangon.com
厦门		电话: 17602185336 邮箱: xmseq@sangon.com

### 生工生物全国销售网点联系方式 (按省份首字母排列)

省份	网点	手机	办公电话	邮箱	传真
安徽	合肥	18917713933	0551-62840782	anhui@sangon.com	
北京	北京	18917713568	010-82363780	bjorder@sangon.com	010-82363790
重庆	重庆	18917713855	023-81363286	chongqing@sangon.com	
福建	福州	18917713433	0591-83842900	fuzhou@sangon.com	
	厦门	18917713608	0592-2181892	xiamen@sangon.com	
甘肃	兰州	18917713818	0931-8310565	lanzhou@sangon.com	0931-8310565
广东	广州	13318785125	020-32206684	guangzhou@sangon.com	020-32207701
	深圳	18917713663	0755-86011411	shenzhen@sangon.com	0755-86011411
广西	桂林	18917713348	0771-3821595	nanning@sangon.com	
	南宁				
贵州	贵阳	18917714277	0851-88617591	guiyang@sangon.com	
海南	海口	13111904256	0898-66862960	haikou@sangon.com	
河北	石家庄	18917713638	0311-85046606	shijiazhuang@sangon.com	
河南	郑州	18917713330	0371-63313093	zhengzhou@sangon.com	
黑龙江	哈尔滨	18917713822	0451-51034008	haerbin@sangon.com	
湖北	武汉	18917713883	027-87381125	wuhan@sangon.com	
湖南	长沙	17752882112	0731-84556676	changsha@sangon.com	
吉林	长春	18917710639	0431-88541636	changchun@sangon.com	0431-88541636
江苏	南京	18917713993	025-86667569	nanjing@sangon.com	
	苏州	18918107154		suzhou@sangon.com	
	无锡	18917713555	0510-85881640	wuxi@sangon.com	
江西	徐州	13953192492	0531-82951640	xuzhou@sangon.com	0531-82941640
	扬州	18917713633		yangzhou@sangon.com	
江西	南昌	18917713868	0791-86853779	nanchang@sangon.com	
辽宁	大连	18917713477	0411-39759235	dalian@sangon.com	
	沈阳	18917713488	024-23412941	shenyang@sangon.com	
内蒙古	呼和浩特	18917713400	0471-2250562	neimenggu@sangon.com	0471-2250562
青海	西宁	18917713848	0971-8814295	qinghai@sangon.com	
山东	济南	18916120970	0531-82951640	jinan@sangon.com	0531-82941640
	青岛	18053235633	0532-66012680	qingdao@sangon.com	
山西	太原	18917713299		taiyuan@sangon.com	
陕西	西安	18917713699	029-82497082	xian@sangon.com	
上海	上海	18917713773	021-64746299	shanghai@sangon.com	
		18917713798			
四川	成都	18917713833	028-87434681	chengdu@sangon.com	
天津	天津	18917713568	022-23431211	tianjin@sangon.com	
新疆	乌鲁木齐	18917713876	0991-4338172	wulumuqi@sangon.com	
云南	昆明	18917713411	0871-65170776	kunming@sangon.com	
浙江	杭州	18917713636	0571-88497358	hangzhou@sangon.com	
	宁波	18939833443		ningbo@sangon.com	
	温州	13646552662		wenzhou@sangon.com	

 网上订购, 更多产品信息, 请登录 [www.sangon.com](http://www.sangon.com)