

关于金斯瑞

金斯瑞是一家具有全球经营规模和国际领先地位的综合性生物服务公司，主要提供科研定制服务，生物研究试剂，目录产品及批量生物试剂。公司总部位于美国新泽西州的Piscataway，已为30,000多名来源于世界级的大规模制药公司、生物技术公司以及全球70多个国家的著名科研院校的客户提供多项服务及产品。

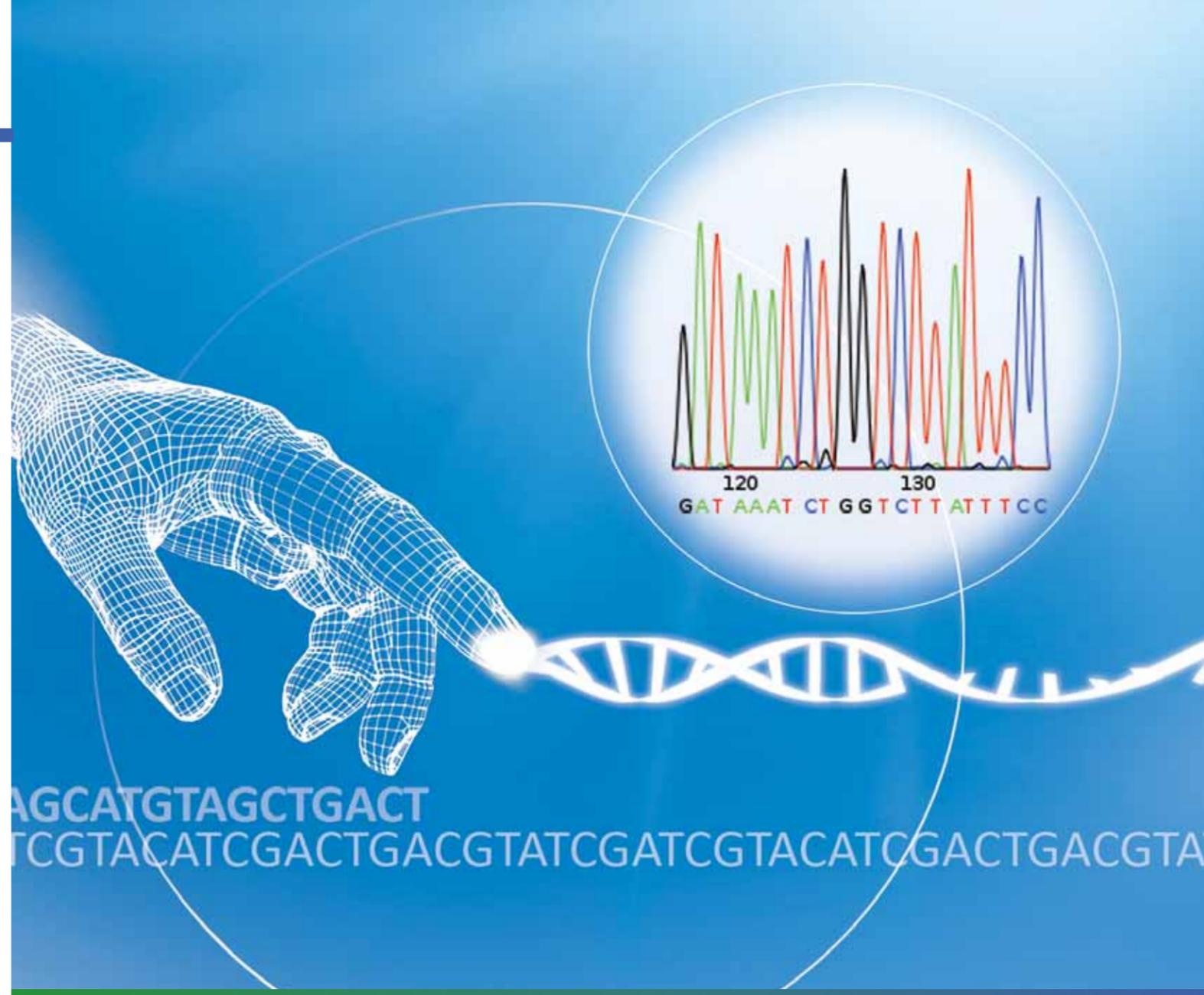
联系方式

地址：江苏省南京市江宁科学园雍熙路28号 (211100)

电话：025-58897288-5820/5810

传真：025-58897288-5815

网址：www.genscript.com.cn



引物/测序专题手册

知识荟萃，答疑集锦，专家云集，助您科研一臂之力！

- ◎ 引物专题
- ◎ 测序专题
- ◎ 常用生物信息学工具

引物合成服务：025-58897288-5812 oligo@genscript.com.cn

测序服务：025-58897288-5813 seq@genscript.com.cn

>>公司简介

南京金斯瑞生物科技有限公司(原金思特科技(南京)有限公司)创建于2002年,是一家具有全球经营规模和国际领先地位的生物医药研发外包服务公司。公司总部位于美国新泽西州的Piscataway,并在中国、法国和日本设有分部。公司客户主要来源于世界级的大规模制药公司、生物技术公司以及全球70多个国家的著名科研院校。

金斯瑞致力于为从事生命科学研究和早期药物研发的科研人员提供高质量的生物技术外包服务,拥有生物研究试剂、新药筛选、靶药优化、抗体药物研发等四大服务平台。其一站式生物研究试剂服务平台可为客户提供基因合成及相关分子生物学服务,多肽合成服务,蛋白表达和纯化服务,抗体服务和细胞系建立等服务,公司已发展成为具有世界顶级水平的生物CRO公司。

凭借十年基因合成经验的品质保证,金斯瑞已成为全球领先的基因合成供应商,合成生物学研究领域的领军者。公司自主研发了众多专利性的技术及产品:OptimumGene™密码子优化技术,CloneEZ®试剂盒,ONE-HOUR Western™试剂盒及THE™ Epitope Tag 抗体等。

金斯瑞始终以“提供最好的质量给客户,为客户的利益服务”为理念,与全球客户建立了良好的商业合作伙伴关系。金斯瑞更肩负着加快人类疾病研究与药物早期研发进程,挽救人类生命的重大使命。

目录

引物专题

1. 知识荟萃	1
1.1 引物设计	1
1.2 PCR设计引物时酶切位点的保护	2
1.3 引物纯化方式选择指南	5
2. 引物合成服务简介	7
3. 常见问题解答	7
3.1 引物合成及纯化	7
3.2 引物的定量、保存和溶解	8
3.3 引物的纯度及使用中的常见问题	10

测序专题

1. 知识荟萃	13
1.1 测序用引物说明	13
1.2 测序对样品的要求	16
2. 测序服务简介	18
3. 常见问题解答	18
3.1 常见峰图原因分析及解决方案	18
3.2 测序答疑	19

常用生物信息学工具

1. 分子生物学/基因设计软件	23
2. 测序峰图阅读软件	23
3. 引物设计相关软件	23
4. siRNA相关软件	23
5. DNA Star介绍	24

1. 知识荟萃

1.1 引物设计

1) 常规PCR引物设计

- ① 引物长度：15~30 bp，常用为20 bp左右；
- ② 引物扩增跨度：以200~500 bp为宜，特定条件下可扩增长至10 kb的片段；
- ③ 引物碱基：G+C含量以40~60%为宜，过高或过低都不利于PCR反应，上下游引物的GC含量不能相差太大。ATGC最好随机分布，避免5个以上的嘌呤或嘧啶核苷酸的成串排列；
- ④ 避免引物内部出现二级结构，避免两条引物间互补，特别是3'端的互补，否则会形成引物二聚体，产生非特异的扩增条带；
- ⑤ 引物3'端的碱基，特别是最末及倒数第二个碱基，应严格要求配对，以避免因末端碱基不配对而导致PCR失败；
- ⑥ 引物中有或能加上合适的酶切位点，被扩增的靶序列最好有适宜的酶切位点，这对酶切分析或分子克隆很有好处；
- ⑦ 引物的特异性：引物应与核酸序列数据库的其它序列无明显同源性；
- ⑧ 引物量：每条引物的浓度约在10~100 pmol之间，以最低引物量产生所需要的结果为好，引物浓度偏高会引起错配和非特异性扩增，且可增加引物之间形成二聚体的机会。

2) 测序引物设计

引物的正确设计是测序反应成功与否的一个关键条件之一，由于测序反应的特殊要求，普通PCR反应中可成功地特异、高效扩增目的DNA片段的PCR引物并不一定总是适合作为循环测序反应的引物。测序反应引物的设计与普通引物一样，是在扩增特异性和扩增效率两个目标之间取得平衡。但一般来说，测序引物的设计原则要比普通PCR引物严格些，测序引物的设计一般应遵循下述原则：

- ① 长度在15~25个碱基左右，一般选择20个碱基(根据GC含量作适当调整)，3'端尽量选择G或C碱基(但不绝对)，以增加与模板的结合能力；
- ② Tm温度应选择50~70℃左右；
- ③ GC含量应选择在50%左右，尽量避免A、T、G、C的连续结构；
- ④ 避开引物自身形成发夹结构或引物二聚体结构等复杂结构；
- ⑤ 保证引物和模板100%匹配，特别是3'端的几个碱基一定要100%匹配。同时必须严格保证引物和模板之间只能有一个结合位点。

3) Real Time PCR引物设计

实时荧光PCR有染料法和探针法两种。染料法只需设计引物而探针法除设计引物之外还得设计一条探针。

引物要尽量满足以下要求：

- ① 避免重复碱基，尤其是G；
- ② Tm=58~60℃；
- ③ GC=30~80%；
- ④ 3'端最后5个碱基内不能有多于2个的G或C；
- ⑤ 正向引物与探针离得越近越好，但不能重叠；
- ⑥ 扩增产物长度：产物大小不要太大，一般在80~250 bp之间均可；80~150 bp最为合适(可延长至300 bp)；
- ⑦ 引物的退火温度要高，一般要在60℃以上。

要特别注意避免引物二聚体和非特异性扩增的存在。而且引物设计时应考虑到引物要有不受基因组DNA污染影响的能力，即引物应该跨外显子，最好是引物能跨外显子的接头区，这样可以更有效地不受基因组DNA污染的影响。设计软件PRIMER3, PRIMER5, PRIMER EXPRESS都是可以的。

TaqMan探针设计的基本原则：

- ① TaqMan探针位置尽可能靠近扩增引物，但不能与引物重叠；
- ② 长度一般为18~40 mer；
- ③ GC含量控制在40~80%左右；
- ④ 避免连续相同碱基的出现，特别是要避免GGGG或更多G出现；
- ⑤ 在引物的5'端避免使用G；
- ⑥ 选用比较多的碱基C；
- ⑦ 退火温度Tm控制在68~70℃左右。

1.2 PCR设计引物时酶切位点的保护

由于直接暴露在末端的酶切位点不容易直接被限制性核酸内切酶切开，因此在设计PCR引物时，人为地在酶切位点序列的5'端外侧添加额外的碱基序列，即保护碱基，用来提高将来酶切时的活性。表1即列出了PCR设计引物时酶切位点的保护碱基。

表1. PCR设计引物时酶切位点的保护碱基表

酶	寡核苷酸序列	切割率%	
		2 hr	20 hr
Acc I	GGTCGACC CGGTCGACCG CCGTCGACCGG	0 0 0	0 0 0
Afl III	CACATGTG CCACATGTGG CCCACATGTGGG	0 >90 >90	0 >90 >90
Asc I	GGCGCGCC AGGCGCGCCT TTGGCGCGCAA	>90 >90 >90	>90 >90 >90
Ava I	CCCCGGGG CCCCCGGGGG TCCCCCGGGGGA	50 >90 >90	>90 >90 >90
BamH I	CGGATCCG CGGGATCCCG CGCGGATCCGCG	10 >90 >90	25 >90 >90
Bgl II	CAGATCTG GAAGATCTTC GGAAGATCTTCC	0 75 25	0 >90 >90

酶	寡核苷酸序列	切割率%	
		2 hr	20 hr
BssH II	GGCGCGCC	0	0
	AGCGCGCCT	0	0
	TTGGCGCGCAA	50	>90
BstE II	GGGT(A/T)ACCC	0	10
BstX I	AACTGCAGAA CCAATGCATTGG	0	0
	AAA ACTGCAGCCAATGCATTGGAA	25	50
	CTGCAGAA CCAATGCATTGGATGCAT	25	>90
Cla I	CATCGATG	0	0
	GATCGATC	0	0
	CCATCGATGG	>90	>90
	CCCATCGATGGG	50	50
EcoR I	GGAATTCC	>90	>90
	CGGAATTCG	>90	>90
	CCGGAATTCGG	>90	>90
Hae III	GGGGCCCC	>90	>90
	AGCGGCCGCT	>90	>90
	TTGCGCCGCAA	>90	>90
Hind III	CAAGCTTG	0	0
	CCAAGCTTGG	0	0
	CCC AAGCTTGGG	10	75
Kpn I	GGGTACCC	0	0
	GGGGTACCCC	>90	>90
	CGGGTACCCG	>90	>90
Mlu I	GACGCGTC	0	0
	CGACGCGTCG	25	50
Nco I	CCCATGGG	0	0
	CATGCCATGGCATG	50	75
Nde I	CCATATGG	0	0
	CCCATATGGG	0	0
	CGCCATATGGCG	0	0
	GGGTTTCATATGAAACC	0	0
	GGAATTCATATGGAATTCC	75	>90
	GGGAATTCATATGGAATTCCC	75	>90
Nhe I	GGCTAGCC	0	0
	CGGCTAGCCG	10	25
	CTAGCTAGCTAG	10	50

酶	寡核苷酸序列	切割率%	
		2 hr	20 hr
Not I	TTGCGGCCGCAA	0	0
	ATTTGCGGCCGCTTTA	10	10
	AAATATGCGGCCGCTATAAA	10	10
	ATAAGAATGCGGCCGCTAAACTAT	25	90
	AAGGAAAAAGCGGCCGCAAAAGGAAAA	25	>90
Nsi I	TGCATGCATGCA	0	>90
	CCAATGCATTGGTTCTGCAGTT	>90	>90
Pac I	TTAATTAA	0	0
	GTTAATTAAC	0	25
	CCTTAATTAAGG	0	>90
Pme I	GTTTAAAC	0	0
	GGTTTAAACC	0	25
	GGGTTTAAACCC	0	50
	AGCTTTGTTTAAACGGCGCGCCGG	75	>90
Pst I	GCTGCAGC	0	0
	TGCACTGCAGTGCA	10	10
	AACTGCAGAACCAATGCATTGG	>90	>90
	AAA ACTGCAGCCAATGCATTGGAA	>90	>90
	CTGCAGAACCAATGCATTGGATGCAT	0	0
Pvu I	CCGATCGG	0	0
	ATCGATCGAT	10	25
	TCGCGATCGCGA	0	10
Sac I	CGAGCTCG	10	10
Sac II	GCCGCGGC	0	0
	TCCC CGCGGGA	50	>90
Sal I	GTCGACGTCAAAGGCCATAGCGGCCGC	0	0
	GCGTCGACGTCTTGGCCATAGCGGCCGCGG	10	50
	ACGCGTCGACGTCTGGCCATAGCGGCCGCGGAA	10	75
Sca I	GAGTACTC	10	25
	AAAAGTACTTTT	75	75
Sma I	CCCGGG	0	10
	CCCCGGGG	0	10
	CCCCCGGGGG	10	50
	TCCCCCGGGGGA	>90	>90
Spe I	GACTAGTC	10	>90
	GGACTAGTCC	10	>90
	CGGACTAGTCCG	0	50
	CTAGACTAGTCTAG	0	50
Sph I	GGCATGCC	0	0

表2. 引物纯化主要方式的介绍

酶	寡核苷酸序列	切割率%	
		2 hr	20 hr
Sph I	CATGCATGCATG ACATGCATGCATGT	0 10	25 50
Stu I	AAGGCCTT GAAGGCCTTC AAAAGGCCTTTT	>90 >90 >90	>90 >90 >90
Xba I	CTCTAGAG GCTCTAGAGC TGCTCTAGAGCA CTAGTCTAGACTAG	0 >90 75 75	0 >90 >90 >90
Xho I	CCTCGAGG CCCTCGAGGG CCGCTCGAGCGG	0 10 10	0 25 75
Xma I	CCCCGGGG CCCCCGGGGG CCCCCGGGGGG TCCCCCGGGGGGA	0 25 50 >90	0 75 >90 >90

说明：

如果要加在序列的5'端，就在酶切位点识别碱基序列(红色)的5'端加上相应的碱基(黑色)，同样如果要在3'端加保护碱基，就在酶切位点识别碱基序列(红色)的3'端加上相应的碱基(黑色)；

切割率：正确识别并酶切的效率；

加保护碱基时最好选用切割率高时加的相应碱基。

1.3 引物纯化方式选择指南

通常而言，引物进一步纯化主要起到三个方面的重要作用：

- 从最终产物 (n mer) 中去除反应不完整的短链引物 (n-1 mer, n-2 mer等)；
- 去除引物合成反应中的副产物；
- 去除从碱基上切割下来的保护基团。

引物纯化方式有很多种，目前常见的几种引物纯化方式，如C18柱脱盐、RPC或HAP纯化、PAGE纯化、HPLC纯化等。表2即对这几种纯化方式进行了——介绍。

纯化方式	详细说明
C18柱脱盐	又称为简易反相柱，对DNA有特异性吸附，可被有机溶液洗脱，但不会被水洗脱，因此能有效地去除盐分，但不能有效去除比目的片段短的小片段。该方法一般不会不会对普通PCR反应产生影响。对于需要用于测序、克隆的引物不能使用这个级别。
RPC纯化	RPC纯化是通过反相净化滤芯 (Reverse Phase Cartridge) 对引物进行纯化，纯化原理与反相HPLC纯化一样。与反相HPLC比较，RPC是一种有效且更加经济的纯化方式。反相净化滤芯通常包含一种疏水基质如 C18的硅胶，能够很好地吸附DNA，并且可以用水轻松地将切割下来的保护基团和短的引物片段从反相柱上洗掉。RPC纯化的引物可以应用于DNA测序、PCR及基因合成等。
PAGE纯化	PAGE纯化法是使用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳，对引物DNA进行分离，然后从凝胶中回收目的DNA的方法。PAGE纯化法也是一种非常有效的DNA纯化方法，纯化后的DNA纯度大于90%，对长链Oligo DNA (大于50 mer)的纯化特别有效。
HPLC纯化	HPLC纯化是使用高效液相色谱的原理，对引物DNA进行纯化。该方法用于分离纯化或分析时能达到很高的纯度和灵敏度。在引物DNA的分析和纯化中，常用的有离子交换 (ion-exchange) HPLC和反相 (reverse-phase) HPLC。reverse-phase HPLC：纯度大于90%；ion-exchange HPLC：纯度大于95%，可以有效地去除N-1短片段。HPLC纯化主要用于短链和修饰引物的纯化。该法的缺点是成本较高，批量生产效率不高。

金斯瑞采用RPC、PAGE、HPLC三种引物纯化方式，在选择上主要依据引物的长度和应用方面对纯度的要求而定，表3即从引物长度的角度总结了以上每一种纯化方式的适用范围。您可根据实验需要，选择合适的引物纯化方式。

表3. 引物纯化主要方式的适用范围及建议

纯化方式	引物长度				建议	适用范围
	<11 mer	11~40 mer	41~59 mer	60~110 mer		
RPC	适用*	推荐	适用	不适用	快速、通量大，纯度可满足大多分子生物学实验需求，常用于PCR、测序引物等。	用于DNA测序、PCR、基因合成、定点突变及克隆等引物。
PAGE	不适用	适用	适用	推荐	常规分子生物学实验引物采用RPC纯化即可；但强烈建议长链引物 (≥60 mer) 选用PAGE纯化。	50 mer以上的未修饰寡核苷酸，用于定点突变、克隆、蛋白结合凝胶迁移电泳分析、治疗与诊断用途。
HPLC	离子交换 推荐	适用	适用	不适用	纯化短链引物 (<11 mer) 特别有效，但此法纯化通量小、成本较高。如实验对纯度要求非常高，可选用HPLC与PAGE双重精制。	<ul style="list-style-type: none"> • 小于50 mer的未修饰寡核苷酸，用于定点突变、克隆、蛋白结合凝胶迁移电泳分析、治疗用途； • 带有疏水基团的修饰引物； • 商业化的诊断引物或探针 (80%~90%纯度)。
		适用	不适用	不适用		

* 为保证您引物的纯度，对于 < 5 mer的短链引物选择RPC纯化前请先致电咨询。

2. 引物合成服务简介

金斯瑞是全球最大的基因合成公司，也是基因合成商业化的先驱，经近10年的努力，已发展成为拥有员工1,200余名的跨国企业。

作为基因合成的最重要一环，金斯瑞拥有强大的引物合成能力，公司拥有国际先进的DNA合成仪，专业的技术人员和成熟的合成纯化工艺，能及时为客户提供高质量、多种类的引物。我们全程监控每条引物的合成，严格采用ISO9001:2008认证的流程进行质量控制，确保将高质量的引物交付至每位客户手中。

服务特色

- ▶ 严格的质量控制，目前国内唯一采用高通量毛细管凝胶电泳 (CGE) 与质谱 (MS) 分析
- ▶ 货真价实的PAGE纯化，100%保证引物纯度
- ▶ 超快的合成周期，常规RPC纯化引物，南京、上海地区次工作日即可交付
- ▶ 完善的在线订购系统
- ▶ 全球最大的DNA合成公司之一，拥有多台高通量DNA合成仪，日产引物上万条
- ▶ 20多年丰富经验的引物合成专家团队
- ▶ 拥有世界范围的市场，服务遍及欧美、日本及东南亚地区
- ▶ 品种齐全，除各类修饰碱基、普通引物外，还可合成水解探针等双标记引物

3. 常见问题解答

3.1 引物合成及纯化

1) 引物是如何合成的？

目前引物合成基本采用固相亚磷酸酐三酯法。该方法具有高效、快速的偶联以及起始反应物比较稳定的特点。主要是将DNA固定在固相载体上完成DNA链的合成的，合成的方向是由待合成引物的3'端向5'端合成的，相邻的核苷酸通过3' 5'磷酸二酯键连接。固相亚磷酸酐三酯法合成引物的具体步骤如下：

将预先连接在固相载体CPG上的活性基团被保护的核苷酸与三氯乙酸反应，脱去其5'-羟基的保护基团DMT，获得游离的5'-羟基；

合成DNA的原料，亚磷酸酐保护核苷酸单体，与活化剂四氮唑混合，得到核苷亚磷酸活化中间体，它的3'端被活化，5'-羟基仍然被DMT保护，与溶液中游离的5'-羟基发生缩合反应；

带帽(capping)反应，缩合反应中可能有极少数5'-羟基没有参加反应(少于2%)，用乙酸酐和1-甲基咪唑终止其后继续发生反应，这种短片段可以在纯化时分离掉；

在氧化剂碘的作用下，亚磷酸酐形式转变为更稳定的磷酸三酯。

经过以上四个步骤，一个脱氧核苷酸被连接到固相载体的核苷酸上。再以三氯乙酸脱去它的5'-羟基上的保护基团DMT，重复以上步骤，直到所有要求合成的碱基被接上去。合成过程中可以观察TCA处理阶段的颜色判定合成效率。

通过氨水高温处理，连接在CPG上的引物被切下来，通过RPC、PAGE等手段纯化引物，成品引物用C18浓缩，脱盐，沉淀。沉淀后的引物用水悬浮，测定OD₂₆₀定量，根据订单要求分装。

2) DNA合成粗产物中含有什么杂质？

主要是合成反应过程中产生的失败片段以及脱保护基团时产生的铵盐。

3) 合成的引物5'端是否有磷酸化？

合成的引物5'端为羟基，没有磷酸基团。如果需要，您可以用多核苷酸激酶进行5'端磷酸化，或者要求我们合成时直接在5'或3'端进行磷酸化，需要另行收费。

4) 最长可以合成多长的引物？

引物越长，出现问题的概率就越大。除非有特殊需要，我们建议合成片段长度不要超过80 mer，按照目前的引物合成效率，80 mer的粗产品，全长引物的百分比不会超过40%，后续处理还会丢失很多，因此最后的产量很低。金斯瑞最长可合成110 mer的引物。

5) 交付引物质量好坏的判断标准是什么？

合成的引物和您的订单序列一致，而不是能否扩增出您所需要的产物。

6) PCR产物经过克隆以后测序发现引物区与合成序列不相符合，怎么办？

多数情况是PCR过程和克隆过程中引入的错误。遇到这种情况，请您

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

7) 测序发现引物有突变是怎么回事？

引物合成是一种多步骤的化学反应，每一步的合成效率最高也就是99%，副产品不可避免。链越长，突变的频率累加起来就越高。在您PCR扩增后克隆测序的时候，为了节约时间和提高成功率，我们有如下建议：

- 请您在检测到阳性克隆后准备2~3个阳性克隆子的菌液，尽量送测2个或以上克隆，这样成功率将大大提高，也节约很多时间；
- 也可以先送测1个克隆，其余两个克隆子的菌液在冰箱4℃保存，一旦出现个别点突变或缺失，立即将余下的两个克隆送测；这样得到正确的序列可能性将非常高，并且可以免去重新PCR、连接、克隆以及筛选的一系列实验操作，更省去了很多时间；如您发现2~3个以上克隆都在引物区存在突变，经确认是由引物的原因引起的话，我们会立即安排加急免费重合，并以最快的速度将引物送到您的手中。

3.2 引物的定量、保存和溶解

1) 如何确定需要合成多少OD值的引物？

根据实验目的确定，一般PCR扩增，20个碱基左右引物2 OD，可以做400次50 μl标准PCR反应。如果是做基因拼接或退火后做连接，1 OD就足够了。

2) 如何测定引物的OD值？

合成引物的OD值是这样测定的：用紫外分光光度计，波长260 nm，石英比色杯，光程为1厘米，测定溶液的光密度。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，用1 ml水稀释测OD值。需要根据稀释倍数换算出母液的OD值。例如，验证2 OD引物量是否准确，简单的做法是：加入1 ml水，彻底溶解混匀后，取100 μl，加入900 μl水，用光径为1 cm的石英比色杯，波长260 nm，此时光吸收的读数为0.2。

3) 如何通过OD值计算引物的浓度？

金斯瑞的合成报告单和引物标签上都会标识OD值与摩尔量。引物保存在高浓度的状况下比较稳定。溶解前您需要核对合成报告单和引物标签上的引物OD值是否一致。如果不一致，请及时和我们联系。我们可以根据生产记录查到实际产量是多少。

根据国际统一标准：1 OD引物干粉约为33 μg；引物的摩尔数(μmol) = 质量数/引物分子量 = (OD数 × 33)/引物分子量
如您拿到1管2 OD的引物，分子量是6565.3，引物的摩尔数(μmol) = (2 × 33)/6565.3 = 0.010 μmol = 10 nmol
若您需要溶解为10 μM (10 pmol/μl) 的溶液，只需加入1 ml无菌ddH₂O或10 mM pH7.5 TE缓冲液充分溶解即可。

4) 引物 (含修饰) 的分子量是如何确定的?

金斯瑞所提供的Oligo分子量均按照精确算法进行计算。

分子量计算公式： $MW = A \times 313.21 + G \times 329.21 + C \times 289.18 + T \times 304.2 + M \times 301.2 + R \times 321.21 + W \times 308.71 + S \times 309.2 + Y \times 296.69 + K \times 316.71 + V \times 310.53 + H \times 302.2 + D \times 315.54 + B \times 307.53 + N \times 308.95 + 16 \times Ns + \text{修饰基团分子量} - 61.96$

公式中Ns为硫代数，硫代每个位置增加分子量16，其余字母均代表相应碱基的个数。兼并碱基分子量取相应碱基分子量的平均值，如 $M = A/C = (313.21 + 289.18) / 2$ ，常用的兼并碱基代码：M=A/C; R=A/G; W=A/T; S=G/C; Y=C/T; K=G/T; V=A/G/C; H=A/C/T; D=A/G/T; B=G/C/T; N=A/G/C/T。

常规修饰基团分子量

修饰基团	分子量	修饰基团	分子量
5'-Biotin	447.11	3'-TAMARA	623.60
5'-(6 FAM)	537.46	3'-DABCYL	462.44
5'-HEX	744.13	3'-(6 FAM)	569.46
5'-TET	675.24	3'-Amino Modifier C3	153.07
5'-Cy5	644.70	3'-Amino Modifier C7	211.18
5'-Cy3	618.70	3'-Thiol Modifier C3	154.12

5) 如何保存引物?

引物合成后，经过一系列处理和纯化步骤，旋转干燥而成片状物质。没有溶解的引物非常稳定，-20℃下可保存2~3年，甚至更长。溶解后的引物-20℃下避免反复冻融，可以保存至少半年以上。如果对实验的重复性要求较高，合成的OD值较大，建议将溶解好的引物事先稀释为100 μmol/L的储存液，分装数份保存于-20℃冰箱。使用前，将浓溶液稀释成工作液 (10 pmol/μl或20 pmol/μl) 后进行实验。修饰荧光引物需要避光保存。

6) 引物在常温下运输，会降解吗?

不会降解，干燥的引物在常温下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。

7) 如何溶解引物?

干燥后的引物质地非常疏松，开启瓶盖溶解之前最好在3,000~4,000转/分钟的转速下离心1分钟，或管垂直向上在桌面上轻敲几次，将引物粉末收集到管底，防止开盖时引物散失。根据计算出的体积加入去离子无菌水或10 mM Tris pH 7.5缓冲液，室温放置几分钟，上下混匀振荡，离心将溶液收集至管底。溶解引物用的水一般不要用蒸馏水，因为有些蒸馏水的pH值比较低 (pH 4~5)，引物在这种条件下不稳定。

我们的合成报告单给出了每管引物稀释为100 μmol/L (即100 pmol/μl) 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 > 6.0) 或TE缓冲液 (pH 7.5~8.0)。

8) 已经溶解的引物，为什么原先使用正常，而过一段时间再使用就不好了?

如果您溶解引物的水pH过低或污染了菌或核酸酶，会使引物降解。使用时没有充分解冻混合，液体不均匀也可能造成引物加入量不准确。建议分装引物，避免反复冻融，并使用10 mM Tris pH 7.5缓冲液溶解引物。还有一种可能性是引物没有问题，而是PCR使用材料特别是模板的质量与先前使用的不完全一致。

3.3 引物的纯度及使用中的常见问题

1) 如何检测引物的纯度?

实验室常用PAGE法。使用加有7 M尿素的聚丙烯酰胺凝胶进行电泳，碱基数小于12 mer的引物用20%的胶，12~60 mer的引物用16%的胶，大于60 mer的引物用12%的胶。取0.2~0.5 OD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℃, 2 min)。加入尿素的目的是变性，二是增加样品比重，容易加样。600 V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)。

2) 当引物的 OD_{260}/OD_{280} 小于1.8时，引物的纯度合格吗?

OD_{260}/OD_{280} 的比值不能用来衡量引物的纯度。 OD_{260}/OD_{280} 的比值过低一般是由于引物中C/T的含量比较高所致。下表是一个20 mer同聚体引物的 OD_{260}/OD_{280} 的比值，清楚表明 OD_{260}/OD_{280} 的比值与引物的碱基组成密切相关。

碱基组成	OD_{260}/OD_{280}
5-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-3	2.50
5-GGGGGGGGGGGGGGGGGGG-3	1.85
5-CCCCCCCCCCCCCCCCCCC-3	1.15
5-TTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3	1.14
5-AAAAGGGGGTTTTTCCCC-3	1.66

3) 同样的OD用PAGE检测，EB染色为什么深浅不一?

通常可以用EB染色的方法来判断双链DNA的量 (如质粒DNA)，因为EB是通过嵌入到核酸的双螺旋间而使其着色的。而合成的单链DNA，只有通过自身回折形成局部夹环结构或链间形成部分双螺旋结构，才能被EB染色。由于碱基组成不同，不同引物形成二级结构的可能性不同，EB的染色程度也会有差异，比如Oligo (dT) 等不形成二级结构，EB染色效果就非常差。因此不能用EB染色的方法来进行定量，而应用紫外分光光度计检测。

4) 进行PAGE电泳时，长度完全一样的Oligo DNA为什么泳带不在同一位置?

这种情况在Oligo DNA越短时越容易发生，长链Oligo DNA之间差别较小。主要有两个原因：

- A、G、C、T的组份不同，电泳速度不同；
- DNA的立体结构不同，电泳速度不同。

5) 能否使用Agarose凝胶电泳分析合成的引物?

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，容易出现多条泳带或无条带的现象，更无法用Agarose电泳进行定量了。

6) 有时候干燥后的引物呈黄褐色，这是DNA本身的颜色吗?

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，所以呈黄褐色的引物不会对实验产生任何影响。

7) PCR扩增不出来，是跟引物有关吗?

基本上不是。当今发展出各式各样的PCR扩增技术，各式各样的高温聚合酶，就是来解决PCR扩增中遇到的扩不出，

扩增效率低的问题。如槽式PCR就是扩增那些拷贝数很低的基因片段。有些重复片段、GC含量高的片段扩增，必须采用特殊扩增手段才能扩增出来。

扩增不出，主要是下列两种情况比较常见：

- RT-PCR。很多基因通过常规RT-PCR方法是很难扩增出来的。RT-PCR成功的关键在于RT-PCR反应的RNA质量和目标基因在特定组织和细胞中的含量；
- 从基因组中扩增。一般情况下，基因在基因组中都是单拷贝，基因组作为模板需要严格控制用量。基因组DNA过高，会影响反应体系中的 Mg^{2+} 浓度和pH。

8) 合成的引物进行PCR反应时无目的带，怎么办？

PCR反应失败的原因很多，可以从以下几个方面考虑：

- 引物和模板是否配对，同源性有多大？
- 引物本身是否有立体结构，或者两条引物之间是否形成高次结构？
- PCR反应试剂是否能正常工作？
- PCR仪是否工作正常？
- PCR反应条件是否合适？

如果一切正常，还无法解决问题时，我们可以免费为您重新合成该引物。

9) PCR扩增有很强的非特异条带，说明引物有污染吗？

不能说明。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。

10) 如何将两条互补的单链退火形成双链？

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 μ l，加热到95 $^{\circ}$ C，2 min，然后缓慢冷却至室温（低于30 $^{\circ}$ C）即可。退火的产物可以放在4 $^{\circ}$ C 待用。

11) 引物片段退火后不能连接到载体上是什么问题？

连接反应需要引物的5'磷酸基团。如果需要将合成的引物退火直接连接到相应的载体上，引物需要磷酸化。磷酸化的产物如果还不能连接载体上，需检查载体的酶切效果，改善引物退火的条件。siRNA分子具有特殊的对称结构，退火的难度较大，退火时需要提高退火温度。

3.4 引物的设计及修饰

1) 常用引物设计软件有哪些？

常用的软件有Oligo 6和Primer Premier 5.0。引物设计软件是根据引物设计的指导意见设计而成。其实PCR扩增成败最关键的是反应模板的制备和反应条件的控制。引物设计软件的缺点是：有时判断为该基因没有一段区域满足标准引物的要求。

2) 文献上找到的引物和探针序列能否直接使用？

通常国外的文献可信度比较高，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。

3) 如何计算引物的Tm值？

Tm值的概念：

DNA熔解温度，指把DNA的双螺旋结构降解一半时的温度，亦即DNA 变性过程中，紫外吸收值达到最大值的50%时的温度称为DNA的解链温度（Tm）。

金斯瑞采用以下方法计算Tm值：

长度为20 mer及以下的引物，Tm计算公式为： $Tm = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$ 。但这个公式只适用于14~20个碱基的引物，引物的Tm值还与引物长度、碱基组成、引物使用缓冲溶液的离子强度等有关。

对于更长的寡聚核苷酸，Tm计算公式为： $Tm = 0.41(\% \text{ of GC}) - 675/L + 81.5$

注：L：引物碱基数；% of GC：引物GC含量，% of GC = GC个数/引物总碱基数

4) 为什么修饰引物的产量要比一般引物低，价格要高？

主要因为是修饰单体稳定性较差，偶联时间长，效率低，最后得到的产量自然低于一般的引物。修饰引物通常需要PAGE或HPLC纯化，纯化过程损失大。修饰引物使用的原料是一般引物原料的几百倍，所以产品的价格自然高。

5) 合成的荧光标记探针应如何保存？

荧光探针保存方法如下：

- 荧光探针必须避光保存；
- 干品可于-80 $^{\circ}$ C 保存一年以上，如无条件，请于-20 $^{\circ}$ C 保存；
- 强烈建议用RNase-free的TE (pH 8.0) buffer溶解探针，这样得到的探针溶液更稳定，保存时间更长。通常，将探针配制成100 pmol/ μ l的储备液，分装成几份（每份最多反复冻融5次），于-20 $^{\circ}$ C 保存。使用前，将配制好的储备液稀释成工作液（10 pmol/ μ l或20 pmol/ μ l），剩余部分于-20 $^{\circ}$ C 保存。

6) 常见的荧光染料有哪些？

荧光染料参数

缩写	全名	吸收波长	发射波长	颜色
6-FAM	6-carboxy-fluorescein	494 nm	518 nm	Green
TET	5-tetrachloro-fluorescein	521 nm	538 nm	Orange
HEX	5-hexachloro-fluorescein	535 nm	553 nm	Pink
TAMRA	tetramethyl-6-carboxyrhodamine	560 nm	582 nm	Rose
ROX	6-carboxy-x-rhodamine	587 nm	607 nm	Red
Cy3	Indodicarbocyanine	552 nm	570 nm	Red
Cy5	Indodicarbocyanine	643 nm	667 nm	Violet

7) 5-FAM、6-FAM、FITC标记之间有何区别？

5-FAM、6-FAM、FITC标记都是荧光素标记（Fluorescein），5-FAM与6-FAM互为异构体，而FITC则在与Oligo的连接方式上（硫脲键）有别于前两者（酰胺键），但它们的发色团均为荧光素，通常使用中无区别。

8) 淬灭基团为TAMRA、Eclipse或BHQ系列染料的双标记荧光探针在使用上有什么不同？

由淬灭基团TAMRA、Eclipse或BHQ系列染料组成的双标记荧光探针常常被用作水解探针（Hydrolysis Probes），或称TaqMan探针，用于实时荧光定量PCR实验。

- TAMRA为荧光染料，在淬灭报告基团的同时，会在更高波长处发射荧光。而Eclipse及BHQ系列为非荧光染料，淬灭报告基团时，自身不发射荧光，探针荧光本底比TAMRA低，检测灵敏度更高；
- TAMRA的吸收光谱覆盖范围窄，可与之匹配的报告基团种类比较少；而Eclipse则具有更宽的吸收范围（390 nm~625 nm），可淬灭的报告基团种类很多，如FAM、HEX、TAMRA、ROX等均可；组合使用的BHQ系列染料的吸收光谱覆盖范围则更广，从430 nm一直到近红外，可淬灭的报告基团种类更多，包括Cy3、Cy5等。因此可由Eclipse或BHQ系列染料组成一套双标记荧光探针用于多重PCR。

1. 知识荟萃

1.1 测序用引物说明

- 1) 自备引物时, 请提供浓度 (浓度必须正确) 大于5 pmol/μl的引物10 μl以上, 并注明引物序列;
- 2) 引物长度宜在20个碱基左右, GC含量在50~60%左右。不要使用含有Mix碱基的引物, 特别是3'端的3个碱基内不能含有Mix碱基;
- 3) 引物必须经过PAGE纯化, 纯度大于90%。

表4. 常用载体及相关通用引物

载体	一端	另一端
pBlueScriptSK (+)	M13F (-77)/M13F (-47)/M13F/T7	M13R (-88)/M13R (-48)/M13R/T3
pcDNA3	H1.3F/pCMV-F/pEGFP-N-5/T7	BGH
pcDNA3.1(+)	H1.3F/pCMV-F/pEGFP-N-5/T7	pCDNA3.1R/BGH
pcDNA3.0 (+)/myc-His C/A/B	H1.3F/pCMV-F/pEGFP-N-5/T7	BGH
pcDNA3.1 (+)/myc-His C/A/B	H1.3F/pCMV-F/pEGFP-N-5/T7	pCDNA3.1R/BGH
pcDNA3.1 (+)/myc-His/LacZ	H1.3F/pCMV-F/pEGFP-N-5/T7	pCDNA3.1R/BGH
pcDNA3.1/His C/A/B	H1.3F/pCMV-F/pEGFP-N-5/T7	pCDNA3.1R/BGH
pcDNA3.1/His/LacZ	H1.3F/pCMV-F/pEGFP-N-5/T7	pCDNA3.1R/BGH
pcDNA3.1/Hygro (-)	H1.3F/pCMV-F/pEGFP-N-5/T7	pCDNA3.1R/BGH
pcDNA3.1/Hygro (+)	H1.3F/pCMV-F/pEGFP-N-5/T7	pCDNA3.1R/BGH
pcDNA3.1/Hygro/LacZ	H1.3F/pCMV-F/pEGFP-N-5/T7	pCDNA3.1R/BGH
pcDNA3.1/V5-His C/A/B	H1.3F/pCMV-F/pEGFP-N-5/T7	pCDNA3.1R/BGH
pcDNA3.1/V5-His/LacZ	H1.3F/pCMV-F/pEGFP-N-5/T7	pCDNA3.1R/BGH
pcDNA3.1/V5-His-TOPO	H1.3F/pCMV-F/pEGFP-N-5/T7	pCDNA3.1R/BGH
pcDNA3.1/V5-His-TOPO/LacZ	H1.3F/pCMV-F/pEGFP-N-5/T7	pCDNA3.1R/BGH
pcDNA3.1/Zeo (-)	H1.3F/pCMV-F pEGFP-N-5/T7	pCDNA3.1R/BGH
pcDNA3.1/Zeo (+)	H1.3F/pCMV-F/pEGFP-N-5/T7	pCDNA3.1R/BGH

载体	一端	另一端
pcDNA3.1/Zeo/CAT	H1.3F/pCMV-F /pEGFP-N-5/T7	pCDNA3.1R/BGH
pColdI DNA	p-GEX3'	
pColdII DNA	p-GEX3'	
pColdIII DNA	p-GEX3'	
pColdIV DNA	p-GEX3'	
pDream2.1	H1.3F/pCMV-F /pEGFP-N-5/T7	SP6
pEGFP-N1,2,3	H1.3F/pCMV-F/pEGFP-N-5	pEGFP-N-3'/pEGFP-C-5'/pEGFP-C-3'
pET15b	T7	T7ter
pET20b	T7	T7ter
pET22b	T7	T7ter
pET28a	T7	T7ter
pET28b	T7	T7ter
pET30b	T7	T7ter
pFastBac Dual	pEGFP-C-3'	
pFastBac HT A,B,C	pEGFP-C-3'	
pFastBac1	pEGFP-C-3'	
pGEM-T Easy	M13F (-77)/M13F (-47)/M13F/T7	M13R (-88)/M13R (-48)/M13R
pGEX-4T-1/3	p-GEX5'	p-GEX3'
pGS-21a	p-GEX5'	T7ter
pLenti6/V5-D-TOPO	M13F(-47)/M13F/T7	M13R (-48)/M13R/T3
pLenti6/V5-GW/lacZ	M13F(-47)/M13F/T7	M13R (-48)/M13R/T3
pMAL-p2x	M13F(-47)/M13F/PBV220R	M13R (-48)

表5. 通用引物及序列

载体	一端	另一端
pMD18-T	M13F (-77)/M13F (-47)/M13F	M13R (-88)/M13R (-48)/M13R
pMD19-T	M13F (-77)/M13F (-47)/M13F	M13R (-88)/M13R (-48)/M13R
pMTBiPV5-His GFP	p-GEX3'/ M13F (-47)/M13F	M13R (-88)/M13R (-48)/M13R/ pEGFP-C-3'/BGH
pPCR script	M13F (-77)/M13F (-47)/M13F/T7	M13R (-88)/M13R (-48)/M13R/T3
pPIC3.5	5'AOX	3'AOX
pPIC9	5'AOX	3'AOX
pPICZ C/A/B	5'AOX	3'AOX
pPICZalpha C/A/B	5'AOX/ α -Factor	3'AOX
pSecTag2 A,B,C	H1.3F/pCMV-F /pEGFP-N-5/T7	BGH
pTWIN	T7	T7ter
pUC57	M13F (-77)/M13F (-47)/M13F	M13R (-88)/M13R (-48)/M13R
pUC18	M13F (-47)/M13F	M13R (-48)/M13R
pUC19	M13F (-47)/M13F	M13R (-48)/M13R
其它

注：

- 排列顺序为：由左到右- (离插入位点) 由远到近
- 若有多个引物，红色的为首选引物
- 选择测序通用引物时，以距离插入位点约50个碱基为佳
- 同时有T7, T7ter的载体，单反应首选T7ter
- 同时有T7, pCDNA3.1R的载体，单反应首选pCDNA3.1R
- 同时有T7, BGH的载体，单反应首选BGH
- 同时有pCMV-F, BGH的载体，单反应首选BGH

引物名称	序列	引物名称	序列
5'AD	5'- AGG GAT GTT TAA TAC CAC TAC -3'	M13R(-48)	5'- AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA -3'
3'AD	5'- AGA TGG TGC ACG ATG CAC AG -3'	GLP1	5'- TGT ATC TTA TGG TAC TGT AAC TG -3'
5AOX1	5'- GAC TGG TTC CAA TTG ACA AGC -3'	GLP2	5'- CTT TAT GTT TTT GGC GTC TTC CA -3'
3AOX1	5'- GCA AAT GGC ATT CTG ACA TCC -3'	pBAD Forward	5'- ATG CCA TAG CAT TTT TAT CC -3'
A-FACTOR	5'-TAC TAT TGC CAG CAT TGC TGC -3'	pBAD Reverse	5'- GAT TTA ATC TGT ATC AGG -3'
3'BD	5'- TAA GAG TCA CTT TAAAAT TTG TAT C -3'	pEGFP-N-5'	5'- TGG GAG GTC TAT ATA AGC AGA G -3'
CMV-Forward	5'- CGC AAA TGG GCG GTA GGC GTG -3'	pEGFP-N-3'	5'- CGT CGC CGT CCA GCT CGA CCA G -3'
CMV-R	5'- GTT CAC GGT GCC CTC C -3'	pEGFP-C-5'	5'- CAT GGT CCT GCT GGA GTT CGT G -3'
PGEX-5'	5'- GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG -3'	pEGFP-C-3'	5'- TAT GGC TGA TTA TGA TCA GT -3'
PGEX-3'	5'- CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GG -3'	pFastBacF	5'- GGA TTA TTC ATA CCG TCC CA -3'
T3	5'- ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA -3'	pFastBacR	5'- CAA ATG TGG TAT GGC TGA TT -3'
T7	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3'	RVP3	5'- CTA GCA AAA TAG GCT GTC CC -3'
T7-Ter	5'- GCT AGT TAT TGC TCA GCG G -3'	RVP4	5'- GAC GAT AGT CAT GCC CCG CG -3'
BGH	5'- TAG AAG GCA CAG TCG AGG -3'	PMAL-C2X-F	5'- TGC GTA CTG CGG TGA TCA AC -3'
SP6	5'- GAT TTA GGT GAC ACT ATA G -3'	PMAL-C2X-R	5'- CTG CAA GGC GAT TAA GTT GG -3'
M13F	5'- TGT AAA ACG ACG GCC AGT -3'	PQE30F	5'- TGA GCG GAT AAC AAT TTC AC -3'
M13R	5'- CAG GAA ACA GCT ATG AC -3'	PQE30R	5'- GTT CTG AGG TCA TTA CTG G -3'
M13F (-47)	5'- CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC -3'	S.TAG	5'-CGAACGCCAGCACATGGACA-3'

1.2 测序对样品的要求

为提高测序成功率，一份信息完整的测序订单应包含以下信息：样品名称、类型、测序引物名称 (包括浓度和纯化方式)、引物序列、每样品反应个数、菌体抗性、载体名称、片段大小及是否含有高级结构或特殊序列等。

1) 菌

- 新鲜菌液：将过夜培养的肉眼可辨且明显混浊的大于200 μ l的菌液加灭菌甘油至终浓度为20%，注意封口，以免污染。请您最好提供200 μ l以上新鲜菌液，装在1.5 ml离心管中并用封口膜封好交给我们的工作人员或快递邮寄，或者提供4 ml新鲜菌液，我们可直接进行质粒的提取。

b) 穿刺菌：请将单菌落用牙签穿刺于含有适当抗生素的固体培养基中，培养过夜看到肉眼可辨菌落并且无杂菌即可寄送。

c) 甘油菌：加甘油-80 冷冻保存的菌株请复苏后再提供。

提供的平板菌，穿刺菌或甘油菌，请注明培养条件。平板请用封口膜将其封好交给我们的工作人员，如快递邮寄，请做好缓冲处理，以避免在运输过程中可能出现的损坏。

我们的常规培养基为LB，培养温度为37℃，常规抗生素为氨苄青霉素、卡那霉素、氯霉素。您的样品如果需要特殊培养要求，请提供4 ml的新鲜菌液；如使用特殊抗生素，请您一定提供储存液并告知浓度以及工作浓度。

另请确保您提供的菌种的准确性，如因菌种自身问题引起的任何测序结果误差，我们将收取全额的测序费用。

2) 质粒

如果您的质粒纯度可以达到全自动测序的要求，即： $OD_{260}/OD_{280}=1.6\sim 2.0$ ，也可以直接提供质粒。质粒浓度要求大于200 ng/μl，提供10 μl以上。如果提供质粒偏少，需要公司转化时，需收取质粒转化费用。

如果是噬菌体DNA、低拷贝质粒及BAC、Cosmid DNA，请纯化好模板直接用于测序。请您纯化DNA模板时注意：纯化的DNA模板要求纯度高。纯化以后的DNA模板要溶解于无菌去离子水中。浓度要求大于200 ng/μl (载体较大的，浓度要求大于500 ng/μl)，提供10 μl以上 (一般情况下，经测序部检测合格后才可使用)。

无论提供菌或质粒，请您务必写明：

质粒的名称和详细图谱插入片段的大小和酶切位点

选取的测序引物名称和序列，并且标明测序引物距离插入片段的位置 (注：测序引物以后可能会有20~30个碱基由于荧光染料影响判读不清)

如果提供特殊测序引物，请写明序列，并且一定要提供经PAGE纯化的引物，浓度> 5 pmol/μl

3) PCR产物

如果您提供的是PCR原液，我们将进行琼脂糖凝胶电泳纯化。回收后的产物无论测序成功与否，我们将收取一定的纯化费用。请提供大于50 ng/μl, 50 μl以上，目的条带单一且无杂带的PCR粗产物，同时提供PCR反应的退火温度，PAGE纯化的双向引物及序列。随机引物和简并引物以及浓度低于5 pmol/μl的引物不能用于测序。

如果您提供纯化好的PCR产物，条带必须单一，纯度 $OD_{260}/OD_{280}=1.6\sim 2.0$ 。最好溶解在已灭菌的去离子水中，浓度要求大于50 ng/μl，提供10 μl以上。同时提供PCR反应的退火温度，PAGE纯化的双向引物 (请标明浓度，浓度需大于5 pmol/μl) 及序列。长度小于100 bp 或大于2,000 bp的PCR 样品建议克隆后测序，PCR产物多带、弥散的样品请重新备样或克隆后测序。

注意事项：

a) PCR产物直接测序成功的关键是PCR产物的纯度，所以我们提倡切胶回收PCR产物。如果有几条PCR产物长度相近，用电泳胶也无法分开，此时的PCR产物便无法直接测序，这种情况建议把PCR产物克隆后测序；

b) PCR产物直接测序成功的另一要因是引物，不是能做PCR反应的引物便能测序。测序用引物要求较高，引物的3'端必须与模板完全匹配，含有Mix碱基的引物一般不能测序 (特别是3'端)。此外，测序引物长度一般为20个碱基左右，GC含量必须在50~60%左右。而且用于测序的引物一定要经过PAGE纯化，纯度必须大于90%；

c) 在PCR扩增时，难以扩增 (扩增后的PCR带较弱) 的PCR产物在测序时一般成功率较低；

d) 小于100 bp的PCR产物直接测序效果不好，建议克隆后测序。

4) Cosmid中插入DNA片段的测序

请提供至少5 μg纯化后的Cosmid DNA (因每个反应的用量需1 μg以上)，并注明浓度。同时提供浓度大于5 pmol/μl的引物10 μl以上 (浓度必须正确)。

2. 测序服务简介

DNA测序是重要的分子生物学分析方法之一，它不仅为基因表达、基因调控等生物学基础研究提供重要数据，而且也在疾病诊断学、基因治疗等应用研究中起着重要的作用。

金斯瑞是全球最大的基因合成供应商，同时其测序服务质量和通量亦位居国内最高水平。公司不仅拥有国际先进的DNA测序设备，还具备一支阵容强大、经验丰富、技术娴熟的专家队伍。无论是高GC含量还是二级结构未知的复杂序列测序难题，在这里都可以迎刃而解。

服务特色：

- ▶ 南京地区快速测序：质粒、PCR产物测序，结果次日12:00即可查；菌液测序，结果次日20:00即可查
- ▶ 测序在线查询系统：测序结果查询，数据存档，样品记录，技术支持和在线留言等功能
- ▶ 复杂序列测序准确率高：对于高GC含量或者二级结构未知的复杂序列有较高的成功率

3. 常见问题解答

3.1 常见峰图原因分析及解决方案

表6. 菌液、质粒及PCR产物等测序常见峰图原因说明及建议解决方案

测序情况	可能导致的原因	建议解决的方案
测序完成，为空载体	没有插入目的片段或插入片段丢失	重新挑取单克隆，进行菌落PCR或者双酶切验证后送测
测序完成，测序结果衰减或中断	可能您的样品中含有高级结构或GC含量较高	建议更换反向引物测序或者用高级试剂盒测序
测序完成，重复序列后出现双峰/乱峰/衰减/中断	您的目的片段中有重复序列	建议更换反向引物测序，或者更换特殊方案进行试验。
测序完成，插入后双峰，样品非单克隆	模板中含有两个或两个以上的相同载体，但插入片段不同	重新挑取单克隆测序
测序完成，Poly (A/T/C/G) 结构后出现双峰/乱峰/衰减/中断 测序完成，测序结果双峰	您的目的序列中有连续A/T/C/G	建议更换反向引物测序
测序完成，测序结果双峰	可能您提供的测序引物不纯 (引物中有兼并碱基) 或降解导致	建议更换反向引物测序或者重新合成引物测序 (测序引物要求是PAGE纯化)；如果样品是菌与质粒，建议考虑更换载体通用引物测序
	可能引物有两个或以上结合位点	建议更换其它引物继续实验；如果是PCR产物，建议克隆后测序
实验停止，两次摇菌不成功，请您重新提供样品	可能您的模板不纯 (多见于PCR产物测序结果)	建议重新提供模板或者克隆后测序，建议切胶纯化。如果您样品本身就存在杂合，那测序结果也是双峰。
	可能菌的活性较低或者浓度较低，或者需要比较特殊的培养条件 (如低温，诱导培养等)	建议重新提供新鲜菌液测序，或者提供抽提好的质粒样品

测序情况	可能导致的原因	建议解决的方案
实验停止，两次抽提质粒不成功，请您重新提供样品或者提供抽提好的质粒	可能是菌的活性较低或者质粒拷贝数较低等，另外还可能是样品已经被杂菌污染。	建议重新提供新鲜菌液测序，或直接提供符合要求的质粒测序
实验取消，您的样品经鉴定，样品不纯，不满足测序的要求	样品检测条带异常或者条带大小不符	建议重新提供符合测序要求而且片段大小正确的样品测序。质粒 (> 100 ng/μl; 20 μl); PCR产物 (50 ng/μl; 30 μl ~ 40 μl), PCR产物要求条带单一明亮

3.2 测序答疑

Q-1. 为什么提供新鲜的菌液？如何提供新鲜的菌液？

A-1. 首先，新鲜的菌液易于培养，可以获得更多的DNA，同时最大限度地保证菌种的纯度。如果您提供新鲜菌液，用封口膜封口以免泄露；也可以将培养好的4~5 ml菌液沉淀下来，倒去上清液以方便邮寄。同时邮寄时最好用盒子以免邮寄过程中压破。

Q-2. DNA测序样品用什么溶液溶解比较好？

A-2. 溶解DNA测序样品时，用灭菌蒸馏水溶解最好。DNA的测序反应也是Taq酶的聚合反应，需要一个最佳的酶反应条件。如果DNA用缓冲液溶解后，在进行测序反应时，DNA溶液中的缓冲液组份会影响测序反应的体系条件，造成Taq酶的聚合性能下降。

有很多客户在溶解DNA测序样品时使用TE Buffer。的确，TE Buffer能增加DNA样品保存期间的稳定性，并且TE Buffer对DNA测序反应的影响也较小，但根据我们的经验，我们还是推荐使用灭菌蒸馏水来溶解DNA测序样品。

Q-3. 提供DNA测序样品时，提供何种形态的比较好？

A-3. 我们推荐客户提供菌体，由我们来提取质粒，这样DNA样品比较稳定。如果您可以提供DNA样品，我们也很欢迎，但一定要注意样品纯度和数量。如果提供的DNA量不够，我们就需要对质粒进行转化，此时需收取转化费。有些质粒提取法提取的DNA质量很好，如TaKaRa、Qiagen、Promega的质粒制备试剂盒等。

提供的测序样品为PCR产物时，特别需要注意DNA的纯度和数量。PCR产物必须进行切胶回收，否则无法得到良好的测序效果。

有关DNA测序样品的详细情况请参照“测序对样品的要求”部分的说明。

Q-4. 提供的测序样品为菌体时，以什么形态提供为好？

A-4. 一般菌体的形态有：平板培养菌、穿刺培养菌、甘油保存菌或新鲜菌液等。我们提倡寄送穿刺培养菌或新鲜菌液。

平板培养菌运送特别不方便，我们收到的一些平板培养菌的培养皿在运送过程中常常已经破碎，面目全非，需要用户重新寄样。这样既误时间，又浪费客户的样品。一旦是客户非常重要的样品时，其后果更不可设想。而甘油保存菌则容易污染。

制作穿刺菌时，可在1.5 ml的Tube管中加入琼脂培养基，把菌体用牙签穿刺于琼脂培养基(固体)中，37℃培养一个晚上后即可使用。穿刺培养菌在4℃下可保存数月，并且不容易污染，便于运送。

Q-5. PCR产物直接测序有什么要求？

A-5. a) 扩增产物必须特异性扩增，条带单一。如果扩增产物中存在非特异性扩增产物，一般难以得到好的测序结果；
b) 必须进行胶回收纯化；
c) DNA纯度在1.6~2.0之间，浓度在50 ng/μl以上。

Q-6. 为什么PCR产物直接测序必须进行Agarose胶纯化？

A-6. 如果不进行胶纯化而直接用试剂盒回收，经常会导致测序出现双峰甚至乱峰。这主要是非特异性扩增产物或者原来的PCR产物去除不干净导致。大多数所谓的PCR“纯化试剂盒”实际上只是回收产物而不能起到纯化的作用。对于非特

异扩增产物肯定是无法去除的，而且通常它们不能够完全去除所有的PCR引物，这会造成残留的引物在测序反应过程中参与反应而导致乱峰。

Q-7. 如何进行PCR产物纯化？

A-7. PCR产物首先必须用Agarose胶电泳，将目的条带切割下，然后纯化，使用凝胶回收试剂盒进行回收。产物用ddH₂O溶解。

Q-8. 对于测序用的质粒DNA的要求有哪些？

A-8. 对于测序用质粒DNA的一般要求：

- DNA纯度高，在1.6~2.0之间，不能有混合模板，也不能含有RNA，染色体DNA，蛋白质等；
- 溶于ddH₂O中，溶液不能含杂质，如盐类或EDTA等螯合剂，否则将干扰测序反应的正常进行。

Q-9. 如何鉴定质粒DNA浓度和纯度？

A-9. 我们使用水平琼脂糖凝胶电泳，并在胶中加入0.5 μg/ml的EB，加入一个已知浓度的标准样品。电泳结束后在紫外灯下比较亮度，判断浓度和纯度。此方法可以更直接、准确地判断样品中是否含有染色体DNA、RNA等，也可以鉴别抽提的质粒DNA的不同构型。

质粒DNA的3种构型是指在抽提质粒DNA过程中，由于各种因素的影响，使得超螺旋的共价闭环状的质粒(SC)的一条链断裂，变成开环状(OC)分子，如果两条链发生断裂，就变成线状(L)。这3种分子有不同的迁移率，通常，超螺旋(SC)迁移速度最快，其次是线状(L)分子，最慢为开环状(OC)分子。使用紫外分光光度计检测，或者用EB-标准浓度DNA比较法只能检测抽提到的产物的浓度，甚至由于抽提的质粒DNA中含有RNA、蛋白质、染色体DNA等因素的干扰，浓度检测的数值也是没有多少意义的。

Q-10. 对测序引物的要求有哪些？

A-10. 对测序引物的一般要求：

- 特异性与测序模板结合，不能有多于4个碱基以上的错配现象；
- 不能含有混合碱基；
- 长度约为17~25个碱基；
- 纯度高，最好PAGE纯化；
- 用ddH₂O溶解，不要用TE缓冲液溶解。

Q-11. 为什么测序引物必须特异地与DNA模板结合？

A-11. 测序引物与待测样品DNA分子只能有一个结合位点是测序成功的关键。如果测序引物在DNA模板分子上有不只一个的结合位点，将造成测序反应过程中引物链在几个结合位点处同时扩增，反映在测序峰图上将出现双峰或乱峰，无法读取序列。

Q-12. 测序结果有很多套峰(出现很多N)，还照常收费，为什么？

A-12. DNA模板上出现两处以上的引物结合位点，或者DNA模板上有严重的重复序列，以及测序引物不纯时，测序结果便会出现套峰现象。出现这种现象的原因由DNA模板本身或者引物本身所造成，对这些结果(公司保证进行两次以上的测序工作)，公司会根据具体情况进行收费。

Q-13. 为什么用PCR产物测序时，经常会出现套峰现象？

A-13. PCR产物测序出现套峰现象，一般有以下几种原因：

- PCR用模板不纯或PCR用引物特异性不好，扩增出的产物除了目的片段外，还有与目的片段长度相近的片段，即使用凝胶电泳也无法分离开，这样的PCR产物测序结果是套峰；
- 结构上的原因，造成了PCR产物测序出现套峰的现象。Poly(A/G/C/T)以及原因不明的复杂结构的存在，都会出现测序结果套峰的情况。

Q-14. 出现套峰的原因是什么？

A-14. 在测序反应中，模板或引物的原因都可能造成套峰的形成，归结其形成原因有以下几点：

- a) 测序引物在模板上有两个结合位点形成套峰；
- b) 模板不纯，如果是质粒或是菌液，原因是非单克隆，如果是PCR，原因为非特异性条带；
- c) 模板序列的特殊结构，如Poly结构、发卡结构等；
- d) 引物降解，引物不纯，或引物的特异性不好。

Q-15. 为什么在测序报告上找不到引物序列？

A-15. 这里分四种情况：

- a) 的确找不到测序使用的引物序列。目前使用的测序方法是在ddNTP上做荧光标记，测序仪通过检测ddNTP上的荧光来读取序列，因为引物本身是不做荧光标记的，所测序列是从引物3'末端后第一个碱基开始的，所以在测序结果上找不到测序引物的序列。如果是PCR产物，要想得到PCR引物的序列，可以将PCR产物进行双链测通或者将PCR产物克隆到载体上，用载体上的引物（注意此引物也不能离插入片段太近）测序；
- b) 找不到克隆片段的扩增引物。原因可能是您在构建质粒时采用的工具酶的酶切位点距离您的测序引物太近，由于荧光染料的干扰在序列开始的部分不会十分准确；
- c) 还有一种可能是您的插入片段的插入方向是反的，这时您不妨找一下您引物的互补序列；
- d) 存在单引物扩增，有一条引物的特异性不好，有多个结合位点导致只有一条引物参与扩增。

Q-16. 在测序结果上，找不到测序用引物后面的序列，为什么？

A-16. 根据sanger测序原理，测序引物后面大约30 bp由于荧光染料的影响可能会判读不清，请引起注意。

Q-17. 怎样使用金斯瑞提供的测序报告？

A-17. 在我们提供的测序报告中，有一份打印的(并用E-mail提供) DNA碱基排列顺序的测序结果。这个结果是我们根据测序仪的自动分析结果，并经严格确认后打印(并用E-mail提供)的测序结果。但测序仪有时会发生误读或漏读现象，而我们的工作人员在检查时也没有发现，这时的打印结果(并用E-mail提供)会出现错误。只有原始的测序彩色波形图才是最正确的，请客户拿到结果后进行详细确认。如有不明白的地方，请立即和我们联系，我们会及时确认并进行解决。

Q-18. PCR片段直接测序和PCR片段经克隆后测序的结果有何区别？

A-18. 众所周知，PCR扩增过程中会出现很多错配现象，但不可能所有的错配都发生在同一位置。PCR片段直接测序时，其结果是PCR片段众多分子的混合物的结果。如果在某一个点上出现了几十次错配现象，但大多数分子(或许是几十万分子)在这个点上应该还是正确的，在测序时，错配现象也就反映不出来了。因此，PCR片段直接测序的结果反映的是PCR用模板最原始的结果。而PCR片段经克隆后测序是测定了某一个分子的DNA序列。在几十个循环的PCR扩增过程中，很难保证某一个分子的任何点都不发生错配。因此PCR片段经克隆后的测序结果，往往存在着一些错配的序列，和PCR片段直接测序的结果相比有些碱基会有所不同。这种错配现象的多少取决于PCR扩增时使用的DNA聚合酶的保真性能。要减少PCR扩增过程中的错配现象，在PCR反应时，请选用保真性能高的DNA聚合酶。

Q-19. 我的基因序列与标准序列为什么有差别？

A-19. 一段基因序列经扩增后，克隆到载体中进行测序。在两个层次上可能导致序列发生变化。首先，在PCR扩增过程中就可能产生错误，将片段克隆到载体中也有可能发生突变；其次，测序的准确率问题。ABI公司承诺其仪器的测序精度在一定范围内可以达到98.5%以上。由于仪器准确率的限制，在一个较长的序列中发生碱基序列错误是难以避免的。在确认克隆无误的情况下，通过双向测序可以最大限度减少测序的错误。您如果想得到最准确的序列，进行双向测序是很有必要的。只进行简单的单向测序，我们无法保证所测序列的完全准确性，这是由仪器的精度决定的。

Q-20. DNA片段很长，一个反应读不到头，怎么办？

A-20. 如果DNA片段在载体上，可以用载体上两端的引物同时测序，让其中间交叉互补，便可完全测通。如果这样还读不通，可根据已经测出的序列设计测序引物作进一步测序(此称为Primer Walking法)，便可完全测通。

Q-21. 测序完成后，测序样品和引物将如何处理(或保存)？

A-21. a) 客户需要将测序样品或引物(客户自带的) 返还时，我们在发送测序报告的同时，按客户要求寄回样品或引物(客户自带的)；

b) 对于没返回的测序样品和引物，公司负责保存两个月(从样品收到之日算起)，超过两个月还需测序的样品，请客户另行提供。

Q-22. 超过6 Kb的DNA片断如何进行测序？

A-22. 超过6 Kb的DNA片断用Shot Gun进行测序，准确且节省时间，Shot Gun方法如下：

- 用物理方法打碎DNA；
- 回收1~1.5 Kb的片断；
- 用核酸酶切平端，连接入载体；
- 按照一定比例进行测序，保证每一个区段有3倍以上的数据；
- 编辑所有测序数据；
- 如果有缺少数据的区域，还需要补充测序，拼接成完整序列。

Q-23. 全自动荧光测序的准确性如何？

A-23. 我们有两种不同型号的测序仪：ABI377和ABI3730。ABI3730测序仪也是采用ABI公司配套的Big DYE Terminator cycle sequencing Kit，其准确性达到800个碱基只有1个以下的错误，并且该测序仪对碱基的判读有一个自身的评判值(Quality Value)，根据QV值的大小，也可以帮助我们来判断每一个碱基的准确程度。

Q-24. 用测序的方法检测点突变可靠吗？

A-24. 有的客户想用测序的方法检测点突变体，我们认为该方法可靠性不高。主要有以下两个原因：首先，我们并不清楚突变的序列与正常的序列的比例是多少。测序反应的信号强度直接与模板的量有关，如突变的模板所占的比例很少，将直接作为背景噪音了，很难检测出来。只有当测序反应体系中正常的和突变的模板量比较接近时，才能较可靠地检测到突变体的存在；其次，在同一位置不同碱基的信号强度一般是不一样的。这样即使突变的模板所占的比较高时，也不一定能准确检测到突变的存在。

另外，测序仪是设计用来测序正常的碱基序列的，软件在对扫描的结果进行处理时，会尽量提高主峰而将背景信号尽量压低，以得到尽可能好的结果。因此，当某处出现双峰时，测序仪一般会认为信号弱的峰为背景信号，在处理过程中，将弱的峰进一步压低，这样不利于突变体的检测。因此认为，用测序的方法检测突变体的存在不是一个好的方法。

Q-25. 我的样品你们已经测通了，但为什么在overlap区有这么多的错配，给出的全序列和单个报告也存在差异，我该相信哪个？

A-25. 给出的全序列是一个拼接的结果，当互相拼接的两个序列存在差异时，应该以序列质量更好的为主，这也就是为什么会出现错配和全序列与单个测序结果的差异。

Q-26. 你们为什么在primer walking时总将引物设计的那么靠前？

A-26. 我们在设计引物时有两个准则：一是设计引物区域的序列必须准确，二是在引物区后必须还有足够的准确序列以便拼接。这样我们设计引物的位置就必然比较靠前，在满足软件设定的条件下，我们总会选取最靠近3'端的引物来作为最终的测序引物。

Q-27. 样品送测前已经鉴定过是有插入片段的，为什么测序结果是一个空质粒？

A-27. 测序是对样品的最好验证。结果为空载，可能如下：

- a) 可能在培养过程中发生插入片段的丢失，这种情况的发生无法事先预期；
- b) 提供的克隆是假阳性克隆。

金斯瑞提供的免费在线工具不仅包括分子生物学常用的分析软件，更有金斯瑞自主研发的基因合成序列分析软件、密码子优化软件、引物设计相关分析软件、siRNA设计相关分析软件等。您可注册成为金斯瑞会员，直接使用如下在线工具。

1. 分子生物学/基因设计软件

- a) 稀有密码子分析软件
- b) 常用限制性酶及酶切位点列表
- c) 常用偏爱密码子表
- d) 限制性酶切图谱分析
- e) 序列处理在线工具包

2. 测序峰图阅读软件

Chromas：ABI格式文件、测序结果的显示与编辑软件

下载地址：<http://www.genscript.com.cn/download/software/chromas.rar>

3. 引物设计相关软件

- a) 引物计算工具
- b) 引物设计工具
- c) 测序引物设计软件
- d) Real-time PCR引物设计软件

4. siRNA相关软件

- a) siRNA靶位点设计
- b) siRNA构建工具
- c) siRNA库
- d) siRNA阴性对照设计软件

5. DNA Star介绍

实验室必备软件，功能主要有：序列的格式转换，序列拼接和重叠克隆群的处理；基因寻找；蛋白质结构域的查找；多重序列的比较和两两序列比较；寡核苷酸设计（PCR引物，测序引物，探针）。

DNA Star软件组成

- 1) EditSeq：用来将DNA或蛋白质序列的数据输入计算机的工具，同时还具有编辑已有序列的功能。
- 2) MapDraw：酶切图谱分析，克隆实验设计，分析及处理实验结果等。同时还具有绘制质粒图谱的功能。
- 3) GeneQuest：帮助查找和注释DNA序列中的基因和其他特征序列，包括ORFs，剪接位点，转录因子结合位点，重复序列和酶切位点等。
- 4) MegAlign：对DNA或蛋白质序列进行同源比较，有六种不同的对准算法供用户选择。在同源比较的同时，能很快输出进化树和进化距离等数据。
- 5) Protean：分析和预测蛋白质结构，提供各种分析方法并以图形的格式输出结果，显示蛋白质分子的各种理化特性以及例如抗原决定簇等功能区的预测功能。
- 6) PrimerSelect：设计PCR引物、测序引物和探针。
- 7) SeqMan II：多序列拼接。最多支持64,000条序列的同时拼接。在拼接前可以对序列进行修正，对自动测序的序列结果可除去污染序列或载体序列。整个拼装过程即时显示，并提示可能的完成时间。拼装结果采用序列、策略等方式显示。