

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



分子生物学专题手册

知识荟萃，答疑集锦，专家云集，助您科研一臂之力！

- ◎ 分子克隆实验专题
- ◎ 基因合成专题
- ◎ 引物专题
- ◎ 测序专题
- ◎ 常用生物信息学工具

基因合成服务：025-58897288-5820 gene@genscript.com.cn
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

分子克隆实验专题

1. 实验流程	2
1.1 目的基因获取	2
1.2 质粒制备	2
1.3 酶切质粒及目的基因	2
1.4 目的基因与质粒载体的连接	3
1.5 感受态细胞的制备及转化	3
1.6 重组质粒的筛选	5
1.7 酶切鉴定重组质粒	5
2. PCR	7
2.1 影响PCR反应的条件	7
2.2 常见问题分析及对策	8
3. 限制性内切酶酶切反应	13
3.1 常用酶酶切位点	13
3.2 酶切注意事项	13
3.3 常见问题及对策	14
4. 常用试剂、缓冲液配制方法	17

目录

基因合成专题

1. 知识荟萃	19
1.1 基因合成vs.基因克隆	19
1.2 密码子优化	20
2. 基因合成服务简介	21
3. 常见问题解答	22

引物专题

1. 知识荟萃	23
1.1 引物设计	23
1.2 PCR设计引物时酶切位点的保护	24
1.3 引物纯化方式选择指南	27
2. 引物合成服务简介	29
3. 常见问题解答	29
3.1 引物合成及纯化	29
3.2 引物的定量、保存和溶解	30
3.3 引物的纯度及使用中的常见问题	32
3.4 引物的设计及修饰	33
4. 如何订购引物合成服务	35

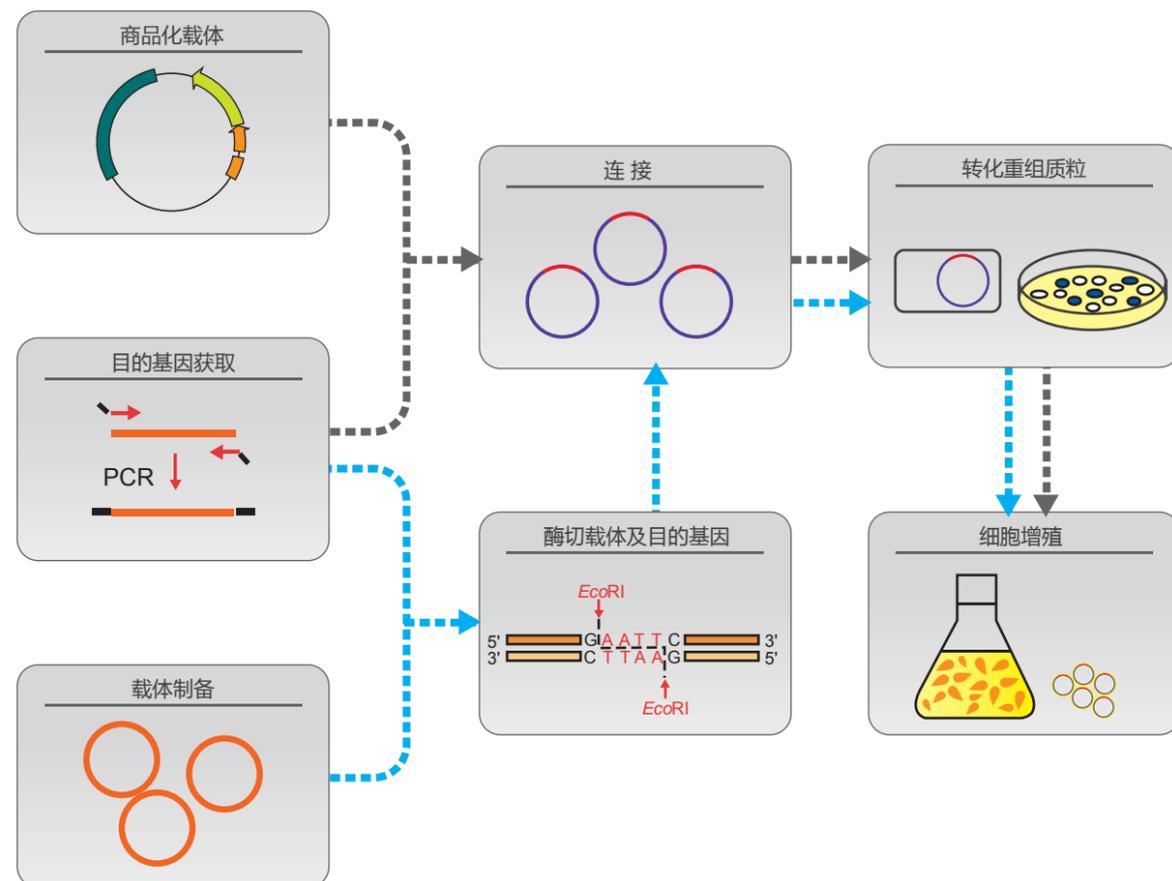
测序专题

1. 知识荟萃	36
1.1 测序用引物说明	36
1.2 测序对样品的要求	39
2. 测序服务简介	40
3. 常见问题解答	41
3.1 常见峰图原因分析及解决方案	41
3.2 测序答疑	41
4. 如何订购测序服务	45

常用生物信息学工具

1. 分子生物学/基因设计软件	47
2. 测序峰图阅读软件	47
3. 引物设计相关软件	47
4. siRNA相关软件	47
5. DNA Star介绍	48

分子克隆实验流程图



1. 目的基因获取
2. 质粒制备 (或购买商业化载体)
3. 酶切质粒及目的基因
4. 目的基因与质粒载体的连接
5. 连接产物转化感受态细胞
6. 重组质粒的筛选
7. 酶切鉴定并测序

1. 实验流程

1.1 目的基因获取

1) 合成引物

详见引物专题介绍

2) PCR

PCR反应的基本成分包括：模板DNA (待扩增DNA)、引物、4种脱氧核苷酸 (dNTPs)、DNA聚合酶和适宜的缓冲液。

PCR由变性--退火--延伸三个基本反应步骤构成：

模板DNA的高温变性：模板DNA经加热至94 左右一定时间后，使模板DNA双链或经PCR扩增形成的双链DNA解离，使之成为单链，以便它与引物结合，为下轮反应作准备；

模板DNA与引物的低温退火 (复性)：模板DNA经加热变性成单链后，温度降至55 左右，引物与模板DNA单链的互补序列配对结合；

引物的适温延伸：在 *Taq* 酶 (在72 左右最佳的活性) 的作用下，以dNTP为原料，从引物的5'端 3'端延伸，合成与模板互补的DNA链。

每一循环经过变性、退火和延伸，DNA含量即增加一倍。

3) 琼脂糖凝胶电泳检测

取5 μ l样品+5 μ l DNA Loading buffer混匀上样，150 V恒压电泳20~30 min，保存电泳图片。(琼脂糖凝胶的配制：1 \times TAE缓冲液+琼脂糖，加热至琼脂糖全部溶解然后冷却至60 以下加入EB混匀倒板。其中琼脂糖含量为1 g/100 ml，EB含量为0.1 μ l/ml)

注：琼脂糖凝胶电泳检测如果有杂带则需切胶回收目的片段。

4) PCR产物纯化

根据PCR产物回收试剂盒的流程回收酶切产物，最后用45 μ l ddH₂O洗脱，-20 保存。

1.2 质粒制备

1) 质粒DNA的制备：用柱式质粒DNA小量抽提试剂盒抽提所要的载体质粒。

2) 或购买商业化载体

1.3 酶切质粒及目的基因

1) PCR产物酶切及纯化

酶切反应；

酶切产物纯化：根据PCR产物回收试剂盒上的流程回收PCR产物，最后用25~30 μ l ddH₂O洗脱，-20 保存或进行下一步实验；

琼脂糖凝胶电泳检测，以确保回收到目的片段。

2) 载体酶切及纯化

酶切反应；

琼脂糖凝胶电泳检测 (取200 ng左右没有酶切的质粒做对照)；

酶切产物纯化：根据PCR产物回收试剂盒上的流程回收酶切产物，最后用20~30 μ l ddH₂O洗脱，-20 保存或进行下一步实验。

1.4 目的基因与质粒载体的连接

外源DNA片段和质粒载体的连接反应策略有如下几种：

1) 带有非互补突出端的片段用两种不同的限制性内切酶进行消化可以产生带有非互补的粘性末端，这也是最容易克隆的DNA片段，一般情况下，常用质粒载体均带有多个不同限制酶的识别序列组成的多克隆位点，因而几乎总能找到与外源DNA片段末端匹配的限制酶切位点的载体，从而将外源片段定向地克隆到载体上。也可在PCR扩增时，在DNA片段两端人为加上不同酶切位点以便与载体相连。

2) 带有相同的粘性末端用相同的酶或同尾酶处理可得到这样的末端。由于质粒载体也必须用同一种酶消化，亦得到同样的两个相同粘性末端，因此在连接反应中外源片段和质粒载体DNA均可能发生自身环化或几个分子串连形成寡聚物，而且正反两种连接方向都可能。所以，必须仔细调整连接反应中两种DNA的浓度，以便使正确的连接产物的数量达到最高水平。还可将载体DNA的5'磷酸基团用碱性磷酸酯酶去掉，最大限度地抑制质粒DNA的自身环化。带5'端磷酸的外源DNA片段可以有效地与去磷酸化的载体相连，产生一个带有两个缺口的开环分子，在转入*E. coli*受体菌后的扩增过程中缺口可自动修复。

3) 带有平末端是由产生平末端的限制酶或核酸外切酶消化产生，或由DNA聚合酶补平所致。由于平端的连接效率比粘性末端要低得多，故在其连接反应中，T4 DNA连接酶的浓度和外源DNA及载体DNA浓度均要高得多。通常还需加入低浓度的聚乙二醇 (PEG 8000) 以促进DNA分子凝聚成聚集体的物质以提高转化效率。

特殊情况下，外源DNA分子的末端与所用的载体末端无法相互匹配，则可以在线状质粒载体末端或外源DNA片段末端接上合适的接头 (linker) 或衔接头 (adapter) 使其匹配，也可以有控制的使用*E. coli* DNA聚合酶 的klenow大片段部分填平3'凹端，使不相匹配的末端转变为互补末端或转为平末端后再进行连接。

注意事项：

- 1) DNA连接酶用量与DNA片的性质有关，连接平齐末端，必须加大酶量，一般使用连接粘性末端酶量的10~100倍。
- 2) 在连接带有粘性末端的DNA片段时，DNA浓度一般为2~10 μ g/ml，在连接平齐末端时，需加入DNA浓度至100~200 μ g/ml。
- 3) 连接反应后，反应液在0 储存数天，-80 储存2个月，但是在-20 冰冻保存将会降低转化效率。
- 4) 粘性末端形成的氢键在低温下更加稳定，所以尽管T4 DNA连接酶的最适反应温度为37 ，在连接粘性末端时，反应温度以10~16 为好，平齐末端则以15~20 为好。

在连接反应中，如不对载体分子进行去5'磷酸基处理，使用过量的外源DNA片段 (2~5倍)，这将有助于减少载体的自身环化，增加外源DNA和载体连接的机会。

1.5 感受态细胞的制备及转化

1) 大肠杆菌感受态细胞的制备

a) 菌株活化

用接种环直接取冻存的大肠杆菌DH5 ，在LB培养基平板表面划线，于37 培养16小时；

挑取一个单菌落，转到3~5 ml LB培养基中，于37 培养3~5小时；

将培养液全部转到100 ml LB培养基中培养2~3小时，到OD₆₀₀ = 0.3~0.4.

b) 感受态细胞制备步骤 (注意保持低温)

将培养液转入1.5 ml离心管中，在冰上放置15~30 min (满管)；

4 4000 rpm离心2 min，弃上清；

加入0.8 ml预冷的0.1 mol/L CaCl₂，重新悬浮沉淀；

4 4000 rpm离心2 min，弃上清；

加入0.2 ml预冷的0.1 mol/L CaCl₂ (含15%甘油)，重新悬浮沉淀，得到感受态细胞；

上述感受态细胞可以立即用于转化；也可在-80 超低温冰箱中长期保存备用。

2) 连接产物转化感受态细胞

质粒的转化是指将质粒或以它为载体构建的重组子导入细菌的过程。将连接产物转化到感受态细胞中，实现重组克隆的增殖，便于后续分子操作。可以采用多种方法筛选和鉴定目的克隆。

转化原理：感受态细菌与质粒冰浴后在较高温度下短时间水浴 (热激)，之后再冰浴，由于细菌细胞经受温度骤变，磷脂双分子层状态发生改变，对外源DNA的通透性增加，质粒可以高效地进入细菌细胞。

影响转化率的因素

- ▶ 细胞生长状态和密度
- ▶ 转化的质粒 DNA 的质量和浓度
- ▶ 试剂的质量
- ▶ 防止杂菌和其它外源 DNA 的污染

实验原理：

(1) 热激法：大肠杆菌在0 CaCl₂低渗溶液中，菌细胞膨胀成球形，转化混合物中的DNA形成抗DNase的羟基 - 钙磷酸复合物粘附于细胞表面，经42 短时间热冲击处理，促进细胞吸收DNA复合物，在丰富培养基上生长数小时后，球状细胞复原并分裂增殖。在被转化的细胞中，重组子基因得到表达，在选择性培养基平板上可挑选所需的转化子。

(2) 电转化法：外加于细胞膜上的电场造成细胞膜的不稳定，形成电穿孔，不仅有利于离子和水进入细菌细胞，也有利于DNA等大分子进入。同时DNA在电场中形成的极性对于它运输进细胞也是非常重要的。

(1) 热激法转化实验步骤

制备选择性培养基平板：在融化的250 ml LA培养基中加入250 μ l Amp (100 mg/ml)，250 μ l X-gal (20 mg/ml)，25 μ l IPTG (200 mg/ml)，混匀后倒入灭菌培养皿中；

取出3管制备好的感受态细胞，放在冰上融化；

每100 μ l感受态细胞加入约20 ng质粒DNA，3管分别加连接产物、标准超螺旋质粒DNA (阳性对照) 及不加入任何DNA (阴性对照)，用移液器轻轻吸打均匀，在冰上放置30分钟；

热击：将离心管放置42 水浴，热击90秒，注意：勿摇动离心管；

冰镇：快速将离心管转移至冰浴，放置1~2 min；

复苏：每管加400 μ l SOC培养基，在37 摇床温和摇动温育45分钟，使细菌复苏；

布皿：取适当体积均匀涂布于含有IPTG、X-gal、抗生素 (Amp) 的LA平板；

培养：倒置培养皿，于37 培养12~16小时即可观察到蓝白相间的菌落 (其中白色菌落为含有外源插入片段的转化子，蓝色菌落是载体自连的转化子)

(2) 质粒电转化大肠杆菌感受态细胞操作步骤

制备选择性培养基平板：在融化的250 ml LA培养基中加入250 μ l Amp (100 mg/ml)，250 μ l X-gal (20 mg/ml)，25 μ l IPTG (200 mg/ml)，混匀后倒入灭菌培养皿中；

取出制备好的感受态细胞，放在冰上融化；

每管感受态细胞加入1 μl连接产物，用移液器轻轻吸打均匀，置冰上；
电转化仪选择1800 V作为输出电压；
将要转化的混合物加入预冷的1 mm的电转化杯中，立即按下按钮电击；
立即加入1 ml SOC 培养基到转化杯中重悬细胞；
将细胞转入合适的培养管中37 °C 培养1小时；
吸取合适体积的菌液涂布已倒好的选择培养基平板；
37 °C 培养过夜，观察结果。

1.6 重组质粒的筛选

转化子筛选原理：因质粒携带有筛选标记(如氨苄青霉素抗性基因, Amp^r)，因而使接受了该质粒的受体菌具有抗性。如果将转化菌液涂布于抗生素的平板上培养，只有转化体才能存活。

重组子筛选原理：所用载体克隆位点位于LacZ基因(编码 β-半乳糖苷酶，受IPTG诱导表达，能分解X-gal成蓝色) 编码区内，外源基因插入后(重组子) 造成该基因失活，因而菌落呈现白色。

每组连接反应转化原液取100 μl用无菌玻棒均匀涂布于筛选培养基上，37 °C 下培养半小时以上，直至液体被完全吸收；

倒置平板于37 °C 继续培养12~16小时，待出现明显而又未相互重叠的单菌落时拿出平板；
放于4 °C 数小时，使显色完全(此步麦康凯培养基不做)

注：

利用氨苄青霉素抗性筛选转化子时，用转化细胞铺平板的密度要低(90 mm平板上不得超过10⁶个菌落)，同时37 °C 培养不应超过20小时，具氨苄青霉素抗性的转化体可将 β-内酰胺酶分泌到培养基中，迅速灭活菌落周围的抗生素，从而导致对氨苄青霉素敏感的卫星菌落的出现。

麦康凯选择性琼脂组成的平板，在含有适当抗生素时，携有载体DNA的转化子为淡红色菌落，而携有带插入片段的重组质粒转化子为白色菌落。该产品筛选效果同蓝白斑筛选，且价格低廉。但需及时挑取白色菌落，当培养时间延长，白色菌落会逐渐变成微红色，影响挑选。

X-gal是5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-半乳糖(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside)以 β-半乳糖苷酶(β-galactosidase)水解后生成的吲哚衍生物显蓝色。IPTG是异丙基硫代半乳糖苷(Isopropylthiogalactoside)，为非生理性的诱导物，它可以诱导lacZ的表达。

鉴定转化子中是否含有外源DNA片段常用的方法有：

- 互补
- 杂交筛选
- 插入失活(一些老质粒如pBR322等)
- 小量提取质粒酶切检测、PCR检测

1.7 酶切鉴定重组质粒

- 挑取阳性克隆，37 °C 下振荡培养12小时；
- 送至测序公司测序(载体两侧引物和目的片段上游反向引物)；
- 抽提阳性克隆质粒；
- 酶切鉴定阳性克隆是否为假阳性(选做)。

碱裂解法小量制备质粒DNA

挑取转化筛选的带有目的质粒的大肠杆菌接种到液体培养基中，37 °C 震荡培养12~16小时；
将1.5 ml菌液加入EP离心管中，12,000 g离心30 Sec，弃上清液，在吸水纸上扣干；离心时间不能太长，以免影

响下一步的菌体悬浮；

加入100 μl预冷的溶液I，于涡旋振荡器上振荡悬浮细菌细胞，尽量使细胞分散；
溶液I中的葡萄糖的作用是增大溶液的粘度，减少提取过程中的机械剪切力，防止染色体DNA的断裂；EDTA的作用是与二价离子(Ca²⁺)结合，降低DNase对DNA的降解。

加入200 μl新配制的溶液II，盖紧管口，快速颠倒离心管，以混匀内容物，冰上放置3~5 min；
溶液II中的NaOH与SDS可裂解细胞，使DNA变性以及SDS使蛋白变性并形成交联的网状结构。

加入150 μl溶液III，加盖后颠倒6~7次混匀，冰上放置2~3 min；
溶液III为低pH的醋酸钾缓冲液，中和NaOH，以便使部分变性的闭环质粒复性，而细菌染色体DNA不能正确复性。

12,000 g离心6 min，将上清移入另一干净的EP管中；

加2倍上清体积(约1 ml)的无水乙醇，振荡混匀，室温放置2 min；

12,000 g离心10 min，弃上清，再用70%的乙醇洗涤一次，12,000 g离心1 min，离心管倒置于吸水纸上扣干，然后在中空浓缩系统上干燥质粒；

加入40 μl含20 μg/ml RNase A的灭菌蒸馏水或TE缓冲液溶解提取物，室温放置直到质粒完全溶解(约8 min)，存于-20 °C 或直接用于酶切。

提取质粒的酶切鉴定与琼脂糖凝胶电泳

在0.5 ml EP管中依次加入下列溶液：

提取质粒DNA	3.0 μl
10 × buffer H	1.0 μl
EcoR I	2.0 U
dd H ₂ O	5.8 μl
	10 μl

1 U：1单位酶通常定义为，在建议缓冲液及温度下，在20 μl反应液中反应1 h，使1 μg DNA完全消化所需的酶量
轻轻混匀，4,000 g离心10秒，置于37 °C 水浴中酶解1.5 h；

酶解完成后，加入1.2 μl 10 × 上样缓冲液(或2 μl 6 × 上样缓冲液)，混匀；

称取1 g琼脂糖，置于三角瓶中，加入100 ml 0.5 × TBE或1 × TAE缓冲液，瓶口倒扣一个小烧杯，将该三角瓶置于微波炉加热直至琼脂糖溶解；

将梳子放置在制胶槽上，在冷却至60 °C 左右的琼脂糖凝胶液加入一小滴EB，小心混匀，倒到制胶槽上，直到在整个有机玻璃板表面形成均匀的胶层，不要产生气泡(厚度约为3~4 mm)；

室温下静置30 min左右，待凝固完全后，轻轻拔出梳子；

制好胶后将凝胶连同内槽放在含有0.5 × TBE或1 × TAE缓冲液的电泳槽中使用(注意:电泳槽中的缓冲液应与配胶用的缓冲液成分、浓度一致)；

用微量加样器将样品分别加入胶板的样品孔内加完样后的凝胶板即可通电进行电泳(80~100 V的电压下电泳，一般情况下，电压/电极间距离应小于5 V/cm)，当溴酚兰移动到距离胶板下沿约1 cm处停止电泳；

在紫外灯(310 nm波长)下观察染色后的凝胶。DNA存在处显示出红色的荧光条带(在紫外灯下观察时，应戴上防护眼镜或有机玻璃防护面罩，避免眼睛遭受强紫外光损伤，拍照电泳图谱时，可采用凝胶成像系统)。

2. PCR

2.1 影响PCR反应的条件

- 1) 引物：引物是PCR特异性反应的关键，PCR产物的特异性取决于引物与模板DNA互补的程度。
- 2) 酶及其浓度：目前有两种 *Taq* DNA聚合酶供应，一种是从栖热水生杆菌中提纯的天然酶，另一种为大肠菌合成的基因工程酶。催化一典型的PCR反应约需酶量2.5 U (指总反应体积为100 μ l时)，浓度过高可引起非特异性扩增，浓度过低则合成产物量减少。
- 3) dNTP的质量与浓度：dNTP的质量与浓度和PCR扩增效率有密切关系，dNTP粉呈颗粒状，如保存不当易变性失去生物学活性。dNTP溶液呈酸性，使用时应配成高浓度后，以1 M NaOH或1 M Tris-HCL的缓冲液将其pH调节至7.0~7.5，小量分装，-20 $^{\circ}$ C冰冻保存。多次冻融会使dNTP降解。在PCR反应中，dNTP应为50~200 μ mol/L，尤其是注意4种dNTP的浓度要相等(等摩尔配制)，如其中任何一种浓度不同于其它几种时(偏高或偏低)，就会引起错配。浓度过低又会降低PCR产物的产量。dNTP能与 Mg^{2+} 结合，使游离的 Mg^{2+} 浓度降低。
- 4) 模板(靶基因)核酸：模板核酸的量与纯化程度，是PCR成败与否的关键环节之一，传统的DNA纯化方法通常采用SDS和蛋白酶K来消化处理标本。SDS的主要功能是：溶解细胞膜上的脂类与蛋白质，因而溶解膜蛋白而破坏细胞膜，并解离细胞中的核蛋白，SDS还能与蛋白质结合而沉淀；蛋白酶K能水解消化蛋白质，特别是与DNA结合的组蛋白，再用有机溶剂酚与氯仿抽提掉蛋白质和其它细胞组份，用乙醇或异丙醇沉淀核酸。提取的核酸即可作为模板用于PCR反应。一般临床检测标本，可采用快速简便的方法溶解细胞，裂解病原体，消化除去染色体的蛋白质使靶基因游离，直接用于PCR扩增。RNA模板提取一般采用异硫氰酸胍或蛋白酶K法，要防止RNase降解RNA。
- 5) Mg^{2+} 浓度： Mg^{2+} 对PCR扩增的特异性和产量有显著的影响，在一般的PCR反应中，各种dNTP浓度为200 μ mol/L时， Mg^{2+} 浓度为1.5~2.0 mmol/L为宜。 Mg^{2+} 浓度过高，反应特异性降低，出现非特异扩增，浓度过低会降低*Taq* DNA聚合酶的活性，使反应产物减少。
- 6) 温度与时间的设置：基于PCR原理三步骤而设置变性-退火-延伸三个温度点。在标准反应中采用三温度点法，双链DNA在90~95 $^{\circ}$ C变性，再迅速冷却至40~60 $^{\circ}$ C，引物退火并结合到靶序列上，然后快速升温至70~75 $^{\circ}$ C，在*Taq* DNA聚合酶的作用下，使引物链沿模板延伸。对于较短靶基因(长度为100~300 bp时)可采用二温度点法，除变性温度外、退火与延伸温度可合二为一，一般采用94 $^{\circ}$ C变性，65 $^{\circ}$ C左右退火与延伸(此温度*Taq* DNA酶仍有较高的催化活性)。

变性温度与时间：变性温度低，解链不完全是导致PCR失败的最主要原因。一般情况下，93~94 $^{\circ}$ C足以使模板DNA变性，若低于93 $^{\circ}$ C则需延长时间，但温度不能过高，因为高温环境对酶的活性有影响。此步若不能使靶基因模板或PCR产物完全变性，就会导致PCR失败。

退火(复性)温度与时间：退火温度是影响PCR特异性的较重要因素。变性后温度快速冷却至40~60 $^{\circ}$ C，可使引物和模板发生结合。由于模板DNA比引物复杂得多，引物和模板之间的碰撞结合机会远远高于模板互补链之间的碰撞。退火温度与时间，取决于引物的长度、碱基组成及其浓度，还有靶基序列的长度。对于20个核苷酸，G+C含量约50%的引物，55 $^{\circ}$ C为选择最适退火温度的起点较为理想。引物的复性温度可通过以下公式帮助选择合适的温度：
 T_m 值(解链温度)=4(G+C)+2(A+T)；复性温度= T_m 值-(5~10 $^{\circ}$ C)。
 在 T_m 值允许范围内，选择较高的复性温度可大大减少引物和模板间的非特异性结合，提高PCR反应的特异性。复性时间一般为30~60 sec，足以使引物与模板之间完全结合。

延伸温度与时间：*Taq* DNA聚合酶的生物学活性：
 70~80 $^{\circ}$ C 150 核苷酸/S/酶分子
 70 $^{\circ}$ C 60 核苷酸/S/酶分子
 55 $^{\circ}$ C 24 核苷酸/S/酶分子
 高于90 $^{\circ}$ C时，DNA合成几乎不能进行。

PCR反应的延伸温度一般选择在70~75 $^{\circ}$ C之间，常用温度为72 $^{\circ}$ C，过高的延伸温度不利于引物和模板的结合。PCR延伸反应的时间，可根据待扩增片段的长度而定，一般1 Kb以内的DNA片段，延伸时间1 min是足够的。3~4 kb的靶序列需3~4 min；扩增10 Kb需延伸至15 min。延伸时间过长会导致非特异性扩增带的出现。对低浓度模板的扩增，延伸时间要稍长些。

7) 循环次数：循环次数决定PCR扩增程度。PCR循环次数主要取决于模板DNA的浓度。一般的循环次数选在30~40次之间，循环次数越多，非特异性产物的量亦随之增多。

影响PCR特异性的因素

通过上述内容,可以看出有许多因素可以影响PCR的特异性,在此我们作一归纳,供参考:

退火步骤的严格性:提高退火温度可以减少不匹配的杂交,从而提高特异性;

减短退火时间及延伸时间可以减少错误引发及错误延伸;

引物二聚体是最常见的副产品,降低引物及酶的浓度也可以减少错误引发,尤其是引物的二聚化;

改变 $MgCl_2$ (有时KCl)浓度可以改进特异性,这可能是提高反应严格性或者对*taq*酶的直接作用;

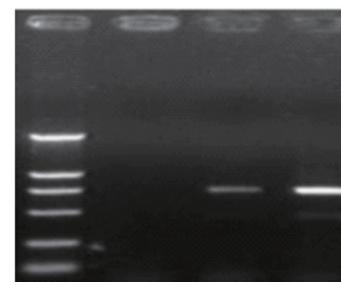
一般认为PCR产物应在48 h以内完成电泳检测,有些最好于当日电泳检测,大于48 h后带型就会出现不规则,甚至消失。

2.2 常见问题分析及对策

(一) 常规PCR

问题1: 无扩增产物

现象: 正对照有条带, 而样品则无



M 样品 样品 正对照

可能原因:

1. 模板: 含有抑制物, 含量低
2. Buffer对样品不合适
3. 引物设计不当或者发生降解
4. 反应条件: 退火温度太高, 延伸时间太短

对策:

1. 纯化模板或者使用试剂盒提取模板DNA或加大模板的用量
2. 更换Buffer或调整浓度
3. 重新设计引物(避免链间二聚体和链内二级结构)或者换一管新引物
4. 降低退火温度、延长延伸时间

问题2: 非特异性扩增

现象: 条带与预计的大小不一致或者非特异性扩增带



可能原因:

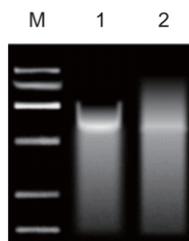
1. 引物特异性差
2. 模板或引物浓度过高
3. 酶量过多
4. Mg^{2+} 浓度偏高
5. 退火温度偏低
6. 循环次数过多

对策:

1. 重新设计引物或者使用巢式PCR
2. 适当降低模板或引物浓度
3. 适当减少酶量
4. 降低镁离子浓度
5. 适当提高退火温度或使用二阶段温度法
6. 减少循环次数

问题3：拖尾

现象：产物在凝胶上呈Smear状态



可能原因:

1. 模板不纯
2. Buffer不合适
3. 退火温度偏低
4. 酶量过多
5. dNTP、Mg²⁺浓度偏高
6. 循环次数过多

对策:

1. 纯化模板
2. 更换Buffer
3. 适当提高退火温度
4. 适量用酶
5. 适当降低dNTP和Mg²⁺的浓度
6. 减少循环次数

问题4：假阳性

现象：空白对照出现目的扩增产物

可能原因:

靶序列或扩增产物的交叉污染

对策:

操作时应小心轻柔，防止将靶序列吸入加样枪内或溅出离心管外；除酶及不能耐高的物质外，所有试剂或器材均应高压消毒。所用离心管及加样枪头等均应一次性使用；各种试剂最好先进行分装，然后低温。

(二) RT-PCR反应

1) 在琼脂糖凝胶分析中看到少量或没有RT-PCR产物

可能原因：

(1) RNA被降解

对策：

在用来验证完整性之前先在变性胶上分析RNA，使用良好的无污染技术分离RNA；在将组织从动物体取出后立刻处理在100%甲酰胺中储存RNA；如果使用胎盘RNase抑制剂，不要加热超过45 或pH超过8.0，否则抑制剂或释放所有结合的RNase。而且，在0.8 mM DTT时加入RNase抑制剂，一定要存在DTT。

(2) RNA中包含逆转录抑制剂

对策：通过乙醇沉淀RNA除去抑制剂。用70% (v/v) 乙醇对RNA沉淀进行清洗。可以加入糖元 (0.25~0.4 μg/μl)以帮助少量样品RNA的恢复。(逆转录抑制剂包括：SDS，EDTA，甘油，焦磷酸钠，spermidine，甲酰胺和胍盐。)将对照RNA同样品混合，同对照RNA反应比较产量以检验抑制剂。

(3) 多糖同RNA共沉淀

对策：使用氯化锂沉淀RNA以除去多糖。

(4) 用于cDNA第一链合成的引物没有很好退火

对策：

确定退火温度以适合引物。对于随机六聚体，建议在反应温度保温之前先在25 保温10分钟；对于基因特异性引物 (GSP)，可以试一下其它GSP，或换用oligo (dT) 或随机六聚体；确定GSP是反义序列。

(5) 起始RNA量不够

对策：增加RNA量。对于 < 50 ng的RNA样品，可以在第一链cDNA合成中使用0.1 μg到0.5 μg乙酰BSA。

(6) RNA模板二级结构太多

对策：

将RNA和引物在不含盐及缓冲液条件下变性/退火；提高逆转录反应温度，对SuperScript 可以到50 ，对ThermoScript可以到65 。注意：不要在 > 60 时使用oligo (dT) 引物，选择一个在反应温度可以退火的GSP。对于 > 1kb的RT-PCR产物，保持反应温度 65 。不要在高于37 时使用M-MLV；

如果不需要全长cDNA，在第一链反应中使用随机引物。

(7) 引物或模板对残余的RNA模板敏感

对策：在PCR前用RNaseH处理。

(8) 靶序列在分析的组织中不表达

对策：尝试其他靶序列或组织。

(9) PCR没有起作用

对策：对两步法RT-PCR，不要在PCR步骤中使用超过1/5的逆转录反应产物。

2) 污染造成假阳性

可能原因：

(1) 样品间的交叉污染

对策：

收集样品的容器最好使用一次性的，如重复使用，应在使用前应于180 的高温下干烤6小时或更长时间；

样品存放时要密封严实，以防外溢造成相互间的交叉污染；

样品在提取过程中离心管及吸样枪头最好使用一次性的，以免不同实验样品间相互污染；

由于吸样枪污染会导致样品间的污染，也是一个值得注意的问题，由于操作不慎将样品或提取物吸入枪内或粘上枪头是一个严重的污染源，因而加样或吸取时要十分小心，吸时要慢，吸取尽量一次性完成，忌多次抽吸，以免交叉污染或产生气溶胶污染；

同时要注意操作时不要剧烈地摇动反应管，开盖时也容易造成气溶胶污染。每次实验完毕都要及时清理实验台面，用0.5%次氯酸钠消毒后再打开紫外灯照射半小时。

(2) RT-PCR本身使用的试剂污染在试剂配制过程中，由于加样枪、容器及其它溶液被污染

对策：所有试剂都应尽量少量分装，以减少重复加样次数，避免污染机会，另外RT-PCR试剂应尽可能密封好分类存放。每次操作完毕后同样要进行台面消毒和紫外线照射消毒。

(3) 扩增产物的污染，极微量的扩增产物污染就可造成假阳性

对策：每次实验完后，扩增产物都要及时密封后处理。设阳性对照。

(4) 操作人员污染：只要存在少量的RNA酶就会引起RNA的降解，从而影响结果的准确性，RNA酶可存在操作人员手汗、唾液中，也可灰尘中，一旦器械、玻璃制品、塑料制品受到污染，容易造成实验失败

对策：操作人员应戴一次性口罩、帽子、手套，实验过程中手套要勤换。设置PCR操作专用实验室，所用实验用具应为专用，并合理分隔实验室，将样品的提取、配制RT-PCR反应液、PCR循环扩增等步骤分室进行，实验前应将实验室及实验人员工作服用紫外线或臭氧消毒以破坏残留的DNA或RNA。

3) 在无反转录酶的情况下，对照RNA获得扩增结果

可能原因：

(1) 对照RNA中含有痕量DNA

对策：第一链cDNA稀释1:10; 1:100; 1:1000倍以消除DNA污染所造成的影响。

(2) 有可能是引物二聚体的条带

4) 扩增产物滞留在加样孔中

可能原因：由于模板量过高而导致PCR结果产生了高分子量的DNA胶状物

对策：将第一链结果至少稀释100倍再进行二次扩增。另外，在二次PCR时使用的退火温度如果比引物的T_m值低5℃，可以将退火温度适当增高或进行热启动以提高特异。

(三) 定量PCR

1) 无CT值 (信号) 出现

可能原因：

(1) 反应循环数不够

对策：35个循环以上，可根据实验情况增加循环 (如至45 cycles)，但高于45个循环会增加过多的背景信号。

(2) 测荧光信号的步骤有误

对策：一般SG法采用72℃延伸时采集，Taqman法则一般在退火结束时或延伸结束采集信号。

(3) 引物或探针降解 对策：可通过PAGE电泳检测其完整性。

(4) 引物或探针的设计，如探针高于引物的温度不够，造成探针未杂交上而产物已延伸的情况

对策：重新设计引物或探针。

(5) 模板量不足

对策：对未知浓度的样品应从系列稀释样本的最高浓度做起。

(6) 模板降解 对策：避免样品制备中杂质的引入及反复冻融的情况。

2) CT值出现过晚

可能原因：

(1) 扩增效率低，反应条件不够优化

对策：设计更好的引物或探针；改用三步法进行反应；适当降低退火温度；增加镁离子浓度等。

(2) PCR各种反应成分的降解或加样量的不足

(3) PCR产物太长 对策：一般采用80~150 bp的产物长度。

3) 标准曲线的线性关系不佳

可能原因：

(1) 加样存在误差，使得标准品不呈梯度 对策：精确操作。

(2) 标准品出现降解

对策：避免标准品反复冻融，或重新制备并稀释标准品。

(3) 引物或探针不佳

对策：重新设计更好的引物和探针。

(4) 模板中存在抑制物，或模板浓度过高

对策：降低模板浓度或重新制备。

4) 阴性对照也出现明显的起飞

可能原因：

(1) 混合物或水被污染

对策：避免污染。

(2) 引物二聚体的出现

对策：用SG法在35 cycles以后阴性出现起飞属正常情况，可配合熔解曲线进行分析。

(3) 反应过程中探针的降解

对策：用PAGE电泳对探针进行检测。

(4) 如果使用了ROX校正，则可能是ROX的降解所造成。

5) 熔解曲线不止一个主峰

可能原因：

(1) 引物设计不够优化

对策：应避免引物二聚体和发夹结构的出现。

(2) 引物浓度不佳

对策：适当降低引物的浓度，并注意上下游引物的浓度配比。

(3) 镁离子浓度过高

对策：适当降低镁离子浓度，或选择更合适的mix试剂盒。

(4) 模板有基因组的污染

对策：RNA提取过程中避免DNA的引入，或通过引物设计避免非特异扩增。

6) 扩增效率低

可能原因：

(1) 反应试剂中部分成分特别是荧光染料降解

(2) 反应条件不够优化 对策：可适当降低退火温度或改为三步扩增法。

(3) 反应体系中有PCR反应抑制物

对策：一般是加入模板时所引入，应先把模板适度稀释，再加入反应体系中，减少抑制物的影响。

7) 实验重复性不好

可能原因：

(1) 加样不准确

对策：精确操作。

(2) 仪器在样品上温度条件有差异，即温度均一性不好

(3) 模板浓度低，样品初始浓度越低，重复性越差

对策：应减少样品的稀释倍数。

8) 变性温度是否合适

大部分的双链DNA在95℃就开始解链了，在有些情况下在90~94℃都不能很好地变性DNA。由于部分变性，参加反应的探针和引物相应的减少了，因此反应效率会下降。

9) 变性时间是否合适

15到20秒对于变性扩增子是足够了，然而，长一点的产物，可能会需要30秒，60秒的变性时间通常是不需要的。

10) 退火温度和时间是否合适

检查引物和探针的T_m值，SYBR GreenI的退火时间大约20到35秒，双标记探针通常是两步法，退火和延伸合并为一步，时间大约是45到60秒，温度通常在60℃，对于FRET探针退火步骤大约20到30秒。

11) 在哪一步骤采集信号

SYBR GreenI应当在72℃，此时绝大部分的DNA是双链状态，如上所述，双标记探针通常是两步检测，因此信号采集应该在退火延伸的整合步骤。对于FRET检测，数据应该在退火步骤检测。如果对于信号采集点不确定，可以多点采集作对比。如果监控屏幕检测不到信号，检查程序设定是否存在至少一个的信号采集点。

12) 是否选定了合适的增益值

一些情况下会看到曲线超过了窗口范围，在荧光强度100的地方成一直线。尽管大部分的数据可以用，但是减少增益，一些原始数据就不会超出范围。有时，在第一个循环信号就跳出了窗口范围，这是由于增益选得太高，看起来像没有检测到数据。如果熔解曲线分析时，开始荧光就达到了100，则应当用低的增益重新运行，而不需要重新运行扩增反应，SYBR GreenI和FRET的样品可以在一定程度上反复使用。

3. 限制性内切酶酶切反应

3.1 常用酶酶切位点

<p>AgeI:</p> <p>5'...ACCGGT...3'</p> <p>3'...TGGCCAA...5'</p>	<p>HindIII:</p> <p>5'...AAGCTT...3'</p> <p>3'...TTCGAA...5'</p>	<p>NheI :</p> <p>5'...GCTAGC...3'</p> <p>3'...CGATCA...5'</p>	<p>Sall:</p> <p>5'...GTTCGAC...3'</p> <p>3'...CAGCTAG...5'</p>
<p>BamHI :</p> <p>5'...GGATCC...3'</p> <p>3'...CCTAGAG...5'</p>	<p>HpaI :</p> <p>5'...GTTAAC...3'</p> <p>3'...CAATTG...5'</p>	<p>NotI:</p> <p>5'...GCGGCCGC...3'</p> <p>3'...CGCCGGC...5'</p>	<p>SmaI:</p> <p>5'...CCCGGG...3'</p> <p>3'...GGCCC...5'</p>
<p>BglII:</p> <p>5'...AGATCT...3'</p> <p>3'...TCTAGA...5'</p>	<p>KpnI:</p> <p>5'...GGTACC...3'</p> <p>3'...CATGG...5'</p>	<p>PstI:</p> <p>5'...CTGCAG...3'</p> <p>3'...ACGTC...5'</p>	<p>XbaI:</p> <p>5'...TCTAGA...3'</p> <p>3'...AGATCT...5'</p>
<p>EcoRI:</p> <p>5'...GAATTC...3'</p> <p>3'...CTTAAG...5'</p>	<p>MluI:</p> <p>5'...ACGCGT...3'</p> <p>3'...TGCGCA...5'</p>	<p>SacI:</p> <p>5'...GAGCTC...3'</p> <p>3'...CTCGAG...5'</p>	<p>XhoI :</p> <p>5'...CTCGAG...3'</p> <p>3'...GAGCTAC...5'</p>
<p>EcoRV:</p> <p>5'...GATATC...3'</p> <p>3'...CTAATAG...5'</p>	<p>NcoI:</p> <p>5'...CCATGG...3'</p> <p>3'...GGTACA...5'</p>	<p>SacII:</p> <p>5'...CCGCGG...3'</p> <p>3'...GGCGC...5'</p>	

3.2 酶切注意事项

在进行限制性酶切反应过程中，影响酶切反应效果的因素较多，要设计酶切反应，一般均应考虑诸如酶切系统、温度条件、反应体积、底物性质及星型反应等因素。根据不同的条件，酶切反应的设计一般应注意以下问题：

- 1) 大多数限制酶贮存在50%甘油溶液中，以避免在-20℃条件下结冰。当最终反应液中甘油浓度大于12%时，某些限制酶的识别特异性降低，从而产生星活性，更高浓度的甘油会抑制酶活性。因此加入反应的酶体积不超过反应总体积的1/10，避免限制酶活性受到甘油的影响。
- 2) 浓缩的限制酶可在使用前用1×限制酶缓冲液稀释，但切勿用水稀释以免酶失活，用水稀释的酶不能长期保存。
- 3) 反应体系中Mg²⁺是限制酶仅有的共同因子，当用其它二价阳离子代替Mg²⁺或加入能螯合Mg²⁺的EGTA或EDTA时，酶活性会被抑制，或改变酶的特异性，导致星型反应。
- 4) 多种因素可引发星型反应：
 - 非最适的pH；
 - Co²⁺、Mn²⁺、Zn²⁺取代Mg²⁺；
 - 酶浓度大于25 U/μg；
 - 盐浓度降低；
 - 高浓度甘油的存在 (>12%)；
 - 有机溶剂的存在。
- 5) 反应混合物中DNA底物的浓度不宜太大，小体积中过高浓度的DNA会形成粘性DNA溶液抑制酶的扩散，并降低酶活性。

建议酶切反应的DNA浓度为0.1~0.4 μg/μl。

6) 酶切反应所加入的酶量应适中，根据底物的种类、量的多少和体积的大小而定，对不同的限制酶，各厂家均有一最大的消化量指标可参考。

7) 当要用两种或两种以上限制酶切割DNA时，如果这些酶可以在同种缓冲液中作用良好，则两种酶可同时切割，如果这些酶所要求的缓冲液有所不同，则可采用以下两种替代方法：

先用在低离子强度的缓冲液中活性高的酶切割DNA，然后加入适量NaCl及第二种酶，继续反应；
使用能够使多数内切酶均表现较高活性的单种缓冲液。

8) 用同一种酶切割不同的DNA时，所需酶量不同，可根据DNA底物上酶切位点的多少与DNA存在位点的数目比较后，决定用酶量。对于超螺旋DNA、基因组DNA、琼脂糖包埋的DNA，使用的酶单位活性应适当加大。

9) 反应混合物中加入浓度为0.1 mg/ml的BSA，可维持酶的稳定性。

10) 酶切底物DNA应具备一定的纯度，其溶液中不能含有微量酚、氯仿、乙醚，大于10 mM的EDTA，去污剂SDS以及过量的盐离子浓度，否则会不同程度地影响限制酶的活性。

11) DNA碱基上的甲基化修饰也是影响酶切的一个重要因素，所以转化实验所选择的受体菌株应考虑到使用的菌株中的酶修饰系统。

12) 要保证酶作用时的最佳反应条件 (pH, 温度) 和底物用量，酶反应才能有效地进行。

13) 反应取酶时应使用无菌吸头，以免污染酶液，同时应尽量缩短酶在温室的放置时间。

14) 高于37℃或需长时间保温时，可加入矿物油覆盖在反应液上以减少水分蒸发。

15) 反应混合物混匀时，应避免强烈振荡以保证不使内切酶变性及DNA大分子的完整。

16) 反应前的低速离心是必要的，这可使因混匀吸附于管壁上的液滴全部沉至管底。

17) 用已硅化的离心管进行酶切反应，可获得更佳的酶切效果，否则DNA可能粘附于管壁而影响酶切效果。

18) 终止酶反应可根据需要采用不同的方法：

酶切后不需进行下一步反应，可加入含EDTA的终止液终止反应；
若需进一步反应 (如连接，切割等)，可将反应管置65℃保温20~30分钟，以灭活酶终止反应；
可用酚/氯仿抽提，乙醇沉淀获得较纯DNA进行下一步酶学操作。

19) 不同厂家的试剂不可混用，需要时请查明相关条件及数据。

3.3 常见问题及对策

1) DNA完全没有被内切酶切割

可能原因：

- (1) 内切酶失活
 - 对策：标准底物检测酶活性。
- (2) DNA不纯，含SDS、酚、EDTA等内切酶抑制因子
 - 对策：将DNA过柱纯化，乙醇沉淀DNA。
- (3) 条件不适 (试剂、温度)
 - 对策：检查反应系统是否最佳。
- (4) DNA酶切位点上的碱基被甲基化
 - 对策：换用对DNA甲基化不敏感的同裂酶，重新将质粒DNA转化至dcm⁻, dam⁻基因型的细菌菌株。

(5) DNA酶切位点上没有甲基化 (如Dpn I)

对策：换用不同切割非甲基化位点的同裂酶消化DNA (如San3A I代替Dpn I)，重新将质粒转至dcm⁺,dam⁺菌株中扩增。

(6) DNA位点上存在其它修饰

对策：将DNA底物与 DNA混匀进行切割验证。

(7) DNA不存在该酶识别顺序

对策：换用其它的酶切割DNA或过量酶消化进行验证。

2) DNA切割不完全

可能原因：

(1) 内切酶活性下降

对策：用5~10倍过量消化。

(2) 内切酶稀释不正确

对策：用酶贮藏液或反应缓冲液稀释酶。

(3) DNA不纯，反应条件不佳

对策：将DNA过柱纯化，乙醇沉淀DNA；检查反应系统是否最佳。

(4) 内切酶识别的DNA位点上的碱基被甲基化或存在其它修饰

对策：换用对DNA甲基化不敏感的同裂酶，重新将质粒DNA转化至dcm⁻,dam⁻基因型的细菌菌株；将DNA底物与DNA混匀进行切割验证。

(5) 部分DNA溶液粘在管壁上

对策：反应前离心数秒。

(6) 内切酶溶液粘度大，取样不准

对策：将内切酶稀释，增大取样体积。

(7) 酶切后DNA粘末端退火

对策：电泳前将样品置65℃保温5~10分钟，取出后置冰浴骤冷。

(8) 由于反应溶液、温度、强烈振荡使内切酶变性

对策：使用标准反应缓冲液及温度，避免强烈振荡。

(9) 过度稀释使酶活性降低

对策：适当稀释酶液，反应液稀释的酶不能贮藏。

(10) 反应条件不适

对策：使用最佳反应体系。

(11) 识别位点两侧插入了可影响酶切效率的核酸顺序

对策：加大酶量5~10倍。

3) DNA片段数目多于理论值

可能原因：

(1) 内切酶星状活性

对策：检查反应条件：甘油浓度大于12%，盐度过低，Mn²⁺的存在及酶：DNA值过大均可导致星状活性，降低酶的使用量。

(2) 其它内切酶污染

对策：用 DNA作底物检查酶切结果。

(3) 底物中含其它DNA杂质，

对策：电泳检查DNA，换用其它酶切，纯化DNA片段。

4) 酶切后没有观察到DNA片段的存在

可能原因：

(1) DNA定量错误 (如RNA含量较高)

对策：用RNA酶A (无DNA酶) 100 μg/ml消化DNA样，酚抽提后沉淀溶解，定量。

(2) 在酶切反应液中形成非特异性的沉淀

对策：在反应前透析DNA样品或用酒精沉淀两次。

5) 内切酶保存期内快速失活

可能原因：

(1) 保存温度不合适

对策：内切酶贮藏在含50%甘油的贮藏液中，应在-20℃低温保存。

(2) 以稀释形式保存

对策：稀释酶液不宜长期存放，应一次使用。

(3) 贮藏缓冲液不适当

对策：使用厂家推荐的贮藏缓冲液。

(4) 低蛋白浓度

对策：内切酶与500 μg/ml的BSA一起保存。

6) 电泳后DNA片段的带型弥散，不均一

可能原因：

(1) DNA上结合有蛋白质

对策：电泳前上样液65℃加热5 min，并加入0.1%的SDS，酚/氯仿抽提纯化。

(2) 内切酶中含有DNA外切酶

对策：减少酶用量或消化时间，换用新包装的酶。

7) 酶切后的DNA片段连接效率低

可能原因：

(1) 含磷酸盐的浓度高

对策：透析，乙醇沉淀去除磷酸盐。

(2) 内切酶失活不全或含有ATP酶

对策：延长灭活时间或用酚抽提，乙醇沉淀回收DNA。

(3) 平末端连接

对策：加大T4 DNA连接酶的用量。

(4) 外切酶污染

对策：减少酶用量，缩短保温时间，酚抽提回收DNA。

(5) 连接缓冲液不合适

对策：重新配制连接缓冲液。

4. 常用试剂、缓冲液配制方法

电泳缓冲液

50 × Tris-乙酸 (TAE) 缓冲液

成分及终浓度	配制1 L溶液各成分的用量
2 mol/L Tris碱	242 g
1 mol/L 乙酸	57.1 ml的冰乙酸 (17.4 mol/L)
100 mmol/L EDTA	200 ml的0.5 mol/L EDTA (pH 8.0)
水	补足至1 L

5 × Tris-硼酸 (TBE) 缓冲液

成分及终浓度	配制1 L溶液各成分的用量
445 mmol/L Tris碱	54 g
445 mmol/L 硼酸盐	27.5 g 硼酸
10 mmol/L EDTA	20 ml的0.5 mol/L EDTA (pH 8.0)
水	补足至1 L

染料

1. 1%溴酚蓝 (bromophenol blue)

加1 g水溶性钠型溴酚蓝于100 ml水中，搅拌或涡旋混合直到完全溶解。

2. 1%二甲苯青FF (xylene cyanole FF)

溶解1 g二甲苯青FF于足量水中，定容到100 ml。

3. 10 mg/ml的溴化乙锭 (ethidium bromide)

小心称取1 g溴化乙锭，转移到广口瓶中，加100 ml水，用磁力搅拌器搅拌直到完全溶解。用铝箔包裹装液管，于4 °C 贮存。

凝胶上样液

6 × 碱性凝胶上样液 (室温贮存)

成分及终浓度	配制10 ml溶液各成分的用量
0.3 N氢氧化钠	300 μl 10 N氢氧化钠
6 mmol/L EDTA	120 μl 0.5 mol/L EDTA (pH8.0)
18%聚蔗糖 (400型)	1.8 g
0.15%溴酚蓝	15 mg
0.25%二甲苯青FF	25 mg
水	补足至10 ml

6 × 聚蔗糖凝胶上样液 (室温贮存)

成分及终浓度	配制10 ml溶液各成分的用量
0.15%溴酚蓝	1.5 ml 1%溴酚蓝
0.15%二甲苯青FF	1.5 ml 1%二甲苯青FF
5 mmol/L EDTA	100 μl 0.5 mol/L EDTA (pH8.0)
15%聚蔗糖 (400型)	1.5 g
水	补足至10 ml

6 × 溴酚蓝/二甲苯青/聚蔗糖凝胶上样液 (室温贮存)

成分及终浓度	配制10 ml溶液各成分的用量
0.25%溴酚蓝	2.5 ml 1%溴酚蓝
0.25%二甲苯青FF	2.5 ml 1%二甲苯青FF
15%聚蔗糖 (400型)	1.5 g
水	补足至10 ml

6 × 甘油凝胶上样液 (4 °C 贮存)

成分及终浓度	配制10 ml溶液各成分的用量
0.15%溴酚蓝	1.5 ml 1%溴酚蓝
0.15%二甲苯青FF	1.5 ml 1%二甲苯青FF
5 mmol/L EDTA	100 μl 0.5 mol/L EDTA (pH8.0)
50%甘油	3 ml
水	3.9 ml

6 × 蔗糖凝胶上样液 (室温贮存)

成分及终浓度	配制10 ml溶液各成分的用量
0.15%溴酚蓝	1.5 ml 1%溴酚蓝
0.15%二甲苯青FF	1.5 ml 1%二甲苯青FF
5 mmol/L EDTA	100 μl 0.5 mol/L EDTA (pH8.0)
40%聚蔗糖	4 g
水	补足至10 ml

10 × 十二烷基硫酸钠/甘油凝胶上样液 (室温贮存)

成分及终浓度	配制10 ml溶液各成分的用量
0.2%溴酚蓝	20 mg
0.2%二甲苯青FF	20 mg
200 mmol/L EDTA	4 ml 0.5 mol/L EDTA (pH8.0)
0.1%SDS	100 μl 10%SDS
50%甘油	5 ml
水	补足至10 ml

说明：

TBE溶液长时间存放后会形成沉淀物，为避免这一问题，可在室温下用玻璃瓶保存5 × 溶液，出现沉淀后则予以废弃。以后都以1 × TBE作为使用液 (即1:5稀释浓贮液) 进行琼脂糖凝胶电泳。但0.5 × 的使用液已具备足够的缓冲容量。目前几乎所有的琼脂糖胶电泳都以1:10稀释的贮存液作为使用液。进行聚丙烯酰胺凝胶垂直槽的缓冲液槽较小，故通过缓冲液的电流量通常较大，需要使用1 × TBE以提供足够的缓冲容量。

碱性电泳缓冲液应现用现配。

Tris-甘氨酸缓冲液于SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳。

2 × SDS凝胶加样缓冲液：

100 mmol/L Tris-HCl (pH6.8)

200 mmol/L二硫苏糖醇 (DTT)

4% SDS (电泳级, m/v)

0.2% 溴酚蓝

20% 甘油 (v/v).

不含DTT的2 × SDS凝胶加样缓冲液可保存于室温，应在临用前取20 ml 1 mol/L DTT贮存液现加于上述缓冲液中。

1. 知识荟萃

1.1 基因合成vs.基因克隆

基因克隆	金斯瑞基因合成服务
<ul style="list-style-type: none"> ⊙ 繁琐冗长的实验过程 	<ul style="list-style-type: none"> ⊙ 简单快捷的一站式服务
<ol style="list-style-type: none"> 1. PCR扩增目的基因 2. 载体制备 3. 酶切载体及插入片段 4. 凝胶纯化和连接 5. 转化及质粒制备 6. 酶切验证 7. 测序 8. 测序结果分析 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 提供序列信息及亚克隆需求 2. 收到含有目的基因的质粒，直接进行后续实验
<ul style="list-style-type: none"> ⊙ 依赖模板 ⊙ 依赖酶切位点 ⊙ 仅能改变少量的碱基 ⊙ 过程中易出现各种问题 ⊙ 耗费大量时间及精力 	<ul style="list-style-type: none"> ⊙ 自由设计序列，无模板限制 ⊙ CloneEZ®无缝克隆，无需考虑酶切位点 ⊙ OptimumGene™密码子优化，大幅提高蛋白表达量 ⊙ 专业合成，保证序列100%准确 ⊙ 合成2 Kb以内的普通基因最短仅需5个工作日

基因合成应用

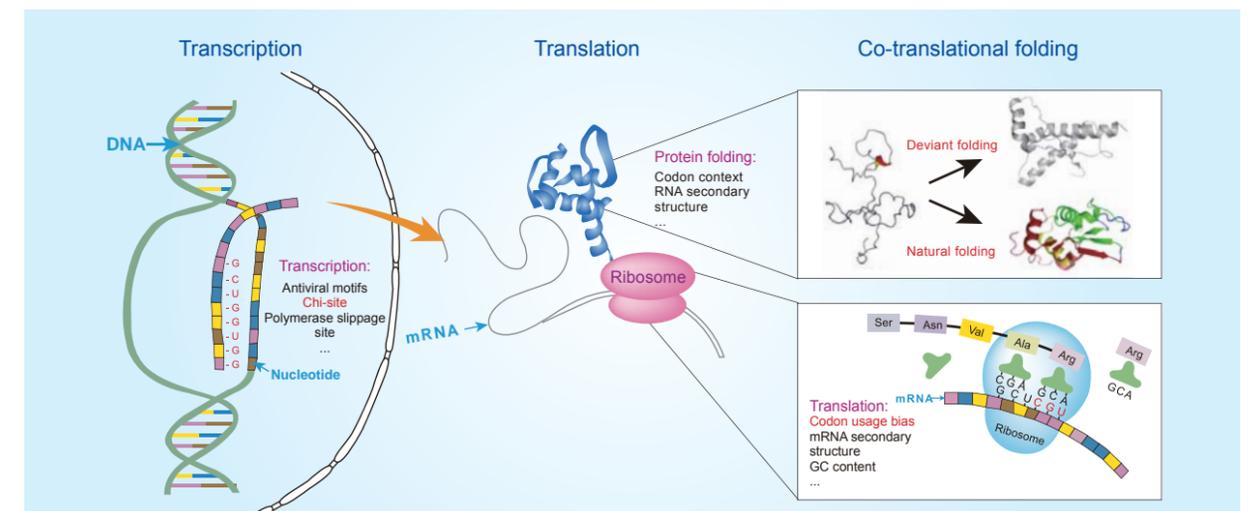
- ▶ 合成组织样本不易获得但序列已知的基因
- ▶ 合成需经过密码子优化以提高外源表达量的基因
- ▶ 根据基因结构功能研究的需要对基因进行修正
- ▶ 合成序列保真度要求高，无突变或SNP存在的基因
- ▶ 用于微芯片的大量cDNA
- ▶ 设计合成DNA疫苗
- ▶ 设计基因治疗载体

1.2 密码子优化

功能蛋白的外源宿主表达是现代蛋白功能组学的基础，然而很多蛋白由于可能包含有抑制基因表达的因子，如密码子使用的偏好等，导致其在外源宿主中很难表达。日益发展的基因设计与合成技术解决了许多蛋白表达的难题。

金斯瑞拥有10年基因合成经验的品质保证，引领合成生物学研究行业的先锋，其先进的OptimumGene™密码子优化技术可以优化任何自然或者重组的基因序列，在任何给定的表达系统中达到最高表达水平。相比传统的优化技术仅考虑密码子使用频率及mRNA结构，OptimumGene™基因优化算法充分考虑到蛋白表达不同阶段可能遇到的多种复杂因素，如：密码子偏爱性、mRNA结构以及转录和翻译过程中涉及的各种顺式元件。

运用OptimumGene™密码子优化技术，可使*E.coli*表达系统的蛋白表达量提高达100倍。拥有高表达量的蛋白，您可快速获得有意义的实验结果，并可节省实验时间和经费。



2. 基因合成服务简介

金斯瑞是全球最大的基因合成供应商，合成通量超过500万bp/月，已经为世界各地客户成功合成100,000多条复杂基因，其中最长成基因长达50 Kb。公司搭建了Gene-On-Demand™技术平台，整合了世界顶级水平的基因服务专家、先进的OptimumGene™密码子优化技术及CloneEZ®无缝克隆技术，有能力合成客户所需任何长度及复杂程度的基因。



金斯瑞基因合成帮您获得

- ▶ 特定突变的基因
- ▶ 序列已知但组织样本不易获得的基因
- ▶ 采用传统钓取法时间过长影响实验进程的基因
- ▶ 通过密码子优化，提高外源表达水平的基因
- ▶ 序列保真度要求高，无突变或SNP存在的基因
- ▶ cDNA文库中不表达，或丰度极低，不易通过PCR获取，或获取费用较大的基因

服务特色

- ▶ 任何合成的基因均经严格QC鉴定，保证序列100%准确
- ▶ 快速交货，合成长达10 kb的基因仅需35个工作日
- ▶ 专利密码子优化，显著提高蛋白表达水平，最大可高达100倍
- ▶ 合成的基因可克隆至任何您指定的目的载体上
- ▶ 专业的技术团队，将基因合成交给我们，您无需费心费力，可专注于科学研究

3. 常见问题解答

Q-1. 金斯瑞能合成多长的基因？

A-1. 没有长度限制，金斯瑞可为您合成长达50 kb及以上的基因序列。且金斯瑞已挑战合成成功的基因有：长达50 kb的基因；>70%高GC含量或<30%低GC含量的基因；重复片段基因；强二聚体结构的基因；含100多个连续腺嘌呤的基因 (aaaaaaaa.....) 等几千种复杂基因。

Q-2. 金斯瑞基因合成包括哪些步骤？

A-2. 金斯瑞基因合成的步骤为：设计、合成和组装单链寡核苷酸序列；将组装的全基因序列克隆到载体上；通过DNA测序和酶切来验证序列的正确性。

Q-3. 密码子优化有必要吗？

A-3. 对于用于蛋白表达的基因来说，多数情况下是有必要的。如真核生物的基因需要在原核生物中表达，由于真核生物的密码子偏好和原核生物有很大不同，对基因进行密码子优化将显著提高表达效率。

Q-4. 金斯瑞合成的基因克隆到什么载体上，使用的是什么酶切位点？

A-4. 合成的基因克隆到pUC57标准载体上，通常合成的基因被克隆至载体上EcoR V位点

Q-5. 金斯瑞可以将合成的基因克隆至我自己的载体吗？

A-5. 可以。除pUC57载体，其它的载体需要由客户自己提供。如果您需要将合成的基因克隆到指定的载体上，需要您提供载体DNA及相关信息。

Q-6. 怎么确认最终合成基因的序列是否正确？

A-6. 在项目的整个过程中，我们都会采取有效的控制以确保合成基因的准确性。首先，在项目启动之前，我们会先请您核实订单，再按照定制报价的内容为您合成基因的精确序列。其次，在组装的每一个步骤我们也会检查序列，从而确定合成的任何一部分都包含目的序列。再次，在基因全长克隆到载体中后，我们会进一步确认其与所报序列的一致性。最后，我们会将电子数据包连同您核实过的原始序列信息发送给您。

数据包中包括样品检验报告-即样品酶切后的图片、样品测序结果、质粒图谱 (完整的外源插入序列和载体序列)、测序结果与原始序列的比对文件。

Q-7. 密码子优化过的基因，金斯瑞是否还提供蛋白表达服务？

A-7. 金斯瑞同时可为合成的基因提供蛋白表达及纯化服务。金斯瑞提供四大蛋白表达系统：原核蛋白表达系统、酵母蛋白表达系统、杆状病毒-昆虫细胞蛋白表达系统及哺乳动物细胞蛋白表达系统。

Q-8. 金斯瑞建议采取什么方法进行DNA溶解？

A-8. 金斯瑞最终提交给客户的样品包括4 μg的质粒DNA干品。关于如何将其溶解，我们的建议如下：将样品短暂离心以确保样品收集管的底部。在样品中加入您所需要的一定体积的灭菌双蒸水或者TE缓冲液。将其稍微涡旋，在冰上静置2~10分钟，然后再涡旋溶解。

1. 知识荟萃

1.1 引物设计

1) 常规PCR引物设计

引物长度：15~30 bp，常用为20 bp左右；

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；

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；

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；

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；

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；

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；

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：

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；

T_m温度应选择50~70 左右；

GC含量应选择在50%左右，尽量避免A、T、G、C的连续结构；

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；

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：

避免重复碱基，尤其是G；

T_m=58~60 ；

GC=30~80%；

3'端最后5个碱基内不能有多于2个的G或C；

正向引物与探针离得越近越好，但不能重叠；

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)；

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：

TaqMan探针位置尽可能靠近扩增引物，但不能与引物重叠；

长度一般为18~40 mer；

GC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 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 CCGGTCGACCGG	0 0 0	0 0 0
Afl III	CACATGTG CCACATGTGG CCCACATGTGGG	0 >90 >90	0 >90 >90
Asc I	GGCGCGCC AGGCGCGCCT TTGGCGCGCCAA	>90 >90 >90	>90 >90 >90
Ava I	CCCCGGGG CCCCCGGGGG TCCCCGGGGGA	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 AGGCGCGCCT TTGGCGCGCAA	0 0 50	0 0 >90
BstE II	GGGT(A/T)ACCC	0	10
BstX I	AACTGCAGAACCAATGCATTGG AAAAGTGCAGCCAATGCATTGGAA CTGCAGAACCAATGCATTGGATGCAT	0 25 25	0 50 >90
Cla I	CATCGATG GATCGATC CCATCGATGG CCCATCGATGGG	0 0 >90 50	0 0 >90 50
EcoR I	GGAATTC CGGAATTCGG CCGGAATTCGGG	>90 >90 >90	>90 >90 >90
Hae III	GGGGCCCC AGCGGCCGCT TTGGCGCCGCAA	>90 >90 >90	>90 >90 >90
Hind III	CAAGCTTG CCAAGCTTGG CCCAAGCTTGGG	0 0 10	0 0 75
Kpn I	GGGTACCC GGGGTACCCC CGGGGTACCCCG	0 >90 >90	0 >90 >90
Mlu I	GACGCGTC CGACGCGTCG	0 25	0 50
Nco I	CCCATGGG CATGCCATGGCATG	0 50	0 75
Nde I	CCATATGG CCCATATGGG CGCCATATGGCG GGGTTTCATATGAAACCC GGAATTCATATGGAATTCC GGGAATTCATATGGAATTCCC	0 0 0 0 75 75	0 0 0 0 >90 >90
Nhe I	GGCTAGCC CGGCTAGCCG CTAGCTAGCTAG	0 10 10	0 25 50

酶	寡核苷酸序列	切割率%	
		2 hr	20 hr
Not I	TTGCGGCCGCAA ATTTGCGGCCGCTTTA AAATATGCGGCCGCTATAAA ATAAGAATGCGGCCGCTAAACTAT AAGGAAAAAAGCGGCCGCAAAAGGAAAA	0 10 10 25 25	0 10 10 90 >90
Nsi I	TGCATGCATGCA CCAATGCATTGGTTCTGCAGTT	0 >90	>90 >90
Pac I	TTAATTA GTTAATTAAC CCTTAATTAAGG	0 0 0	0 25 >90
Pme I	GTTTAAAC GGTTTAAACC GGTTTAAACCC AGCTTTGTTTAAACGGCGGCCGG	0 0 0 75	0 25 50 >90
Pst I	GCTGCAGC TGCACTGCAGTGCA AACTGCAGAACCAATGCATTGG AAAAGTGCAGCCAATGCATTGGAA CTGCAGAACCAATGCATTGGATGCAT	0 10 >90 >90 0	0 10 >90 >90 0
Pvu I	CCGATCGG ATCGATCGAT TCGCGATCGCGA	0 10 0	0 25 10
Sac I	CGAGCTCG	10	10
Sac II	GCCGCGGC TCCCCGCGGGGA	0 50	0 >90
Sal I	GTCGACGTCAAAGGCCATAGCGGCCGC GCGTCGACGTCTTGCCATAGCGGCCGCGG ACGCGTCGACGTGCGCCATAGCGGCCGCGGAA	0 10 10	0 50 75
Sca I	GAGTACTC AAAAGTACTTTT	10 75	25 75
Sma I	CCCGGG CCCCGGGG CCCCCGGGGG TCCCCGGGGGA	0 0 10 >90	10 10 50 >90
Spe I	GACTAGTC GGACTAGTCC CGGACTAGTCCG CTAGACTAGTCTAG	10 10 0 0	>90 >90 50 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纯化、PAGE纯化及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35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酰胺三酯法。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。固相亚磷酰胺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，亚磷酰胺保护核苷酸单体，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，亚磷酰胺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

- a) 重新挑取克隆测序，会有找到正确克隆的可能；
- b) 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：

- a) 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；
- b) 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，我们将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OD₂₆₀/OD₂₈₀小于1.8时，引物的纯度合格吗?

OD₂₆₀/OD₂₈₀的比值不能用来衡量引物的纯度。OD₂₆₀/OD₂₈₀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OD₂₆₀/OD₂₈₀的比值，清楚表明OD₂₆₀/OD₂₈₀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-AAAAGGGGGTTTTCCCC-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Mg²⁺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反应用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 μl，加热到95℃，2 min，然后缓慢冷却至室温(低于30℃)即可。退火的产物可以放在4℃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： $Tm = 4(G + C) + 2(A + T)$ 。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℃保存一年以上，如无条件，请于-20℃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/μl的储备液，分装成几份(每份最多反复冻融5次)，于-20℃保存。使用前，将配制好的储备液稀释成工作液(10 pmol/μl或20 pmol/μl)，剩余部分于-20℃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，通常使用中没有区别。

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。

4. 如何订购引物合成服务

1) 如何利用金斯瑞在线订购系统订购引物合成服务？

您可以按以下步骤进行：

登录金斯瑞中文网站首页 (<http://www.genscript.com.cn>)，查看“订购指南”页面，在该页面下载“引物合成服务合同”（引物合成订购表），并进行填写；

通过网站首页注册成为金斯瑞会员，老会员客户可直接进行登录；

会员登录之后点击进入“引物服务”在线系统，直接上传已填写完整的引物订购表，即完成此次订购。

此引物订单经客服人员审核后，您将收到系统给您发送的“引物订单安排通知邮件”以及“引物订单安排通知”短信。

如遇特殊情况而无法上传引物订购表，可将填写好的订购表发至邮箱：oligo@genscript.com.cn，由我们客服人员代为上传；或者将此表发给当地业务经理或代理商，由他们帮您处理。

2) 如何通过当地业务经理或代理商订购引物？

直接电话或者邮件联系您所在地的业务经理或代理商，相应的联系方式请登录金斯瑞中文网站

(<http://www.genscript.com.cn>) 查看；

如您不清楚当地业务经理及代理商联系方式，也可直接联系金斯瑞引物客服，

客服电话：025-58897288-5812；订购邮箱：oligo@genscript.com.cn。

3) 如何正确填写引物合成订购表？

金斯瑞的引物合成订购表填写内容包括两个方面：客户信息以及样品信息，其中*号标记为必填项，如果*号标注部分没有填写完整，您将无法顺利上传订单，具体说明如下：

请认真阅读订购表中的“填写要求”；

客户信息必填项主要包括：客户姓名、单位、地址、电话及邮箱等；

样品信息必填项主要包括：引物名称、序列、碱基数、引物用途、纯化方式、OD数、分装管数等；如是标记或者修饰引物，需填写标记或者修饰名称；

如填写过程中有任何疑问，请联系客服人员。

4) 当您对引物质量或技术方面有疑惑，该怎么办？

如您对引物质量存在任何疑问，请将问题(如在实验过程中发现引物序列发生了突变或者缺失等，需提供具体的测序结果)发送至邮箱：oligo@genscript.com.cn，我们核实之后会第一时间给您最满意的答复。如您在引物合成方面有任何技术方面的问题，可拨打：025-58897288-5812或发送邮件至上述邮箱进行咨询，金斯瑞专业人员将为您解答。

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(-47)/M13F/T7	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/LacZ	H1.3F/pCMV-F/pEGFP-N-5/T7	pCDNA3.1R/BGH
pcDNA3.1/His C/A/B/LacZ	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/LacZ	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(-)/(+)/CAT	H1.3F/pCMV-F/pEGFP-N-5/T7	pCDNA3.1R/BGH
pColdDNA- I/II/III/ IV	pCold-F	pCold-R
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

载体	一端	另一端
pET28b	T7	T7ter
pET30b	T7	T7ter
pFastBac Dual	pEGFP-C-3'	PFast BAC-F
pFastBac HT A,B,C	pEGFP-C-3'	PFast BAC-F
pFastBac1	pEGFP-C-3'	PFast BAC-F
pGEM-T Easy	M13F(-47)/M13F/T7	M13R(-48)/M13R
pGEX-4T-1/3	p-GEX5'	p-GEX3'
pGS-21a	p-GEX5'	T7ter
pMD18-T	M13F(-47)/M13F	M13R(-48)/M13R
pMD19-T	M13F(-47)/M13F	M13R(-48)/M13R
pPCR script	M13F(-47)/M13F/T7	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
pUC57	M13F(-47)/M13F	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
- 在使用商业化载体时，建议使用载体推荐测序引物

表5. 通用引物及序列

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 TAA AAT 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'- CAAATG 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'	PQE30F	5'- TGA GCG GAT AAC AAT TTC AC -3'
SP6	5'- GAT TTA GGT GAC ACT ATA G -3'	PQE30R	5'- GTT CTG AGG TCA TTA CTG G -3'
M13F	5'- TGT AAA ACG ACG GCC AGT -3'	Pcold-F	5'- CAGTGTAGTAAGGCAAGTCC -3'
M13R	5'- CAG GAA ACA GCT ATG AC -3'	Pcold-R	5'- GGGCCTGCGCATTCTCATTG -3'
M13F(-47)	5'- CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC -3'	S.TAG	5'- CGAACGCCAGCACATGGACA -3'
ITS4	5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC -3'	H1.3F	5'- GACGTCAATGGGAGTTTGT -3'
27F	5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3'	1492R	5'- GGTTACCTTGTTACGACTT -3'
ITS1	5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG -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 μl 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 μl 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。
- 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。
- 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 $^{\circ}\text{C}$ ，常规抗生素为氨卞青霉素、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： $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}=1.6\sim 2.0$ ，也可以直接提供质粒。质粒浓度一般要求大于100 $\text{ng}/\mu\text{l}$ ，提供20 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100 $\text{ng}/\mu\text{l}$ ，提供20 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 $>5 \text{ pmol}/\mu\text{l}$ 。

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 $\text{ng}/\mu\text{l}$ ，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 $\text{pmol}/\mu\text{l}$ 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 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}=1.6\sim 2.0$ 。最好溶解在已灭菌的去离子水中，浓度要求大于50 $\text{ng}/\mu\text{l}$ ，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 $\text{pmol}/\mu\text{l}$) 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：

- 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；
- 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%；
- 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 $\text{pmol}/\mu\text{l}$ 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
	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质，那测序结果也是双峰。
实验停止，两次摇菌不成功，请您重新提供样品	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
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℃ 培养一个晚上后便可使用。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：

a) 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；
b) 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，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：

- 测序引物在模板上有两个结合位点形成套峰；
- 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；
- 模板序列的特殊结构，如Poly结构、发卡结构等；
- 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：

- 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远)测序；
- 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；
- 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；
- 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. 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-17. 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-18. 我的基因序列与标准序列为什么有差别？

A-18. 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-19. DNA片段很长，一个反应读不到头，怎么办？

A-19. 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-20. 测序完成后，测序样品和引物将如何处理(或保存)？

- 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)；
- 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-21. 全自动荧光测序的准确性如何？

A-21. 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-22. 用测序的方法检测点突变可靠吗？

A-22. 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，也不一定准确检测到突变体的存在。

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-23. 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-23. 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-24. 你们为什么在primer walking时总将引物设计的那么靠前？

A-24. 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-25. 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-25. 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。

在线留言：如您对自己的测序结果有疑问，可在系统中进行留言，我们的测序客服人员会在24h内给您答复。

5) 如何通过当地金斯瑞业务经理或代理商订购测序服务？

您可直接联系我们当地的业务经理或者代理商，相应的联系方式请登录金斯瑞中文网站 (<http://www.genscript.com.cn>) 查看；

如您不清楚当地业务经理及代理商联系方式，也可直接联系金斯瑞测序客服；

客服热线：025-58897288-5813，邮箱：seq@genscript.com.cn。

6) 如您对测序结果有疑问，该怎么办？

您可以通过以下途径反馈您的疑问：

在线留言：您的第一选择，该途径快捷便利，一目了然，测序客服人员会在24h内给您准确的答复；

通过客服热线联系我们的客服人员：025-58897288-5813；

通过邮件方式反馈给我们，客服邮箱：seq@genscript.com.cn。

4. 如何订购测序服务

1) 如何订购金斯瑞测序服务？

您可通过如下方式进行订购：

联系您所在地的金斯瑞业务经理或者代理商，填写我公司四联的DNA测序订单，将填写完整的测序订单随测序样品一起交给工作人员；

如您不清楚当地业务经理及代理商联系方式，请与我公司测序客服联系确认相关信息，并登录金斯瑞中文网站首页 (<http://www.genscript.com.cn>) 查看“订购指南”页面，在该页面下载“DNA测序服务合同”，将合同填写完整后打印好随样品一起快递到我公司。

2) 如何正确填写测序服务合同？

金斯瑞的测序服务合同填写内容包括两个方面：客户信息以及样品信息。

客户信息主要包括：客户姓名、电子邮箱、手机、单位等；

样品信息主要包括：样品名称、样品类型、载体名称、抗性、片段大小、引物、测序要求等信息。

如您在填写过程中有任何疑问，可联系当地业务经理、代理商或金斯瑞客服人员，

客服热线：025-58897288-5813，邮箱：seq@genscript.com.cn。

3) 金斯瑞测序服务可为您提供哪些便利？

测序在线系统方便您随时下载测序报告、管理订单、核对订单金额、问题沟通等功能；

测序订单安排后，系统会发送邮件告知订单号、测序周期等相关信息；

测序订单完成后，系统会发送邮件告诉您测序已经完成，您可在邮件正文中直接下载测序结果，也可登录系统下载测序结果；

测序订单完成后，系统也会发短信至您手机上，提示您及时下载测序报告；

如您对某个订单有疑问，可通过在线系统在该订单下面直接留言，客服人员会及时回复，非常简捷方便。

4) 如何使用测序服务在线系统？

在线系统的用途如下：

数据存档：为您保存3个月的测序结果，您可以随时下载，不用担心相关数据丢失；

样品记录：针对您每次订单的每个样品的具体测序情况都有详细说明；

技术支持：包含3730测序仪简介、样品提供说明、测序用引物说明、大片段DNA测序、常见问题说明、常见峰图说明、测序周期、测序通用引物等内容，您可以根据自己的需要随意查看或下载；

帐户管理：您可以自行对帐户进行管理，根据要求修改自己的密码；

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(下载链接：http://www.genscript.com.cn/on_line_tools.html)。

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。