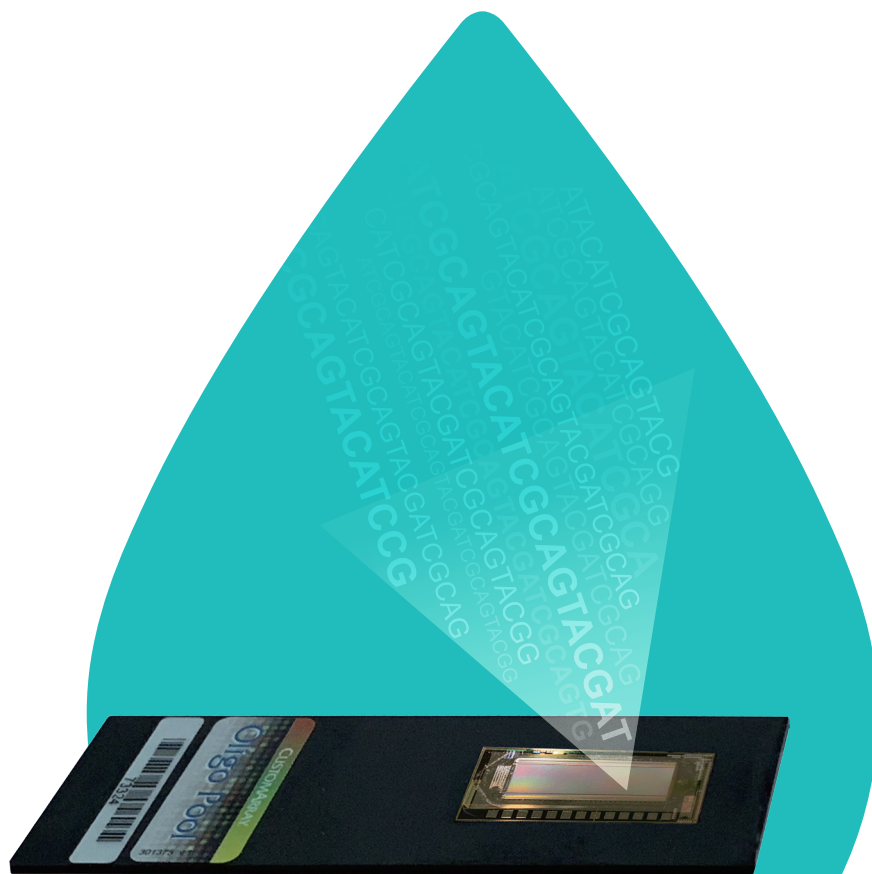


金斯瑞精准引物池合成服务

更高效的文库构建和高通量筛选方案



引物池使用手册

- NGS杂交捕获探针文库
- CRISPR sgRNA文库
- 突变文库

- ☆ 覆盖率>99%
- ☆ 均一性好
- ☆ 准确率高



日新月异的分子生物学技术，让科学研究、生物技术产品的进展不断加快脚步，金斯瑞始终跻身于新兴技术的第一方阵，致力于将前沿技术转化为帮助每一位科研工作者日常实验的服务。

精准引物池合成技术

——文库构建的好助手，高通量筛选的直通车

您还在为文库构建的时间和经费成本高而困扰吗？

您还在为文库容量低、质量差导致后续高通量筛选效率低而烦恼吗？

金斯瑞精准引物池合成服务，凭借其序列覆盖率高、均一性好、准确率高的特点，依托其合成通量大、时间短、单价低的优势，为文库构建和高通量筛选提供了兼顾质量与成本的理想方案。

本手册旨在为分子生物学科研工作者介绍引物池合成的技术内涵、质控关键点、应用优势以及在下游文库构建和高通量筛选中的使用流程。以最简明扼要的介绍为您全方位解析引物池合成技术，让这项先进技术更好的助力您的科研事业。

目录

什么是引物池？

——引物池合成技术1分钟入门

引物池简介与成功应用的要素	2
引物池合成技术的原理与分类	4
金斯瑞精准引物池合成服务	6

引物池的应用与优势

——更快·更经济·更高效

引物池的应用与优势	10
NGS杂交捕获探针文库构建	12
CRISPR sgRNA文库构建	14
突变文库构建	16
引物池应用的文献	18

引物池的订购与使用

——轻松找到最合适的引物池服务

引物池的订购方法	20
引物池的使用指南	21

为什么选择金斯瑞引物池合成服务？

——序列覆盖率>99%·均一性高

领先的技术平台	24
严格的质量控制	26
灵活的定制服务	27



什么是引物池？



传统引物合成

成本高、时间长



.....xN

大量合成引物



引物池合成

高通量、成本低、时间短
序列覆盖率高、均一性好

引物池的优势

引物池技术简介

引物池是包含成千上万条人工合成的不同序列的核苷酸链的混合物，一次性在一个微阵列芯片上同步、高通量合成这些核苷酸序列，然后切下来溶解在单管中，可用于NGS杂交捕获探针文库、CRISPR sgRNA文库和突变文库，从而开展后续的高通量筛选工作。

目前，引物池合成的核苷酸链的长度在10-200 nt，单条核苷酸链的合成量在飞摩尔 (fmol) 级别，一般情况下，需要经过PCR扩增达到有效浓度后使用。

引物池成功应用的要素

覆盖率高

引物池中序列涵盖设计序列的百分比高
保证文库容量和筛选实验中核苷酸链的多样性

均一性好

引物池中不同序列的合成量在同一水平
后续筛选实验中避免序列丢失，每条序列合成量接近

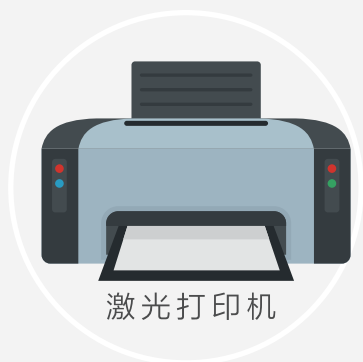
碱基错误率低

合成序列与设计序列对比，错误率低
准确给出筛选所得核苷酸链的序列

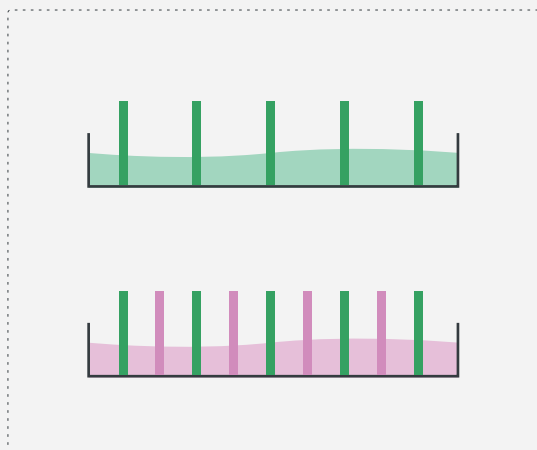
芯片间差异小

不同芯片合成的引物池的质量稳定
混合后序列均一性好，实验间重复性好

两种引物池合成技术的原理



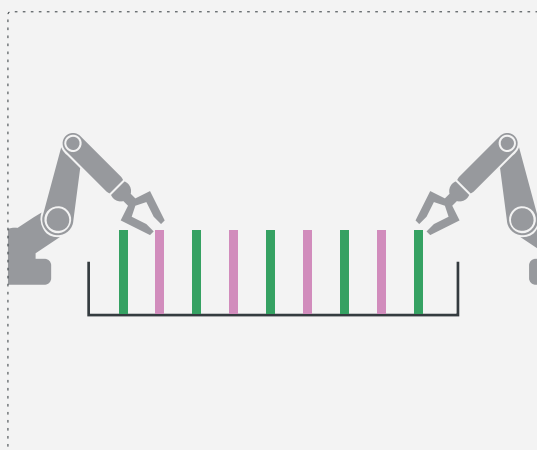
≈



半导体芯片技术



≈



喷墨技术

引物池合成技术的原理及分类

半导体芯片技术

多个核苷酸探针合成在芯片的铂电极上，每个不同序列的核苷酸链将在不同的探针上合成。芯片上特有的“CMOS”（互补金属氧化物半导体），可以按照由预先设置的序列信息转变而成的电子指令，将碱基原料特异的、按顺序的连接在对应的序列上。例如，在芯片合成槽内添加腺嘌呤 (A) 原料时，需要连接A的序列上会执行指令连接A，而不需要A的序列则不会连接，重复若干次，直至全部序列合成完毕。

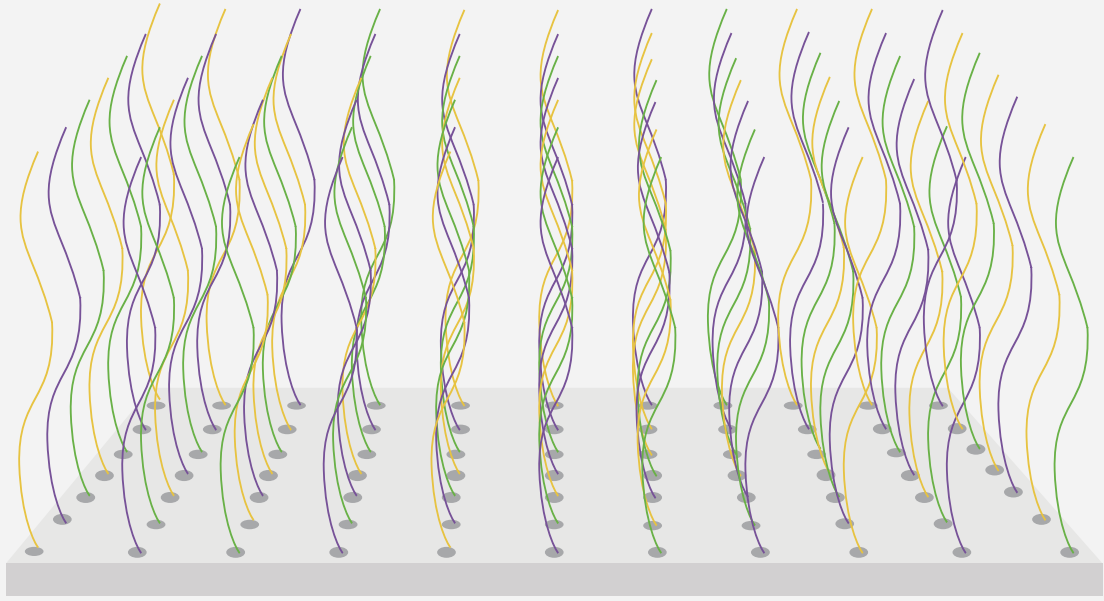
芯片上的每个铂电极在合成前均会进行通讯检测，并在合成的过程中受到监控，成千上万的铂电极按照电子指令同时工作，完成多条核苷酸链的合成。

喷墨技术

芯片上分布有多个探针，合成仪有多个喷印头，每个喷印头中装有4种碱基之一的液体原料，喷印头可在整个芯片上移动，喷印头根据由预先设置的序列信息转变而成的电子指令，将特定的碱基喷印（连接）在芯片上特定位置的序列上，与传统的固相DNA合成原理类似。

多个喷印头独立补充碱基原料并同时为每一条序列连接特定碱基，直至全部序列合成完毕。

技术平台	优势	缺点	代表供应商
半导体芯片技术	半导体芯片控制准确性高于机械喷印头 密闭空间内合成，受外界因素影响小	碱基原料消耗略高	金斯瑞（独家）
喷墨技术	节约碱基原料	合成易受外部水分、臭氧等因素影响，造成合成效率不一致，存在较大批次间差异	安捷伦，Twist



金斯瑞引物池合成



序列覆盖率 > 99%



序列均一性高



碱基错误率极低



灵活的定制化服务

金斯瑞精准引物池合成服务

2017年，金斯瑞收购全球领先的引物池合成公司CustomArray，整合其技术与资源，采用CustomArray独有的半导体芯片技术为客户提供定制化的精准引物池合成服务，具备12 K（12,472条）、92 K（92,918条）规格的两种芯片，序列长度为10-200 nt，每条序列的合成量为飞摩尔（fmol）级别，引物池合成速度行业领先，**最快1周交付，低至1分钱/碱基。**

金斯瑞精准引物池合成车间通过ISO9001认证，规范严格的质量管理体系是优异稳定产品质量的可靠保证。

金斯瑞精准引物池合成服务的优势

完美实现与交付客户所设计的文库，精准匹配客户的下游实验和应用

- ✓ 合成序列与设计序列比较，**覆盖率>99%**
- ✓ 每条序列的合成量差别极小，**均一性高**
- ✓ 引物池中序列碱基错误率极低，**错误率低至0.5%**
- ✓ 独家半导体技术确保每张芯片合成产物差异极小，**批次间稳定性高**

**提高后续高通量筛选的效率与成功率，
不再错过任何一个有价值的发现！**

金斯瑞精准引物池合成服务详情

货号	引物长度	芯片容量	周期	价格
SC1966-12	10-200 nt*	12,472条/芯片	1周	低至1分钱/碱基 欢迎询价
SC1966-92		92,918条/芯片	2周	

*170-200 nt及以上请详询

2种规格的芯片可任意组合，无最低起定条数，为您量身定制灵活经济的引物池

可提供目的基因，靶序列信息，由金斯瑞协助文库序列的设计，序列的设计也将交付

引物池增值服务——灵活组合，一站式解决方案

交付形式1：引物池

应用：每条引物含量较少，推荐自行扩增或交由金斯瑞扩增、克隆后使用

交付形式2：扩增后的引物池

应用：NGS杂交捕获探针文库*

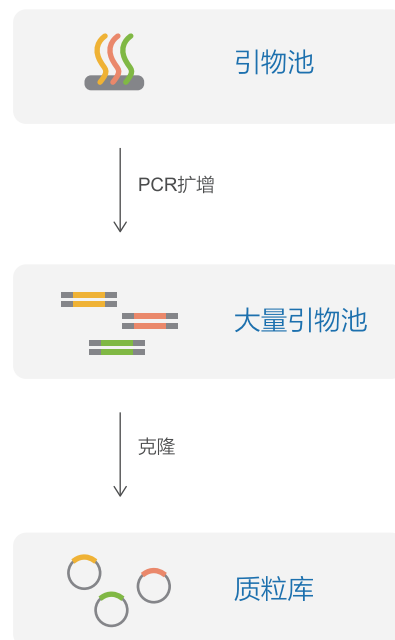
优势：扩增效率高，碱基错误率低

*NGS杂交捕获探针文库：仅提供修饰纯化后的文库，可直接用于下游实验

交付形式3：扩增、克隆后的质粒库

应用：CRISPR sgRNA文库、突变文库

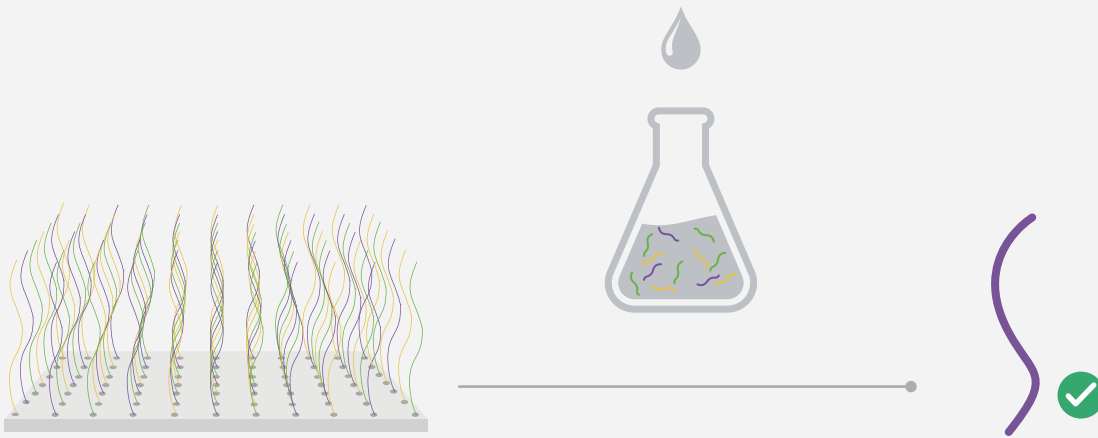
优势：金斯瑞克隆后序列覆盖率 > 90% VS 试剂盒克隆后序列覆盖率仅60-70%



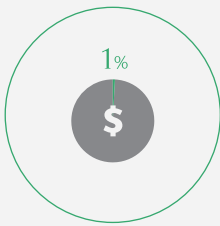
欢迎咨询精准引物池合成服务，邮件发送至或拨打电话400-025-8686转5812/5815，专业技术支持为您服务。



引物池的应用与优势

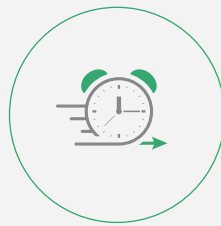


引物池应用于高通量筛选



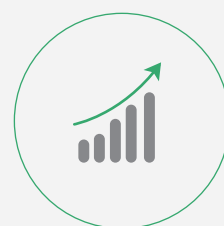
更经济

成本低至传统合成的1%



更快速

周期快至传统合成的1/20



更高成功率

库容量大/多样性高/均一性好
提高高通量筛选效率

引物池的应用与优势

引物池合成技术凭借其短时间可合成成千上万条不同序列的核苷酸链的特点，展露出比传统单条引物合成更快速、高效和经济的特点。传统的方法一次性合成十万条引物成本可能高达成上百万元，耗时数月，而采用一张芯片只需要1%的价格，**最快1周即可合成完毕，低至1分钱/碱基。**

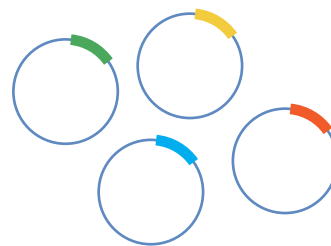
因此，引物池特别适合于NGS杂交捕获探针文库、CRISPR sgRNA文库、突变文库等的构建，利用文库完成高通量筛选得到目标序列，之后再大量合成该目标序列用于后续实验。



NGS杂交捕获探针文库构建*



CRISPR sgRNA文库构建



突变体文库的构建

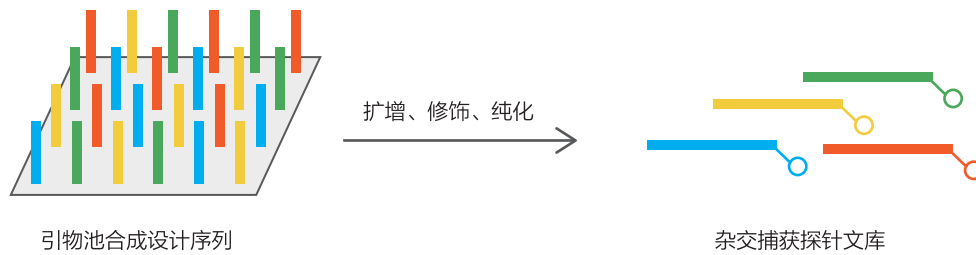
*NGS杂交捕获探针文库：仅提供修饰纯化后的文库，可直接用于下游实验

NGS杂交捕获探针文库构建

NGS建库时，通过引物池合成构建杂交捕获探针文库，既可以用于目的基因的捕获与检测，也可以用于筛选靶序列的特异性探针序列。

基于金斯瑞引物池合成，通过扩增、修饰和纯化制备的杂交捕获探针文库，凭借覆盖率和均一性高的优越性能，展示出了捕获片段覆盖率高、捕获效率高和重复性好的出色表现，以远低于杂交捕获探针文库成品（单条引物合成后混合）的价格，即可获得同等的捕获效果，更经济。

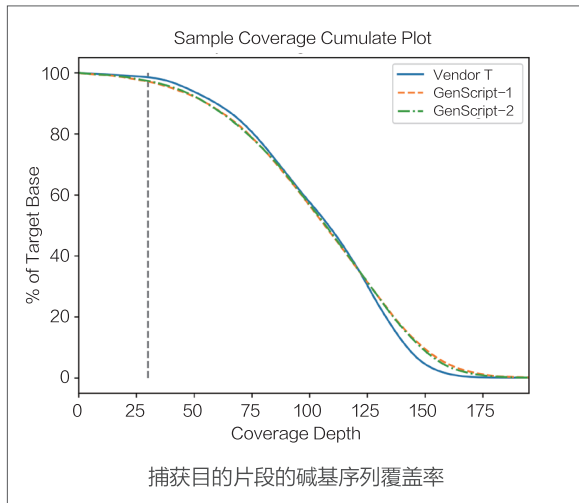
引物池用于杂交捕获探针文库构建的流程



*NGS杂交捕获探针文库：仅提供修饰纯化后的文库，可直接用于下游实验

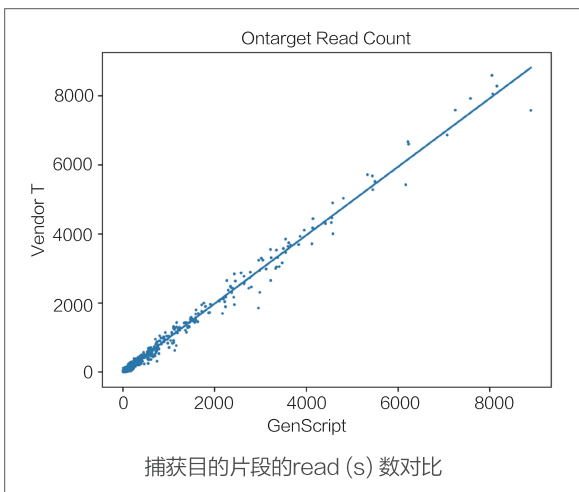
实例分享

实验内容：在800 kb的人类基因组上，捕获来自12种肿瘤组织的127个基因序列的片段，对比使用金斯瑞引物池构建的杂交捕获探针文库（芯片合成技术）与杂交捕获探针文库成品（供应商T，单条合成技术）的捕获覆盖率、捕获效率和平行实验间的重复性。



捕获片段覆盖率高：当测序深度 $\geq 30\times$ 时，捕获探针文库捕获目的片段的碱基序列覆盖率达97.15%，与捕获探针文库成品的碱基序列覆盖率水平一致，两者不同测序深度的碱基序列覆盖率相近，可满足目的基因的捕获和后续检测，表明芯片技术可以更低的价格替代单条合成技术，用于杂交捕获探针文库构建。

重复性好：2次平行实验中，基于引物池合成时芯片的批次间一致性，有力地保证了实验的可重复性。



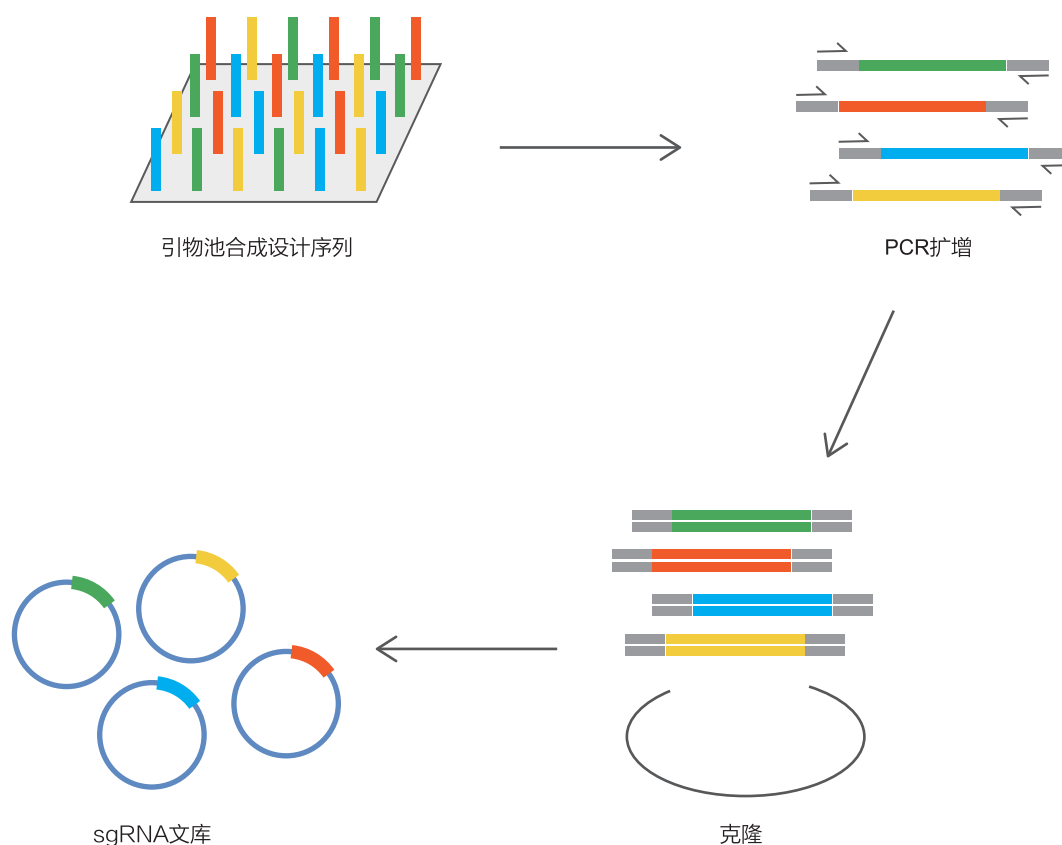
捕获效率高：同样实验条件下，基于金斯瑞引物池构建的捕获探针文库，所捕获的目的片段的read (s) 数与捕获探针文库成品的相近，可以成功捕获到足够比例的目的片段，用于后续的扩增和上机测序。

CRISPR sgRNA文库构建

基因编辑实验中，通过引物池建立sgRNA文库，可以用于筛选对目标基因编辑效果最佳的sgRNA序列。

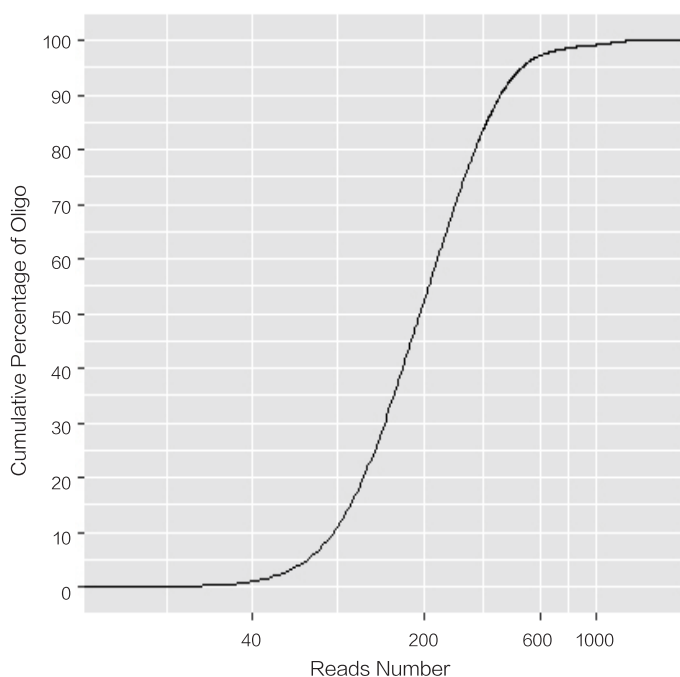
金斯瑞引物池合成，通过扩增和克隆制备的sgRNA文库，具有多样性和均一性高的优越性能，即可以涵盖所有设计的序列，且每条序列的合成量保持同一水平，确保高效、平行地开展后续高通量筛选实验，让您的高通量筛选不错过任何一个有价值的发现。

引物池用于CRISPR sgRNA文库构建的流程



实例分享

实验内容：利用引物池合成一个包含62,804条序列的sgRNA文库，通过NGS检测sgRNA文库的覆盖率和均一性。



测序条数	62,804
测序数据量 (GB)	0.67
read (s) 数 (百万)	14.90
Q30	85.30%
覆盖率 (测序深度 $\geq 1\times$)	100%
10%序列read (s) 数*	88
90%序列read (s) 数*	412
90%/10%* (克隆后)	4.68

覆盖率高：金斯瑞合成的引物池中，100%的设计序列至少被测序测到1次，表征交付的合成序列100%涵盖客户需要的设计序列。

均一性好：90%/10%数值表征文库中不同序列合成量的均一性，越低代表均一性越好，基于金斯瑞引物池构建的sgRNA文库，90%/10%显著优于业内竞争对手，避免浓度较低的序列在扩增时丢失，让您的高通量筛选不错过任何一个有价值的发现。

*科普小贴士：

10%序列read (s) 数：序列的read (s) 数由少到多进行排名，排位在10%的序列的read (s) 数。由于序列read (s) 数与序列合成量呈正相关，故可以此数据表征合成量由少到多排名，排位在10%的序列的合成量。

90%序列read (s) 数：序列的read (s) 数由少到多进行排名，排位在90%的序列的read (s) 数。

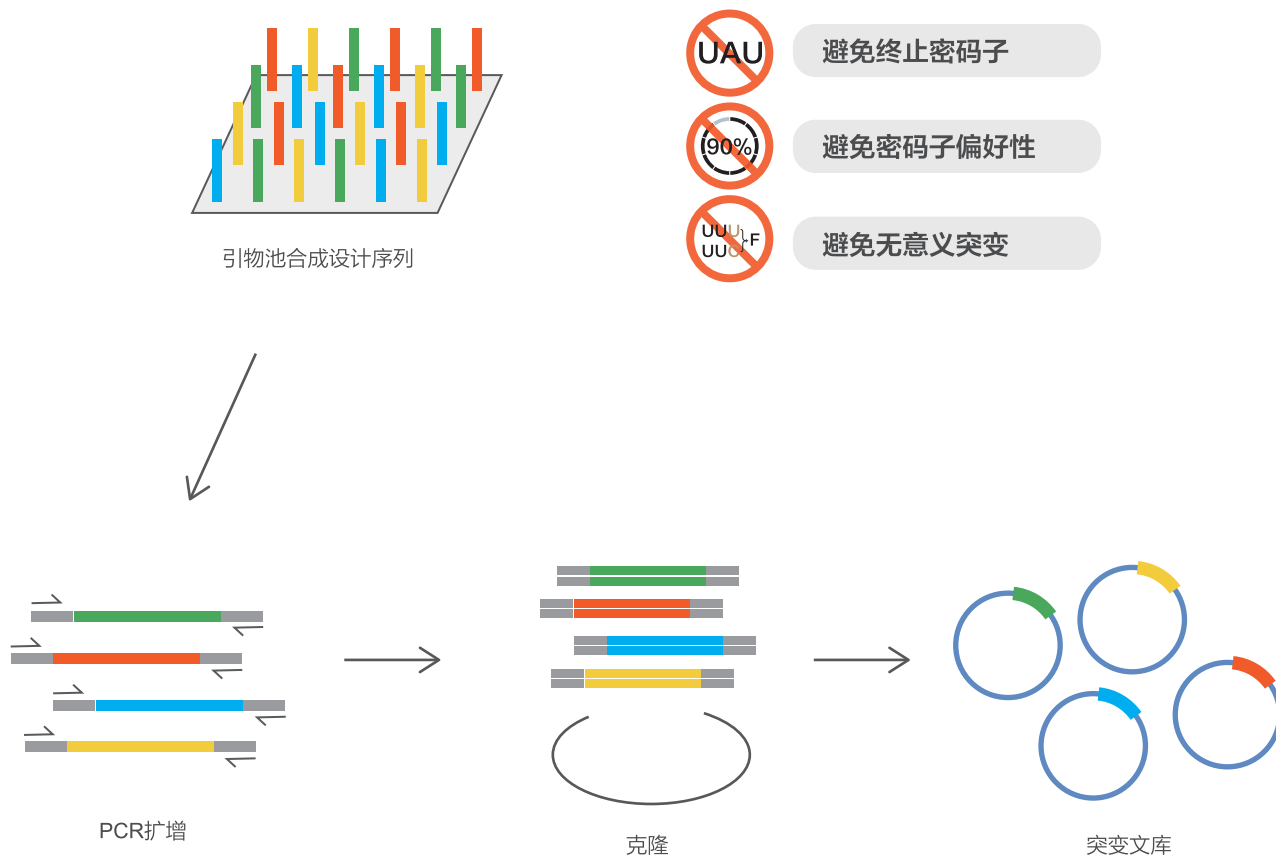
因此，90%/10%表征合成量偏大的序列与合成量偏小的序列之间的合成量倍数关系，是业内常用的表征文库中不同序列合成量的均一性的参数。

突变体文库的构建

在研究分子序列和蛋白功能之间的调控与关联时，利用引物池技术构建突变文库，合成大量DNA的调控区域或突变序列，从而找到符合研究目标的序列。

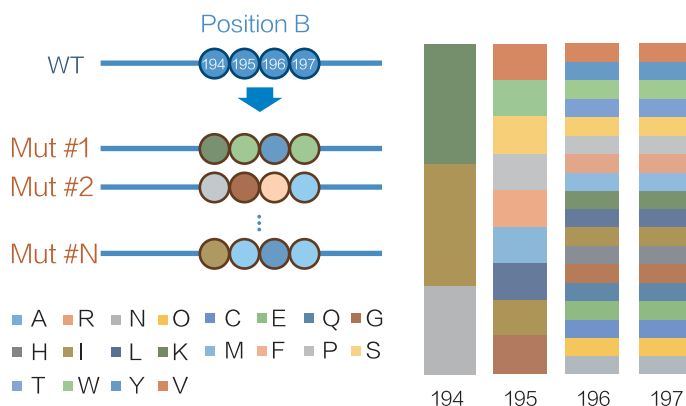
金斯瑞引物池经过扩增和克隆得到突变文库，覆盖率和均一性高，即可以涵盖所有设计的序列，且每条序列的合成量差异极小，不错过任何一个有价值的发现。同时，基于引物池合成技术的建库成本，将远低于传统基因合成后定向突变的方案。

引物池用于突变文库建库流程



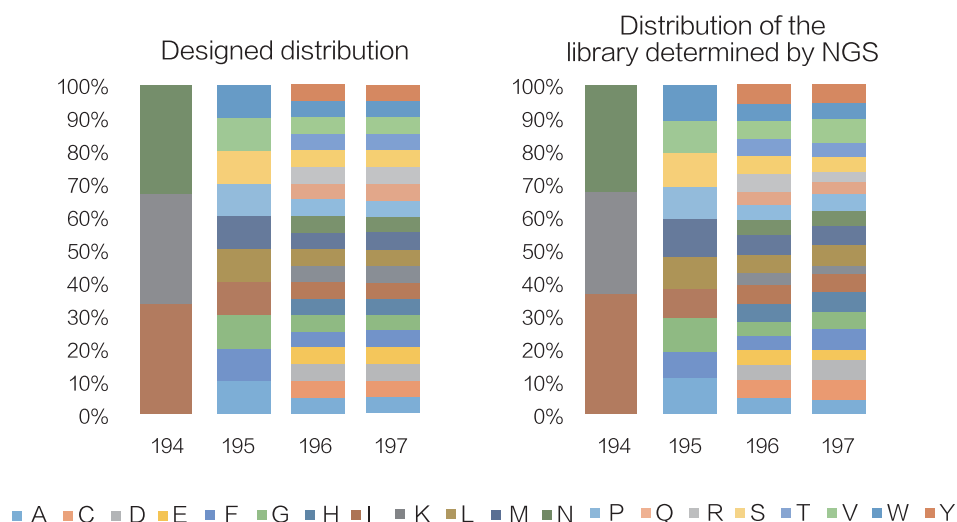
实例分享

实验内容：针对某野生型蛋白，对194-197位的氨基酸进行突变，其中，196、197位氨基酸要求进行饱和突变（即指定的氨基酸用所有19种氨基酸进行替代），同时，194位要求突变为指定的3种氨基酸，195位要求突变为指定的10种氨基酸，要求突变成每一种氨基酸的概率均等，如右图。同时，以NGS测序结果论证文库质量。



覆盖率高：NGS测序结果显示，突变文库序列翻译为氨基酸序列后（以下右图），与设计的氨基酸序列一致（以下左图），100%涵盖设计的所有位点氨基酸突变的种类，完全符合预期实验设计，不错过任何一个有价值的发现。

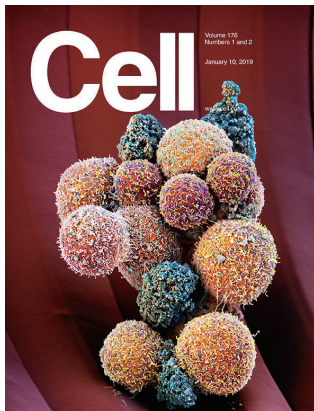
均一性好：突变文库序列翻译为氨基酸序列后（以下右图），每一种氨基酸突变所占的百分比非常均一，避免浓度差异干扰下游实验，保证下游实验平行可信。



金斯瑞引物池 文库构建专家的信赖之选

金斯瑞及其收购的CustomArray专注引物池合成技术十余年，以优质稳定的交付，获得越来越多分子生物学科学家及文库构建专家的信任和青睐，助力越来越多高影响因子的论文在国际学术的舞台上大放异彩。

采用CustomArray（金斯瑞）引物池合成发表的优秀论文摘选：



Reference 1. A Genome-wide Framework for Mapping Gene Regulation via Cellular Genetic Screens

利用CustomArray引物池合成的序列构建的sgRNA文库，可稳定的进行基因编辑，通过随机组合CRISPR/Cas9编辑的产物，随后进行单细胞的RNA测序，从而寻找和研究增强子序列。

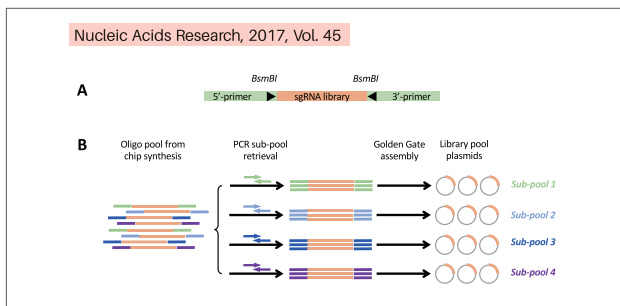
Cell, 2019. IF 31.398



Reference 2. Genome-Scale CRISPR-Cas9 Knockout Screening in Human Cells.

基于CustomArray引物池合成的序列构建的CRISPR-Cas9敲除(GeCKO)文库，利用64,751条特异性引导序列编辑18,080个基因，成功实现后续人源细胞模型上的阳性和阴性筛选。

Science, 2014. IF 41.058



Reference 3. Flexible CRISPR library construction using parallel oligonucleotide retrieval

基于CustomArray引物池技术，建立利用一个高通量合成的引物池，构建多个小规格的CRISPR文库的方法，为后续基因组功能研究等实验提供了更经济、便利的建库方案。

Nucleic Acids Research, 2017. IF 11.561

using standard phosphoramidite chemistry¹⁸⁻²⁰. In addition, CustomArray (now Custom Array) developed semiconductor-based electrochemical acid production to selectively deprotect nucleosides²¹. Many other promising extensions and variations in microfluidic and microarray syntheses have been reported.

The use of microarray-derived oligos, whereby all the oligos synthesized from an array are cleaved and harvested as one oligo pool, has become increasingly popular as a cheap source of designed oligos. The scales, lengths and error rates vary greatly between

Reference 4. Large-scale de novo DNA synthesis: technologies and applications.

以CustomArray半导体技术为代表的引物池合成技术，以更经济的价格，可以应用于调控元件的功能研究与编辑、蛋白编辑、基因调控网络和代谢通路研究等领域。

Nature Methods, 2014. IF 26.919



引物池的订购与使用

引物池的订购方法

金斯瑞独有的半导体芯片技术，可实现1张芯片上合成成千上万条序列的核苷酸链，在序列覆盖率>99%和合成量均一的前提下，为您提供更快速经济的文库构建方案。适用于NGS杂交捕获探针文库、CRISPR sgRNA文库和突变文库构建。

金斯瑞精准引物池合成服务详情

货号	引物长度	芯片容量	周期	价格
SC1966-12	10-200 nt*	12,472条/芯片	1周	低至1分钱/碱基 欢迎询价
SC1966-92		92,918条/芯片	2周	

*170-200 nt及以上请详询

2种规格的芯片可任意组合，无最低起定条数，为您量身定制灵活经济的引物池

可提供目的基因，靶序列信息，由金斯瑞协助文库序列的设计，序列的设计也将交付



仅需三步， 轻松订购您的定制化引物池



引物池的使用指南

您知道吗？很多时候，引物池使用中的问题都是因为实验操作错误造成。

金斯瑞研发团队总结了引物池的使用方法和注意事项，让您的实验更加简单与顺畅！

1. 引物池中每条序列的产量相对单条引物合成小很多，一张12K的芯片中每条全长序列的量通常为飞摩尔 (fmol) 级别。除非特殊情况，**推荐在使用前利用通用序列对引物池进行PCR扩增**，极少数合成失败的序列在这个过程中不会被扩增。扩增后的产物可直接进行后续组装、克隆等操作。
2. 引物池在发货前已经完成纯化，如非特殊应用场景，不需要再额外进行纯化。
3. 对于PCR扩增，推荐使用高保真聚合酶，如Phusion、Q5、KAPA等，不推荐使用普通的Taq酶，扩增体系参考聚合酶供应商的建议。PCR反应程序如下：

Step	Cycles	Temperature (°C)	Time
Initial Denaturation	1	98	30 s
Denaturation	20-30	98	15 s
Annealing		55-72	30 s
Extension		72	30 s
Final extension	1	72	5 min
Hold	1	4	Hold

1) 退火温度与扩增引物、DNA聚合酶种类等有关。扩增引物越长或者Tm值越高，退火温度越高，可根据以往PCR扩增经验确定最终退火温度。若出现非特异性扩增，可适当提高退火温度，较高的退火温度可以提高引物结合特异性；

2) 反应循环数以能够产生足够量的产物为准，若需要的产物较多，可适当提高循环数。

4. 芯片产品的浓度一般为ng/μL级别，PCR扩增的芯片模板加入量为5-100 ng，模板加入量与序列长度、引物条数、引物池中子池 (sub-pool) 的数量有关。引物池中子池的数量越多，每次加入的模板中有效模板越少，可适当增加模板加入量或者提高循环数；若引物池中子池的数量越少，有效模板越多，可适当减少模板加入量或者减少循环数。

5. PCR扩增条件需与具体下游应用相匹配，推荐进行预实验确定最优反应条件：

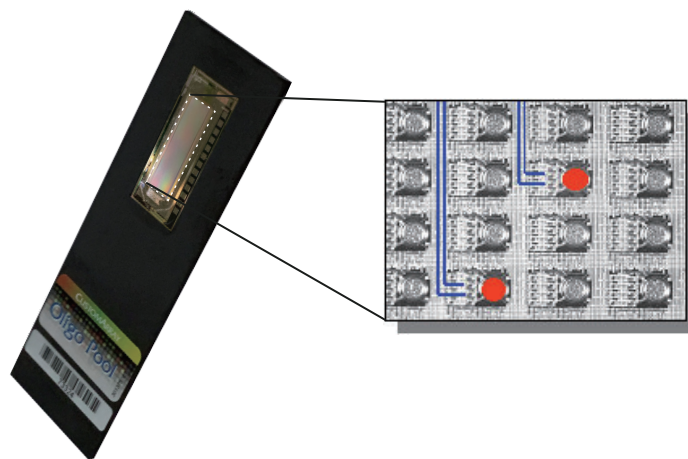
- 1) 建议进行一轮预实验，对模板加入量、PCR循环数等条件进行梯度筛选，以找到最好的PCR条件；
- 2) 具体下游应用要求较高时，建议提高PCR扩增模板用量及降低PCR循环数。

6. 产品扩增完成后可以选择酶切连接或者重组的方式克隆进入目标载体，从而构建DNA的文库。

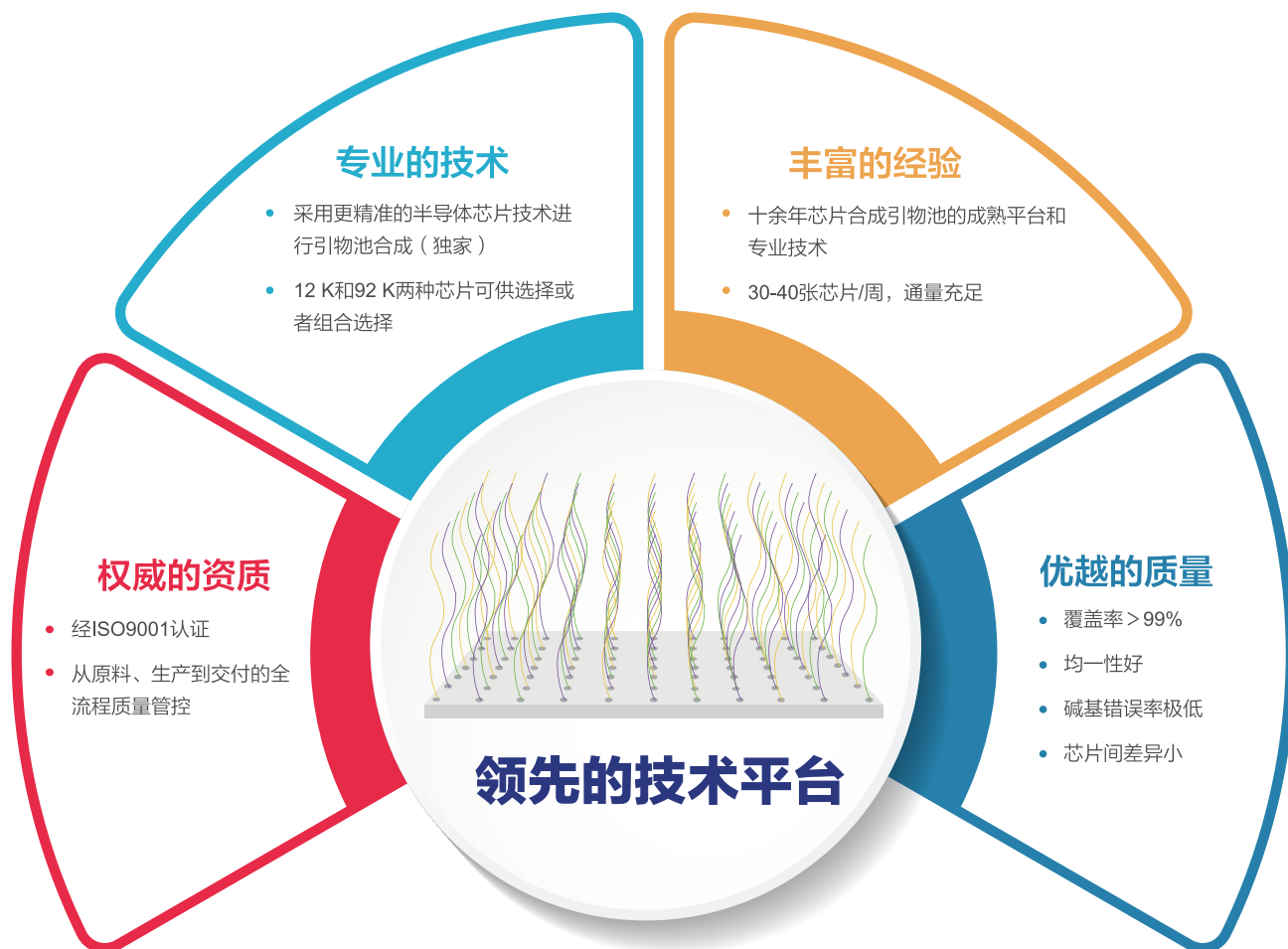
7. 产品保存温度为-20 °C，可根据具体情况分装成若干管，冻存备用，产品的保存温度为-20 °C，尽量减少反复冻融次数。



为什么选择金斯瑞引物池合成服务？



金斯瑞精准引物池合成服务



序列覆盖率 > 99%



序列均一性高



碱基错误率极低



灵活的定制化服务

保证文库容量与质量，提高后续高通量筛选的成功率与效率

严格的质量控制

产品	QC指标	QC方法	QC标准	报告
引物池	产量	UV定量	根据长度, 条数计算	定量报告
	序列长度* (定制化)	PCR扩增后进行PAGE 2100分析仪	序列长度正确无误	PAGE胶图 长度检测报告
	覆盖率, 均一性* (定制化)	NGS	详询	NGS报告

*请详询定制化QC指标

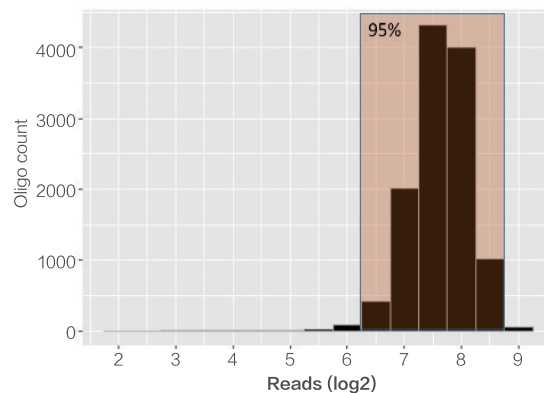
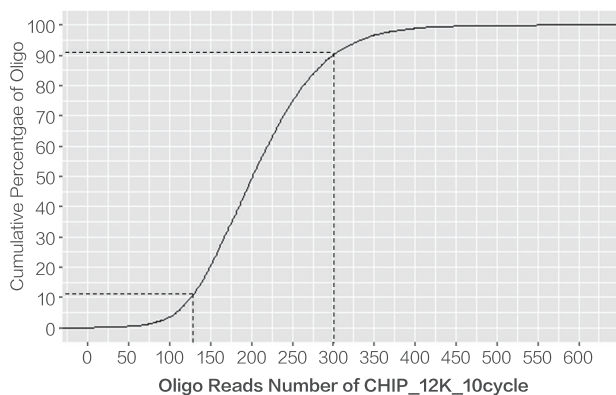
引物池质量控制实例解析



客户订单: 12,000条核苷酸序列的引物池, 长度125 mer

金斯瑞方案: 12 K芯片, 半导体技术合成, 一周内交付, 合成后少量扩增

QC检测结果: 用NGS测序



检测结果:

- ✓ 12,000条自定义Oligo均匀分布
- ✓ 0.27%碱基错误率

- ✓ 99.74%覆盖率
- ✓ 均一度: 90%/10% < 2.5

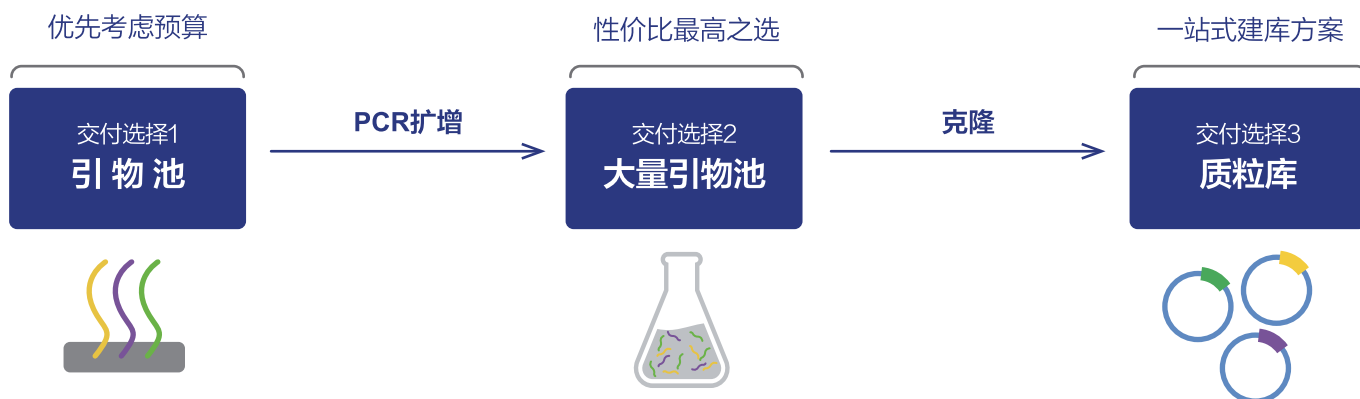
专业灵活的定制化服务



两种规格芯片可选

- 任意选择，自由组合，无最低订购条数
- 当需要12,000+条序列时，不需订购多张12 K芯片，可直订购92 K芯片即可，更经济

三种交付形式可选



*可提供目的基因，靶序列信息，由金斯瑞协助文库序列的设计，序列的设计也将交付

专业贴心的服务为您的项目保驾护航



专属的定制化服务



专业的技术支持团队



一站式建库方案可选

金斯瑞始终以客户的需求为己任，致力于
让先进技术真正走进千千万万的实验室。

更多详情，欢迎访问
www.genscript.com.cn

☎ 400-025-8686-5812/5815

✉ oligo@genscript.com.cn



更多新闻活动，欢迎关注“金斯瑞生物”