

---

# 引物使用说明

---

版本：V1.0  
发布时间：2020 年 9 月

## 目录

引物信息及文档的获取.....	2
合成报告单.....	2
质量检测报告 (COA) .....	2
产品标签.....	2
引物的使用.....	3
引物的状态.....	3
交付形态.....	3
包装形式.....	3
使用方法.....	4
干粉引物的溶解.....	4
液体引物的使用.....	5
引物定量.....	6
合成单位定义.....	6
分子量计算方法.....	6
浓度检测.....	6
定量校准.....	7
引物浓度配置.....	7
缓冲液的体积数.....	7
引物的储存.....	8
常规引物的储存.....	8
荧光标记引物的储存.....	8
引物的相关参数.....	9
长度.....	9
GC 含量.....	9
Tm 值 (溶解温度) .....	9
分子量.....	9
摩尔消光系数.....	9
引物的质量控制.....	11
引物的售后说明.....	12

## 引物信息及文档的获取

为了保证引物的使用效果和质量,在使用合成后的引物时,您通常首先需要考虑引物的状态、所需浓度等。您可从生工生物提供的合成报告单,以及引物实物标签上获得相应的信息。此时,您可按照如下说明进行使用及保存,避免对引物以及后续的实验造成影响。

### 合成报告单

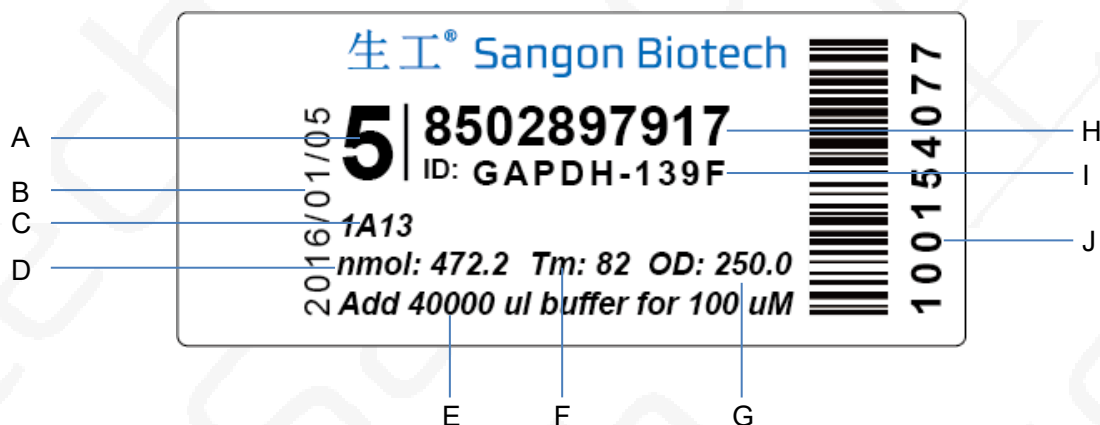
您可以从引物合成报告单上获取本次订单相关的引物产品重要的信息,这些信息可能与您后续的实验应用密切相关。我们推荐您在使用前仔细阅读并确认这些信息。

### 质量检测报告 (COA)

您可以在生工生物官网 ([www.sangon.com](http://www.sangon.com)) “我的合成订单”里查看或下载质量检测报告 (COA),部分检测项目可进一步提供详细检测实验数据和检测设备生成图谱。

### 产品标签

除合成报告单外,产品的标签上显示信息尤为重要,是每一个引物成品独一无二的身份 ID。产品标签图示说明如下:



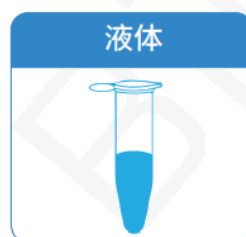
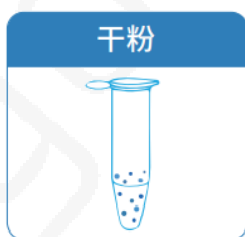
A: 发货区域代码 B: 生产日期 C: 订单序号 (孔盒位号) D: 纳摩尔量 E: 100  $\mu$ M 储存液加液稀释量 F: Tm 值 G: OD 量 H: 订单编号 I: 引物名称 (客户自定义名) J: 批号

## 引物的使用

### 引物的状态

#### 交付形态

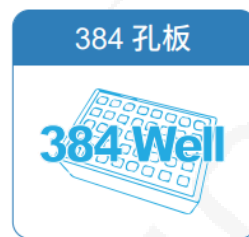
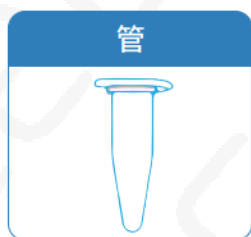
按照交付形态分，生工生物可提供干粉和液体两种形态。



- 引物在干粉状态下能获得 2 年的有效期，经得起长时间的常温运输及保存，且很容易进行重新溶解。
- 专用的引物稀释液可以保证在  $-20^{\circ}\text{C}$  下获得 6 个月的有效期限，液体浓度为  $10/100\ \mu\text{M}$ ，可以作为 PCR 实验工作液和储存液。

#### 包装形式

按照包装形式，可分为离心管或螺旋盖保存管分装、96 孔深孔板以及 384 孔微孔板三种分装方式。



- 使用离心管或螺旋盖保存管分装，多管订购按数量分别使用自封袋、20 孔、40 孔或 80 孔离心管盒进一步包装。
- 使用 96 孔深孔板，自动移液工作站分装，铝箔盖机器封板，安全可靠。
- 使用 384 孔微孔板，自动移液工作站分装，铝箔盖机器封板，安全可靠。

## 使用方法

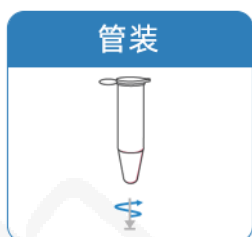
**⚠ 重要提示:** 如果您收到的是干粉引物, 在执行下列操作前切勿开盖, 以免干粉散失。

### 干粉引物的溶解

#### 1. 打开前请先离心

由于干粉 Oligo DNA 呈很轻的干膜状附在管/孔壁上, 打开前离心可防止散失。当您拿到新合成的引物后, 首先需要进行离心, 将粉末离心回管底且离心管保持完好。

推荐离心条件:



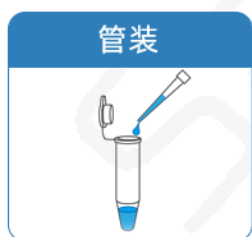
- 使用桌面型离心机 4,000 rpm, 30~60 s。



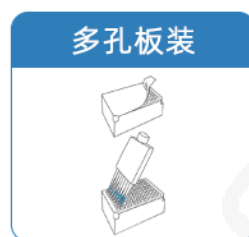
- 使用多孔板离心机 4,000 rpm, 30~60 s。

#### 2. 引物溶解

打开并加入缓冲溶液<sup>1</sup> (推荐加入量参见引物合成报告对应项或产品标签)



- 小心轻柔打开管盖, 加入缓冲溶液<sup>1</sup>。



- 底部固定在水平桌面上, 从多孔板四角揭开铝箔封膜, 加入缓冲溶液<sup>1</sup>并吹打混匀。

#### 备注 1:

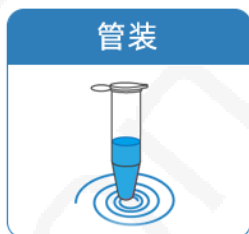
推荐使用 TE Buffer, 您可以购买我们的成品 (产品编号 B541019 TE 缓冲液, 1X, 低 EDTA, pH 8.0), 也可以自行配置 (组分为 10 mM Tris, 0.1 mM, pH 8.0)。

理论上, 使用无核酸酶的水溶解引物是可以的, 但因其 pH 很难保持稳定在  $\text{pH} \geq 7.0$ , 故非常不推荐, 说明如下:

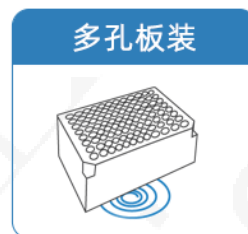
DEPC (焦碳酸二乙酯) 能够与 RNase 的活性基团进行反应从而抑制其活性, 用来防止 RNA 降解。而常规的引物属于单链 DNA, 因此是没有必要用到 DEPC 的, 并且, DEPC 在高温高压处理时能够降解产生  $\text{CO}_2$ , 降低水的 pH 值, 对 DNA 的保存是不利的。所以不推荐使用 DEPC 水溶解引物, 除非您的后续反应体系中有 RNA 参与 (如配制逆转录引物)。qPCR

过程也不推荐使用 DEPC 水, 因为到 qPCR 步骤时, 抽提的 RNA 已经经过了逆转录转变为 cDNA, qPCR 体系已经跟 RNA 没有任何关系了。

### 3. 混匀



- 重新盖上盖, 放置于旋涡震荡仪上充分混匀。



- 接上一步充分吹打混匀。

### 4. 保存

暂时不用或长期储存请放入  $-20^{\circ}\text{C}$  冷冻, 并做适当分装以减少冻融次数。



### 液体引物的使用

生工生物可提供  $100\ \mu\text{M}$  或  $10\ \text{pM}$  两种浓度液体引物, 您可以直接作为储存液或工作液使用, 也可以根据自己的实验要求自行调整浓度。仍推荐使用 TE Bufer 来进行浓度的稀释调整。

## 引物定量

生工生物引物 DNA 采用多种定量方式, 提供以 OD 和 nmol 为单位的合成量, 主要是以 OD<sub>260</sub> 值来计算的。您可以根据自己的习惯或实际需求灵活选择。引物合成订购表及官网引物合成订购界面均会提供两种单位定义下可提供的合成量。

### 合成单位定义

**OD 单位:** 指在 1 ml 体积 1 cm 光程标准比色皿中, 260 nm 波长下吸光度为 1 的 Oligo 溶液定义为 1 OD<sub>260</sub> 单位。对于常规单链 DNA, 1 OD≈33 μg。

**nmol 单位:** 摩尔是表示物质的量的单位, 每摩尔含有阿伏加德罗常数个物质。1 摩尔等于 10 的 9 次方纳摩尔。

**OD 与 nmol 转换关系:** nmol/OD=10<sup>9</sup>/ 摩尔消光系数, 对于长度 20 mer 的引物, 1 OD≈5 nmol。

### 分子量计算方法

$$MW = (A \times 313.209) + (C \times 289.184) + (G \times 329.208) + (T \times 304.196) - 61.964$$

ACGT 代表各自核苷酸残基的数量

例: CTTAGGAGTGAAGGAGG

A=6 C=1 G=8 T=3

$$MW = (6 \times 313.209) + (1 \times 289.184) + (8 \times 329.208) + (3 \times 304.196) - 61.964 = 5652.726$$

**⚠ 重要提示:** 成品干粉引物的试剂产量和订购量存在一定范围的误差, 此误差对常规使用效果没有影响。如您对浓度精确度要求较高, 可在引物溶解稀释后进行再次定量校准。请按下面两个步骤分别进行浓度检测和定量校准。

### 浓度检测

首先将干粉引物按正确的方式加入合成报告单或产品标签上的推荐 TE Buffer 量溶解稀释成 100 μM 储存溶液。使用分光光度计(推荐使用 Thermo fisher NanoDrop 系列)检测得到 260 nm 下的吸光值, 通过朗博比尔定律计算得到 DNA 浓度。计算公式如下:

$$C = A / (\epsilon b)$$

C: 浓度 (M, mole/L) A: DNA 在 260 nm 处测量到的吸光值 ε: DNA 在 260 nm 处的摩尔消光系数  
b: 光程

例: 消光系数= 227,200 (L/(mole·cm)), A=62.5

$$C = 62.5 / (227200(L/(mole \cdot cm)) \times (1 \text{ cm}))$$

$$C = 0.000275 \text{ M} = 275 \mu\text{M}$$

消光系数可使用生工生物官网在线 Oligo 分析器(链接地址: [www.sangon.com/baseCalculator](http://www.sangon.com/baseCalculator))快速获得。选择相应的修饰, 点击计算, 在 EXTINCTION COEFFICIENT 行可以看到消光系数的数值。

使用 Thermo fisher NanoDrop 系列分光光度计测量的结果, 光程按照 1 cm 进行计算。在 260 nm 处的吸光值需要小于等于 62.5, 为了获得更精确的效果, 在 260 nm 处的吸光值最好小于等于 12.5。

### 定量校准

1. 第一种情况: 实际浓度检测值高于理论值校准到 100  $\mu\text{M}$  储存液的方法  
请按下面公式计算得到的量再次加入 TE Buffer 进行定量校准

$$x = ((c - 100) / 100) y$$

x: 再次加入的 TE buffer 的体积 ( $\mu\text{l}$ ) c: 实际测量到的 DNA 浓度的数值

y: 按照合成报告单或产品标签上的推荐 TE Buffer 体积

例:  $c = 110$ ,  $y = 100 \mu\text{l}$

$$x = ((110 - 100) / 100) \times 100 \mu\text{l} = 10 \mu\text{l}$$

2. 第二种情况: 实际浓度检测值低于理论值校准到 10  $\mu\text{M}$  工作液的方法  
请按下面公式计算得到的量再次加入 TE Buffer 进行定量校准

$$x = ((c - 10) / 10) y$$

x: 再次加入的 TE buffer 的体积 ( $\mu\text{l}$ ) c: 实际测量到的 DNA 浓度的数值

y: 按照合成报告单或产品标签上的推荐 TE Buffer 体积

例:  $c = 90$ ,  $y = 100 \mu\text{l}$

$$x = ((90 - 10) / 10) \times 100 \mu\text{l} = 800 \mu\text{l}$$

### 引物浓度配置

实际上, 引物在不同的浓度范围内都是比较稳定的, 配制的浓度可以由您根据自己的实验要求自行决定, 但总体上浓度不要低于 1  $\mu\text{M}$ 、不要高于 10 mM。我们推荐的标准储存液浓度为 100  $\mu\text{M}$ , 这个储存液可以很方便地配成各种不同浓度的工作液, 比如常规 PCR 引物只需储存液再稀释 10 倍即可。

### 缓冲液的体积数

每一条引物由于序列与合成分装量的不同, 添加缓冲液的体积是不一样的, 根据引物的摩尔消光系数, 我们能够计算出 1 OD 的引物含有多少分子数 (nmole), 比如一条引物:

序列为: TACTCTTCTCTGGAGCGGC

消光系数为: 177700 L/(mole·cm)

根据简单换算可以得到 1 OD 的该引物含量为 5.63 nmole, 配成 100  $\mu\text{M}$  的母液需要加 56  $\mu\text{l}$  缓冲液。如果合成 2 OD 该引物分装在一管中, 则要添加 112  $\mu\text{l}$  缓冲液。

实际上您不需要自己进行计算, 按照引物合成报告单以及管子上的标签进行配制即可。



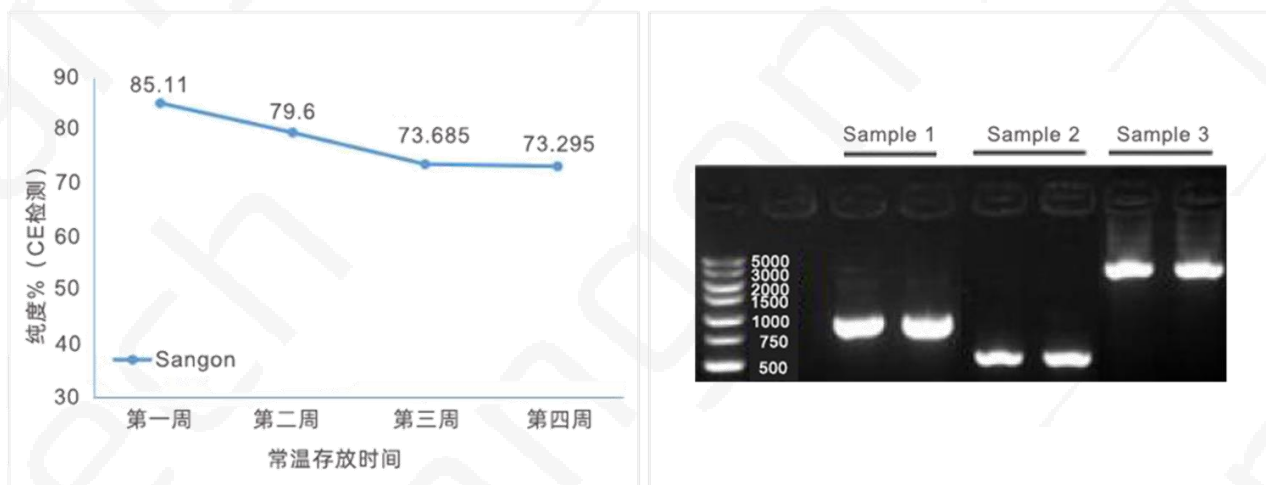
## 引物的储存

**⚠️ 重要提示:** 应尽量避免溶解后的引物反复冻融, 我们强烈建议将储存液 (100 μM) 小量多管储存于 -20°C 即取即用。如短期内使用, 也可稀释成工作液 (10 μM) 临时保存于 4°C。

### 常规引物的储存

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

如意外将溶解好的引物放在常温实验台过了好多天, 虽此时引物有降解, 但对于大多数常规 PCR 扩增实验并没有太大影响, 可以通过小量预实验先验证一下引物的功能。



左图是生工生物的引物以 TE Buffer 溶解后在室温条件下放置四周的纯度检测, 可以看出虽然一个月之后引物的纯度有所下降, 但还是维持在比较高的范围内。右图是第四周结束后使用该引物进行不同产物大小的 PCR 扩增, 发现均可以顺利地扩增出目的条带。

### 荧光标记引物的储存

对于有荧光标记的引物, 如 Taqman® 探针, 还需要做额外的避光处理。通常情况下, TE 储存的荧光标记 Oligo 在 -20°C 储存两年后, 荧光信号值会下降 20%。对于荧光标记引物, 尤其是 Cy 系列及 FAM 荧光基团, 必须使用棕色离心管进行避光处理, 生工的所有荧光标记引物均采用了这种避光离心管。如果配制工作液时没有这种管, 可以用锡箔将工作液管完全包裹以避免长时间的光漂白作用。

## 引物的相关参数

以下介绍以 FAM-ATATTCGTAC-BHQ1 链为例:

### 长度

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

### GC 含量

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

### Tm 值(熔解温度)

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

$$T_m(K) = \frac{\Delta H}{\Delta S + R \times \ln[\text{Oligo}]}$$
$$\frac{1}{T_m^*} = \frac{1}{T_m(K)} + (4.29 \times f^{GC} - 3.95) \times 10^{-5} \times \ln[\text{Na}^+] + 9.40 \times 10^{-6} \times \ln^2[\text{Na}^+]$$

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

注意:

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

### 分子量

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

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

算式中 ACGT 指引物中相应碱基的数量。

按照此算法,案例中的引物的分子量为  $MW = (3 \times 313.209) + (2 \times 289.184) + (1 \times 329.208) + (4 \times 304.196) - 61.964 + 537.6 (\text{FAM}) + 554.5 (\text{BHQ1}) = 4094.15 \text{ g/mol}$ 。

### 摩尔消光系数

摩尔消光系数( $\epsilon_{260}$ )是指 1 摩尔寡核苷酸链水溶液在 260 nm 处的吸光值。该数值决定了寡核苷酸链质量与合成 OD 数的关系。组成碱基种类随机的情况下,可以近似认为 DNA 双链 1 OD 的量为 50  $\mu\text{g}$ ,单链寡核苷酸 1 OD 的量为 33  $\mu\text{g}$ 。但对于客户定制的寡核苷酸链,需要根据序列进行计算。生工生物采用最近邻

二态模型进行消光系数的计算, 参考数据为 Michael 于 2003 年发表于《Nucleic Acids Research》的文章 (DOI: 10.1093/nar/gnh015)。

算法公式:

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

其中  $\epsilon_{\text{NN}}$  是相邻两个核苷酸的综合摩尔消光系数,  $\epsilon_{\text{N}}$  是单碱基的摩尔消光系数,  $\epsilon_{\text{mod}}$  是修饰基团的摩尔消光系数。

## 引物的质量控制

生工生物采用了 3D 封闭式质控措施，分别在产成品 QC 质检、内部质量防控和定期质量跟踪三个维度进行闭环管理。我们拥有多达 13 项质量检测指标，包含 2 项标准 QC 检测及 11 项定制/内控 QC 检测。

项目名	简称/代码	单位	简要说明	适用范围
<b>标准 QC</b>				
外观	Appearance	P/F	是否存在杂质等情况	全系
分子量误差	MW	%	引物总量是否准确	
<b>定制/内控 QC</b>				
HPLC 纯度	Purity (HPLC)	%	引物的纯度是否满足 对应标准	全系
CE 纯度	Purity (CE)	%		
PAGE 纯度	Purity (PAGE)	%		
定量误差	CQA	%	引物总量是准确	
荧光激发波长	Ex	nm	荧光修饰引物的激发/ 发射光谱波长是否正 常	荧光修饰引物、 qPCR 探针
荧光发射波长	Em	nm		
荧光值酶切增量	FLU	P/F	TaqMan 探针、分子 信标等常规双标记引 物的荧光、淬灭基团 功能是否正常	双标记 qPCR 探针、 分子信标
阳性模板对照检测	PTC	P/F	qPCR 引物探针是否 有正常的阳性靶标检 测功能及其在扩增阳 性靶标时体现的荧光 值是否在正常范围内	qPCR 引物及探针
人源污染检测	HSC	P/F	引物是否污染人源基 因组 DNA	
无模板对照检测	NTC	P/F	qPCR 引物探针在无 模板体系中是否会体 现出不正常的扩增信 号	
交叉污染率	CCR	%	不同引物之间的交叉 污染概率	

## 引物的售后说明

如发现引物存在质量疑问, 请于到货后一个月内向我公司总部或当地销售网点提出, 并请不要在引物使用完或快要使用完时提出, 以备公司回收产品, 确认引物质量。如确属质量问题, 本公司将免费为您重新合成。发生索赔事宜, 本公司将在该索赔引物价格范围内酌情赔偿, 恕不受理超出该赔偿引物价格之赔偿。