



Takara Oligo合成手册
2024版

that's
GOOD
science!™

Clontech **Takara** cellartis

目录

Oligo合成业务介绍

02

Oligo合成技术说明

03

- 合成原理说明 03
- 纯化方法介绍 04
- 纯化方法选择 04

客户服务

05

- Real Time PCR用引物探针设计服务 05
- Oligo合成种类 06
 - ◆ DNA、RNA修饰 06
 - ◆ 双标记MGB-E探针 10
 - ◆ Locked Nucleic Acid 11
 - ◆ NGS Oligo 12
 - ◆ 长链RNA的合成 12
 - ◆ 双淬灭探针的合成 13
- 相关信息 14
 - ◆ 相关染料的光谱学性质与数据 14

IVD客户定制服务

15

- 认证体系 15
- 相关法规要求 15
- 包装定制、检测小样 16
- 保存稳定性数据 17
- 防污染 17

Oligo定量说明

18

常见问题解答

20

Takara公司已有三十多年合成Oligo DNA/RNA历史，特别是在各种修饰与标记DNA/RNA的合成方面积累了丰富的经验。

我们采用国际上先进的合成技术，使用高质量的合成试剂，对应不同的检测应用建立起一系列防污染措施，严格按照国家标准生产各种纯化级别的制品。采用ISO质量管理体系，严格管理整个生产过程，执行高标准的质量控制，保证产品质量。

- ☆ 原料控制：所有合成用重要原料均采购自国外知名供应商，全球采购系统从源头上进行了有效的保障，并对重要原料建立了完善的来源检查方法和标准；
- ☆ 生产过程控制：按照ISO标准化管理，全程按照受控文件作业，合成中心全部实施5S管理；
- ☆ 质量控制：完善的QC检测流程及标准，除了对最终产品进行ESI-Mass、HPLC、PAGE、OD定量以及外观检查外，在生产过程中还进行必要的IPQC，有效控制批间差，确保质量持续稳定；
- ☆ 认证体系：宝生物工程（大连）有限公司于2015年1月5日通过ISO9001认证，于2019年3月26日通过ISO13485认证；
- ☆ 客户支持：Takara致力于生命科学研究和诊断相关产品的研发和生产，依托强大的技术团队和多年以来丰富的Oligo合成服务经验，给国内外客户提供优质的售前和售后支持。

目前合成的修饰品种多达200多种，并且还在不断的增加中。除了普通的测序引物、PCR & qPCR的引物探针合成等，还提供合成NGS测序引物、FISH探针、Locked Nucleic Acid、MGB-E修饰双标记探针，以及双淬灭探针等。

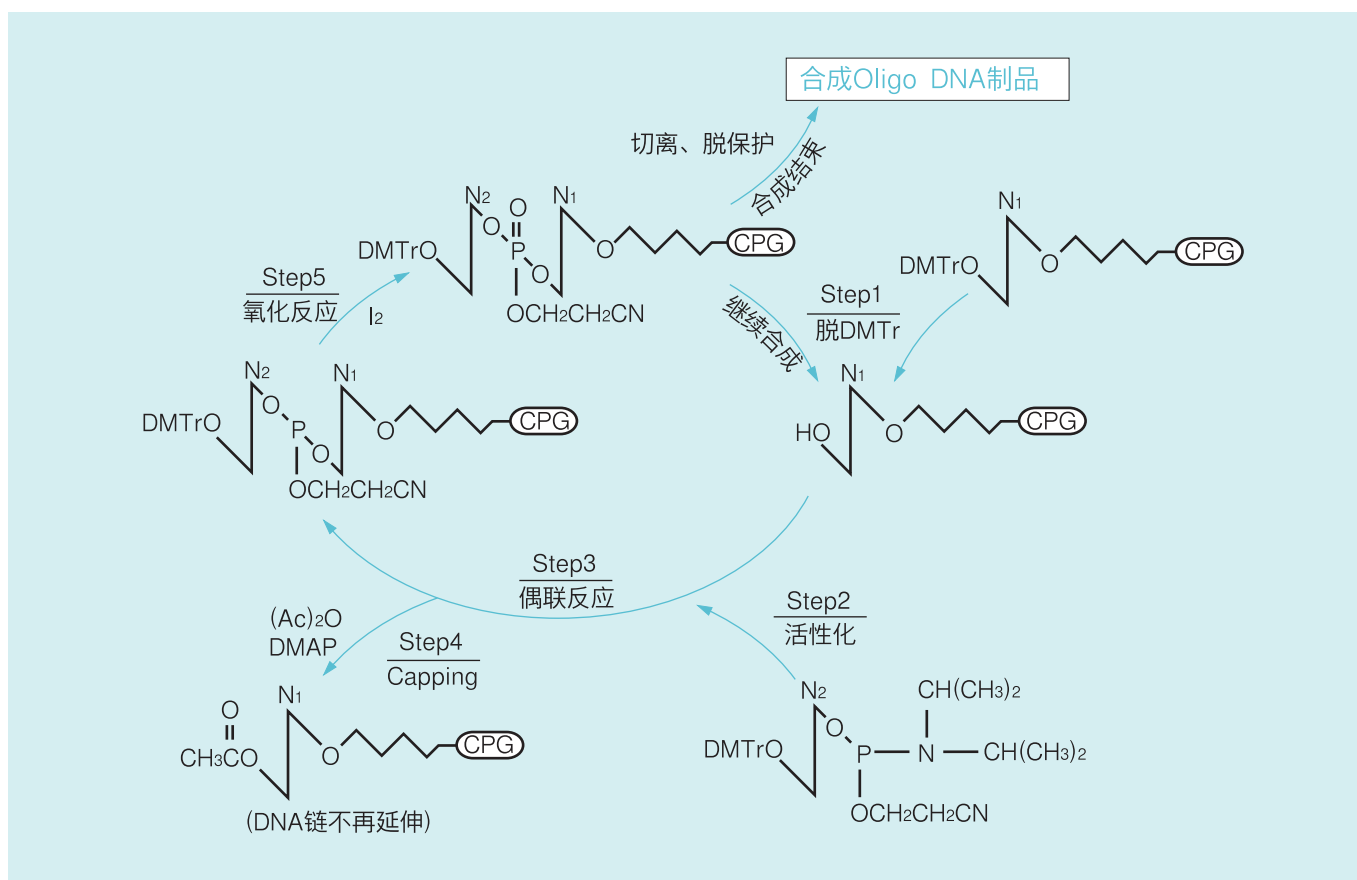
Takara公司推出定制化生产线，提供定制合成服务。可将HRP（辣根过氧化物酶）及人工合成多肽连接到Oligo DNA链上，解决了rApp修饰接头标记效率低等问题。提供高质量的small RNA高通量测序文库腺苷酸化接头。G丰富序列，甚或Poly G序列等，我们也能提供有效的解决方案。



■ 合成原理说明

Oligo DNA的人工化学合成始于50年代初期，1980年，全自动的固相DNA合成仪面市后，使得快速、高效合成Oligo DNA成为可能，这大大地推动了生物工程技术的蓬勃发展。现在一般都采用 β -乙腈亚磷酰胺化学合成Oligo DNA，合成时从3' \rightarrow 5' 方向进行，通常3' 端的第一个碱基结合在Glass担体(Controlled Pore Glass, CPG)上。合成的详细过程见下图，现简要说明如下：

1. Step1: 脱掉附加在CPG担体上的第一个碱基5' -OH基团上的保护基 (DMTr)，准备附加下一个新的碱基；
2. Step2: 活化新的碱基单体 (Phosphoramidite)，准备与第一个碱基进行反应；
3. Step3: 第二个碱基与第一个碱基发生偶联反应；
4. Step4: 将没有反应的第一个碱基的5' -OH加帽封死 (Capping)，使其不再进一步参与反应；
5. Step5: 将核苷亚磷酸酯氧化成更稳定的核苷磷酸酯 (即将三价磷氧化成五价磷)；
6. 重复进行Step1~Step5的循环，直至合成完所需的Oligo DNA序列；
7. 合成结束后，将Oligo DNA分子从CPG上切下，再进行进一步的纯化。



Oligo DNA合成原理。N1代表第一个碱基，N2代表第二个碱基，依此类推。

■ 纯化方法介绍

纯化方法	基本介绍	特点
DSL	通过气相氨解的方法，将连接在CPG上的引物切割洗脱下来，并脱除保护基，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，纯度完全依赖于合成的效果。	速度快，价格低，多用于PCR以及测序和合成基因
OPC	利用合成后的目的DNA的5'端DMT基团对C18树脂强吸附性、而不含DMT基团的短链DNA不被吸附的特性，从而达到分离纯化的目的。	速度快 价格低
PAGE	使用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳，对DNA片段进行分离，然后从凝胶中回收目的DNA。同时100%进行质谱检测，保证回收的DNA的正确性。	质量稳定 准确度高
HPLC	使用高效液相色谱的原理，依据DNA的片段大小、疏水性或者所带电荷不同来进行分离纯化。是一种广泛而且非常有效的纯化方式，具有高的纯度和灵敏度。纯化过程中配合质谱进行定性分析，保证序列的正确性。	自动化程度高 纯度好

■ 纯化方法选择

应用	DSL	OPC	PAGE	HPLC
常规PCR和RT PCR	✓	✓		
测序用引物	✓	✓		
siRNA筛选	✓	✓		
基因芯片	✓	✓	✓	✓
qPCR用探针			✓	✓
克隆			✓	✓
反义核酸			✓	✓
生物工程			✓	✓
晶体学研究，NMR			✓	✓
体外诊断				✓
点突变		✓	✓	
高通量测序（NGS）			✓	✓
全基因合成	✓	✓	✓	

Real Time PCR用引物探针设计服务

本公司拥有专业的技术人员，对于在我公司合成的客户提供引物、探针设计服务。

本公司对NCBI Data Base上登录的Human、Mouse、Rat、Cow、Dog、Chicken、Arabidopsis、Oryza的RefSeq的绝大部分mRNA序列提供引物设计及合成服务。

本服务的引物设计条件*1具有如下特长：

- 适合Takara Real Time系列产品使用。
- 不易形成引物二聚体。
- 通常引物设计在exon junction上，使genomic DNA的扩增难以进行*2。
- 可根据实验目的，自主选择设计的区域。

通常一个目的基因提供1对引物：

- ① 根据目的基因的全序列设计。
- ② 在3'端开始的1,500 Base内设计（用Oligo dT Primer进行反转录时使用）。

*1 以上设计条件尽量同时满足，不能同时满足时，本公司将利用特别开发的技巧规则，按各种条件的优先顺序进行选择。

*2 如果所研究的目的基因上没有exon junction，或即使有exon junction，在exon junction上设计的引物不适合模板扩增，此时引物不在exon junction上设计。

本公司同时承接Human、Mouse、Rat、Cow、Dog、Chicken、Arabidopsis、Oryza以外的生物种以及对RefSeq之外的基因信息或客户独自拥有的序列进行引物设计合成服务。

另外，还承接对采用双标记荧光探针法进行Real Time PCR所使用的引物、探针的设计合成服务。LncRNA和circRNA的引物设计合成服务，MGB-E、Locked Nucleic Acid(LNA)等探针设计服务。对于SNP检测或设计条件不佳的情况，可以通过修饰MGB-E或Locked Nucleic Acid(LNA)来缩短探针长度，获得具有较为理想Tm值的探针，满足客户更为多样的需求。

设计业务委托请联络当地代理商。

设计业务技术支持联络方式见封底。

为方便客户自主选择设计引物/探针，Takara qPCR引物/探针设计工具在Takara公司网站上线，订购Takara的重点qPCR产品，可免费使用Perfect Real Time Support System (PRTSS) 进行引物/探针设计，每个qPCR产品免费设计一次，获得一个基因的引物或引物探针。详细信息请浏览Takara公司网站主页。



使用提供的引物/探针，利用本公司的Real Time PCR试剂和推荐的标准反应条件，可以得到理想的实验结果，无需进行Mg²⁺浓度和退火温度等反应条件优化实验。

■ Oligo合成种类

◆ DNA、RNA修饰

○ 普通DNA

1. 常规序列DNA (10~59 mer)
2. 长链DNA (60~150 mer)
3. 环化DNA (40~80 mer)
4. 短链DNA (4~9 mer)

○ Reverse DNA

Inverted dA (G、C、T) (10~50 mer)

○ 普通RNA

常规序列RNA (2~110 mer)

○ siRNA

单链RNA (冻结干燥品)；双链RNA (Annealing后的制品冻结溶液，可直接用于转染)。

○ 双标记探针

1. 分子信标

5' 标记	3' 标记
FAM,TET,VIC-X,JOE,HEX,TAMRA,ROX,Cyanine 5	DABCYL/BHQ

2. 双标记荧光探针

5' 标记	3' 标记
FAM,TET,VIC-X,JOE,HEX	TAMRA
FAM,TET,VIC-X,JOE,HEX	BHQ1
TAMRA,ROX,Texas Red,Cyanine 3,Cyanine 5	BHQ2
Cyanine 5	BHQ3

3. 双标记MGB-X荧光探针

5' 标记	3' 标记
FAM,TET,VIC-X,JOE,HEX,TAMRA,ROX,Cyanine 3,Cyanine 5	MGB-E

○ 双淬灭探针

5' 标记	3' 标记
FAM,HEX	DQ1
ROX,Cyanine 5	DQ2

○ 修饰DNA

1. S代修饰 (Phosphorothioates bonds):

可提供HPLC、PAGE、OPC和DSL级产品，OPC纯化可提供80%以上纯度。本公司可提供“克”级OPC纯化DNA的合成服务。

2. NH₂修饰 (Amine Modifiers):

NH₂-Oligo可以用于各种oligo修饰或固相结合，使用Amino C6 dT和Uni-Link NH₂可以在Oligo中间引入活泼氨基。

种类	代码	5'	3'	Internal
NH ₂ C3	(NH ₂ C3)	—	✓	—
NH ₂ C6	(NH ₂)	✓	✓	—
NH ₂ C7	(NH ₂ C7)	—	✓	—
NH ₂ C6 dT	(T-NH ₂)	✓	✓	✓
NH ₂ C12	(NH ₂ C12)	✓	—	—
Uni-Link NH ₂	(NH ₂)	—	—	✓

3. 连接臂 (Spacer) :

Spacer提供必要的间隔以增加相应的官能团与寡核苷酸间的距离。dSpacer 可以引入一个无碱基位点。3'-Spacer用于阻止3'端外切酶和3'端聚合酶发挥作用。Spacer 18为18个原子的六乙二醇，常用于引进一个强疏水基团。

种类	代码	5'	3'	Internal
Spacer C3	(Spacer C3)	✓	✓	✓
Spacer 9	(Spacer 9)	✓	✓	✓
Spacer 12	(Spacer 12)	✓	✓	✓
Spacer 18	(Spacer 18)	✓	✓	✓
dSpacer	(dSpacer)	✓	✓	✓

4. PO₄ (Phosphorylation) 修饰、SH (Thiolation) 等修饰:

作为DNA连接酶的底物使用时，需要进行5'磷酸化；3'磷酸化用于阻止3'核酸外切酶的分解，以及阻止DNA聚合酶引起的延伸。Thiol (巯基) 可以使各种荧光基团、非荧光基团或固相表面与寡核苷酸结合，由于Thiol基团容易被氧化，使用前请用二硫苏糖醇 (DTT)或者磷酸三氯乙酯 (TCEP)将其还原。建议订购二硫键形式的Oligo，使用前进行还原，还原后马上使用。使用TCEP还原的可以直接进行后续实验，不必除去。

种类	代码	5'	3'	Internal
Phosphorylation (磷酸化)	(PO ₄)	✓	✓	—
SH C6	(SH)	✓	—	—
SH 6	(SH)	—	✓	—
SH C3	(SH C3)	—	✓	—
S-S 6	(S-S)	—	✓	—
S-S C6	(S-S)	✓	—	—
S-S C3	(S-S C3)	—	✓	—
Dithiol (二硫化物)	(Dithiol)	✓	✓	✓
COOH (羧基)	(COOH)	✓	—	—
Alkyne (炔基)	(Alkyne)	✓	✓	—
Azide (叠氮)	(Azide)	✓	✓	—
Aldehyde (醛基)	(Aldehyde)	✓	—	—
Acrydite (丙烯酰胺)	(Acrydite)	✓	—	—

5. 修饰碱基:

dl(脱氧次黄嘌呤)是存在于自然界的碱基,不是真正意义上的通用碱基。dl与各碱基会形成较弱的氢键,其结合能力不一致,存在差异,具体为dl:dC>dl:dA>dl:dG>dl:dT。

在序列中引入甲基化RNA碱基,会使RNA:RNA双链的T_m值增大,但RNA:DNA的稳定性不会产生较大变化,对核酸内切酶具有抗性,常用于反义核酸中。

5-Methyl-dC可以代替dC碱基使用,平均每个可使T_m值上升0.5°C。

2-氨基嘌呤可以代替dA使用,是对环境敏感的天然荧光碱基,使T_m值略微降低。

Iso-dC与Iso-dG分别为胞嘧啶与鸟嘌呤的化学突变体。Iso-dC可与Iso-dG结合,但是不与dG碱基结合,同样,Iso-dG亦然,引入此类碱基可以合成高特异性的寡核苷酸。

硫代磷酸酯(PS)键是将寡核苷酸中磷酸基骨架的游离氧原子替换为硫原子,可提供核酸酶抗性。在5'或者3'末端的3-5'个寡核苷酸中插入,即可以阻止核酸外切酶引起的寡核苷酸分解。

种类	代码	5'	3'	Internal
DeoxyInosine (脱氧次黄嘌呤)	I	✓	✓	✓
DeoxyUridine (脱氧尿嘧啶)	U	✓	✓	✓
2'-O-Methyl RNA(甲基化RNA)	mA,mU,mG,mC	✓	✓	✓
5-Methyl-dC	(5mC)	✓	✓	✓
5-Hydroxymethyl dC	(5hmC)	✓	✓	✓
5-F-dU	(5-F-dU)	✓	✓	✓
5-Br-dU	(5-Br-dU)	✓	✓	✓
5-I-dU	(5-I-dU)	✓	✓	✓
Iso dC	(iso dC)	✓	✓	✓
Iso dG	(iso-dG)	✓	✓	✓
O6-Me-dG	(O6-Me-dG)	✓	✓	✓
2-Aminopurine (2-氨基嘌呤)	(2-aminopurine)	✓	✓	✓
8-OXO-dA	(8-oxo-dA)	✓	✓	✓
2',3' ddT	(ddT)	✓	—	—
2',3' ddA	(ddA)	✓	—	—
2',3' ddC	(ddC)	✓	✓	—
Ferrocene-dT	(T-Ferrocene)	—	—	✓
Inverted dT (G、C、A)	(Inverted dT)	✓	✓	✓
Adenylation	(rApp)	✓	—	—
5-CHO-dC	(5-CHO-dC)	✓	✓	✓
N6-Me-dA	(N6-Me-dA)	✓	✓	✓
1-Me-dA	(N1-Me-dA)	✓	✓	✓
Locked Nucleic Acid T (G、C、A)	+T(+G、+C、+A)	✓	✓	✓
Phosphorothioate Bond (硫代磷酸酯键)	*	✓	✓	✓

6. 单标修饰

种类	代码	5'	3'	Internal
Alexa Fluor 488	(Alexa 488)	✓	✓	—
ATTO 488	(ATTO 488)	✓	✓	—
Biotin	(Biotin)	✓	✓	—
Biotin TEG	(Biotin TEG)	✓	✓	—
Dual Biotin	(Dual Biotin)	✓	—	—
Bodipy 493/503	(Bodipy493/503)	✓	✓	—
Bodipy 650/665	(Bodipy 650/665)	✓	—	—
Cyanine 3	(Cyanine 3)	✓	✓	—
Cyanine 5	(Cyanine 5)	✓	✓	—
Cyanine 5.5	(Cyanine 5.5)	✓	✓	—
Dabcyl	(Dabcyl)	✓	✓	—
DEA (Diethylaminocoumarin)	(DEA)	✓	✓	—
Digoxin	(Digoxin)	✓	✓	—
DyLight 680	(DyLight 680)	✓	✓	—
DyLight 750	(DyLight 750)	✓	✓	—
DyLight 800	(DyLight 800)	✓	✓	—
FITC	(FITC)	✓	✓	—
6-FAM	(FAM)	✓	✓	—
HEX	(HEX)	✓	✓	—
JOE	(JOE)	✓	✓	—
Methylene Blue	(MB)	✓	✓	—
NAP (Naphthofluorescein)	(NAP)	✓	✓	—
NBD	(NBD)	✓	✓	—
Pyrene	(Pyrene)	✓	✓	—
Rhodamine B	(Rhodamine B)	✓	✓	—
Rhodamine Green	(Rhodamine Green)	✓	✓	—
ROX (X-rhodamine)	(ROX)	✓	✓	—
TAMRA (Tetramethylrhodamine)	(TAMRA)	✓	✓	—
TET	(TET)	✓	✓	—
Texas Red-X	(Texas Red-X)	✓	✓	—
Texas Red (Sulforhodamine 101)	(Texas Red)	✓	✓	—
Cholesterol (胆固醇)	(Cholesterol)	✓	✓	—
Azobenzene (偶氮苯)	(Azobenzene)	✓	✓	✓
HRP	(HRP)	✓	✓	—
Ce6	(Ce6)	✓	✓	✓
Hemin	(Hemin)	✓	✓	✓
Puromycin	(Puromycin)	—	✓	—
SMCC	(SMCC)	✓	✓	✓
PC Linker	(PC-linker)	—	—	✓
Circle DNA	—	—	—	—

* 修饰种类在不断增加，还可以对客户提供的试剂进行定制服务。

◆ 双标记MGB-E探针

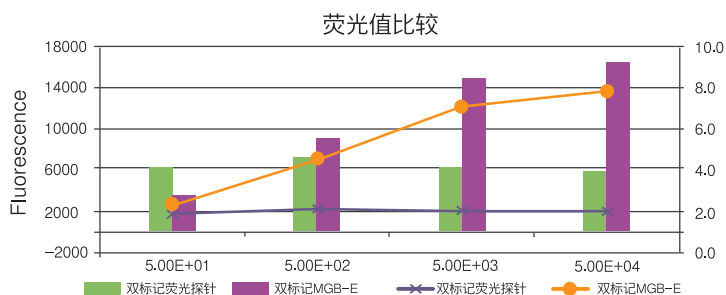
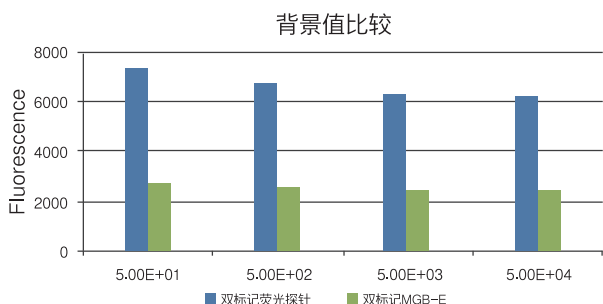
双标记MGB-E探针，在3'末端结合了MGB-E，其与DNA的双螺旋的小沟契合，通过结合DNA双螺旋结构的稳定性来提高杂交的稳定性和准确性。该探针5'末端包含一个报告基团，3'末端使用非荧光淬灭剂，大大降低了荧光本底，提高了反应的灵敏性，同时MGB-E探针具有高度特异性，在基因分型和基因诊断上的应用越来越广泛。

显著提高T_m值： MGB-E的结构特征可以有效提高探针的T_m值，与模板稳定结合，特异性更强，结果更准确。

探针设计更短： 相较于传统双标记荧光探针，MGB-E探针可以设计的更短，尤其对于富含AT的序列设计。

更低背景荧光： 该探针使用非荧光淬灭基团，且序列更短，使得报告基团和淬灭基团距离更近，荧光本底更低，大大提高了灵敏性和准确度。

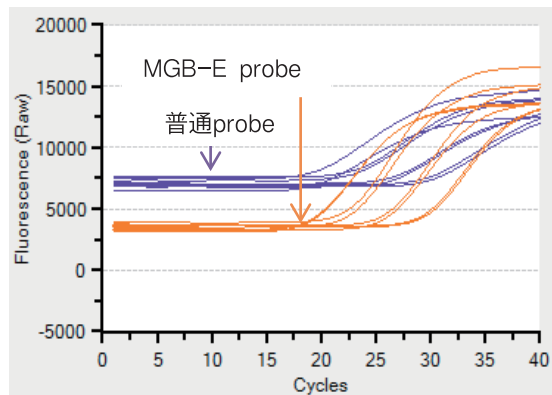
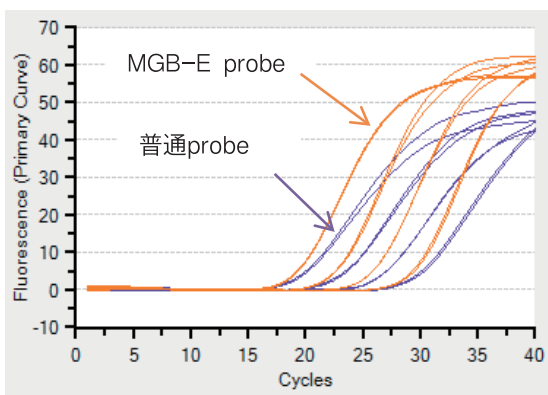
与传统双标记荧光探针相比，MGB-E探针荧光本底更低，荧光信号更强：



应用例

MGB-E Probe在基因检测中的应用

使用Takara MGB-E探针及其相应的引物对Norovirus GI型进行检测（下图），其最终的荧光信号值明显高于普通的双标记荧光探针。



◆ Locked Nucleic Acid

Locked Nucleic Acid是一种核酸类似物，在结构上具有以五碳糖上的2'氧原子与4'C原子所形成的亚甲基桥的特征，使Locked Nucleic Acid不仅可以与DNA或RNA互补序列形成双链，且所形成的双链较以往更加稳定，其物理性质与一般核酸非常相似。

许多文献均指出，在一般探针、引物或者siRNA中的部分序列以Locked Nucleic Acid取代，可提升引物、探针或者siRNA的亲合性、专一性与稳定性。

当与互补的DNA或者RNA链杂交时，Locked Nucleic Acid表现出前所未有的热稳定性。对于每一个嵌入的Locked Nucleic Acid单元，其双链的T_m值可增加2–8°C，因此，设计的引物探针的长度可以比传统的DNA或者RNA序列更短，同时可以保持高的T_m值，当用于检测小的靶序列或者很相似的靶序列时，这一点尤为重要。

- 可以通过改变寡核苷酸中Locked Nucleic Acid含量来提高其灵敏度与特异性。将Locked Nucleic Acid嵌入到寡核苷酸已被证明可以改善许多基于杂交技术的灵敏度与特异性，包括PCR、微阵列与原位杂交（ISH）。
- 当Locked Nucleic Acid碱基像A与T那样互补时，T_m值增大，相反，像A和C那样错配时T_m值会明显降低。因此，一个碱基的差异会使T_m值出现较大变化，所以Locked Nucleic Acid探针对SNP分型非常有用。
- 对于具有低熔点的AT丰富的寡核苷酸，更多的Locked Nucleic Acid碱基嵌入到寡核苷酸可提高其双链的T_m值。

● 设计原理

设计Locked Nucleic Acid请遵循以下原则：

- 避免自身互补以及与其它含寡核苷酸的Locked Nucleic Acid交叉杂交
- GC含量保持在30–60%
- 避免连续超过4个Locked Nucleic Acid碱基
- 避免3个或者3个以上连续G或者C

Locked Nucleic Acid特点：

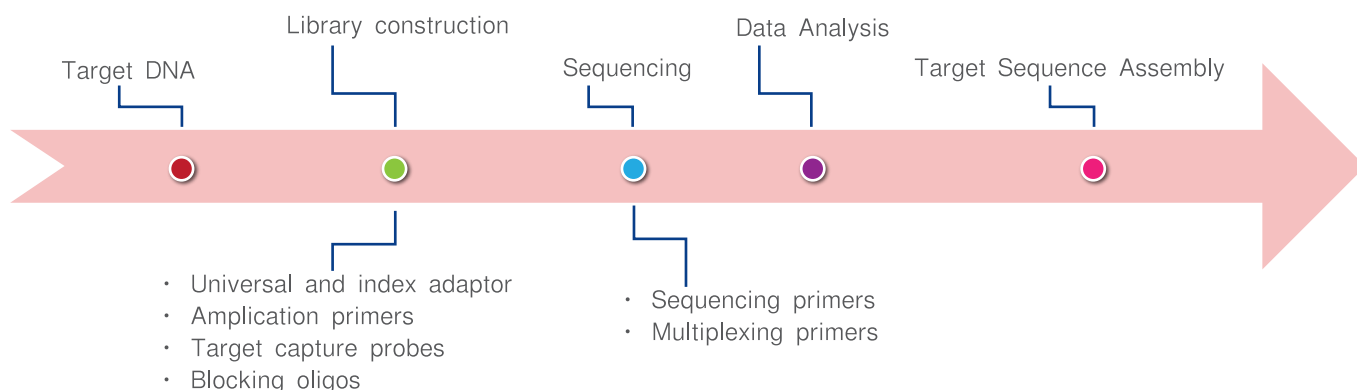
- 可增加引物或者探针的T_m值
- 可活化RNase H，适用于基因抑制实验
- 可被一般酶识别，如：T4 Ligase、DNA polymerase
- 低细胞毒性且亲水性佳
- 可抵抗外切酶或内切酶的分解作用

◆ NGS Oligo (Next Generation Sequencing oligo)

下一代测序 (NGS) 技术迅速发展, 正逐渐成为遗传学研究和发现领域不可或缺的一部分。该技术不仅广泛应用于遗传分析, 而且加速推进在研究、临床和应用市场领域的进展。高纯度高质量的NGS Oligo是您获得准确的NGS实验结果的基础, Takara Oligo合成技术团队, 集多年Oligo合成的丰富经验, 致力于提供高质量的NGS Oligo, 制品均经过100%质谱分析和PAGE检测, 有效监控质量, 提供放心保证。

- 专门的设备和经验丰富的技术人员
- 特别的防污染工艺, 有效防止交叉污染
- 100%进行PAGE检测和质谱分析, 切实监控样品准确性和纯度
- 96 well Plate 或者离心管包装任选, 方便使用

除了接头(adaptor)以外, 测序平台还使用其它Oligo, 例如Amplification primers等, 它们对交叉污染的要求没有接头(adaptor)高, 因此, 按照常规Oligo进行定制即可。



◆ 长链RNA的合成

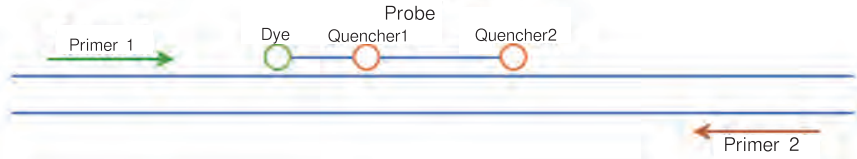
RNA的合成原理与DNA一样, 但相比于DNA的化学合成, RNA的化学合成较为困难, 原因是碱基之间的偶联效率较低、制品容易分解等。Takara公司凭借多年的合成经验, 完善了一整套RNA合成和纯化技术, 可为客户提供长达110碱基的RNA定制服务, 可满足广大科研工作者多样化的需求。

RNA长度	纯化方式	纯度	说明
60~110 mer	PAGE	90%	序列特殊时纯度会有所降低

* 因RNA合成的特殊性, 合成前请先咨询。

◆ 双淬灭探针的合成

序列、探针长度等因素对常规单淬灭荧光探针影响较大，序列长度短淬灭效果更好，但 T_m 值和特异性不理想，序列长度长又会造成淬灭效果差，背景荧光信号值高。双淬灭荧光探针在标准双标记探针中间增加一个淬灭基团，解决了因序列长度较长造成的背景荧光信号值较高的问题。因为对探针长度的要求放宽，即便对于AT-rich的区域也能设计条件合适的探针。



双淬灭荧光探针利用双重淬灭效应实现最大荧光效果，能够有效降低荧光背景，从而实现在同一反应体系中可以添加更多的探针。

- 降低探针背景荧光
- 提高探针的S/N比
- 提高反应灵敏度
- 实现在同一反应体系中可以添加更多的探针

常规荧光探针和双淬灭荧光探针对比

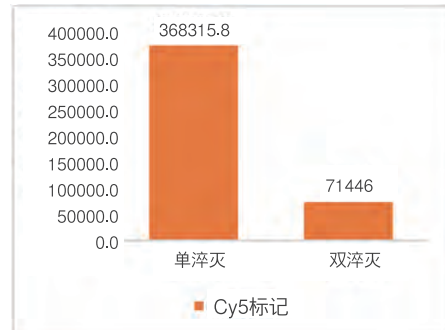
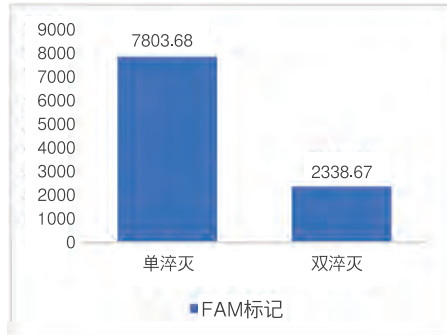
	常规荧光探针	双淬灭荧光探针
长度	13~30 mer	长度要求不高
本底荧光信号	高	低
灵敏度*	低	高

* 本底荧光信号越低，S/N越高，检测灵敏度越高。

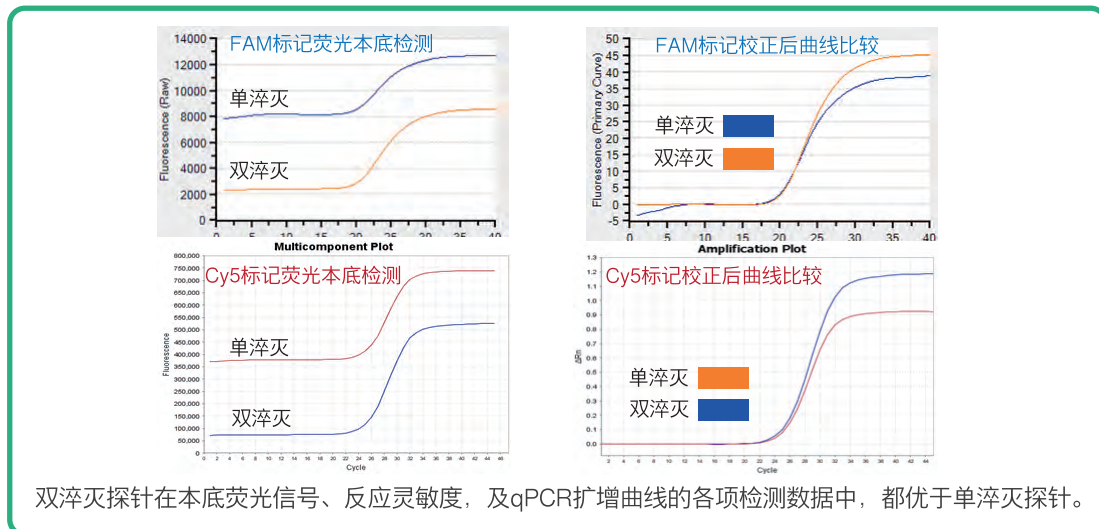
单淬灭荧光探针和双淬灭荧光探针性能比较

应用例

· 本底荧光比较



· qPCR检测结果比较



■ 相关信息

◆ 相关染料的光谱学性质与数据

常见荧光报告基团的光谱数据:

荧光报告基团	最大激发波长 (nm)	最大发射波长 (nm)	颜色	修饰位置
AMCA	353	422	Purple	5' 末端, 3' 末端
6-FAM (fluorescein)	494	518	Green	5' 末端, 3' 末端
Alexa Fluor 488	495	519	Green	5' 末端, 3' 末端
TET	521	536	Green	5' 末端
JOE	520	548	Green	5' 末端
HEX	535	556	Green	5' 末端, 3' 末端
Cyanine 3	552	570	Green-Yellow	5' 末端, 3' 末端
Rhodamine Green	560	580	Green-Yellow	5' 末端, 3' 末端
TAMRA	557	583	Yellow	5' 末端, 3' 末端
ROX	586	610	Orange	5' 末端, 3' 末端
Texas Red (Sulforhodamine 101)	597	616	Orange	5' 末端, 3' 末端
Cyanine 5	649	662	Red	5' 末端, 3' 末端
Cyanine 5.5	675	694	Red	5' 末端
DyLight 680	682	715	Red	5' 末端, 3' 末端
DyLight 755	752	778	Red-Infrared	5' 末端, 3' 末端
DyLight 800	770	794	Red-Infrared	5' 末端, 3' 末端

双标记探针的荧光报告基团和淬灭基团适配表:

荧光基团	最大激发波长 (nm)	最大发射波长 (nm)	推荐选择的淬灭基团					
			BHQ1	BHQ2	BHQ3	DABCYL	MGB-X	TAMRA
			480-580 (534)	560-670 (579)	620-730 (672)	400-525 (453)	390-625 (522)	470-560 (544)
AMCA	353	422				✓	✓	
FAM	494	518	✓			✓	✓	✓
Alexa Fluor 488	495	519	✓				✓	
Rhodamine Green	504	533	✓				✓	
JOE	520	548	✓			✓	✓	
HEX	533	559	✓			✓	✓	✓
Rhodamine B	543	565	✓				✓	
Cyanine 3	550	570		✓			✓	
TAMRA	560	582		✓		✓	✓	
ROX	587	607		✓		✓	✓	
Texas Red	595	613		✓			✓	
Cyanine 5	643	667		✓	✓	✓	✓	
Cyanine 5.5	675	694			✓			
DyLight 680	682	715			✓			
DyLight 755	752	778			✓			
DyLight 800	770	794			✓			

随着分子诊断技术的高速发展，在传染性疾病、遗传性疾病、肿瘤的诊断、靶向药物筛选及法医鉴定等领域的应用越来越广泛，而探针、引物的质量对于精准医疗起着至关重要的作用。Takara公司在中国三十多年的合成中，积累大量的合成经验，在与各类IVD企业的合作中投入大量研发力量，优化完善生产工艺，满足下游不同类型IVD客户的应用需求。常用探针包括：双标记探针、荧光原位杂交探针、STR (short tandem repeat, 短串联重复序列) 检测探针、捕获探针（应用于NGS领域）等。

根据国家药品监督管理局NMPA (National Medical Products Administration) 体外诊断试剂原料的质量标准，IVD企业对oligo等重要原料制定了严格的入库质量标准，针对相关要求，Takara在制品中附带了相应的文件。

Lot差控制：完善的工艺流程、完备的制造文件、完整的人员培训、完全的质量控制。

制造量：按照客户定制进行制造，保证单批次生产为一个lot，满足客户订单要求。

溯源记录：完整地记录制造过程中用到的原料、中间品、耗材、仪器设备，完全可溯源。

客户定制：满足IVD客户的特殊要求，例如溶液状态发货等。

■ 认证体系：【宝生物工程（大连）有限公司通过以下认证】

ISO9001:2015：2015年1月5日通过认证，每年进行年检；

ISO13485:2016：2019年3月26日通过认证。

■ 相关法规要求

样品种类	项目	国标要求	Takara标准	
Primer	外观及性状	半透明或不透明的片状粉状物	半透明或不透明的片状粉状物	
	引物探针的总量	相对误差≤10%	相对误差≤10%	
	相对分子质量	相对误差≤0.05%	相对误差≤0.05% (500 ppm)	
	碱基准确性	合成序列与定制序列100%匹配	合成序列与定制序列100%匹配	
	纯度	脱盐级primer	HPLC纯度≥75%	PAGE QC主带清晰 (HPLC纯度≥75% ^{*1})
		OPC级primer	HPLC纯度≥85%	PAGE QC主带清晰 (HPLC纯度≥85% ^{*1})
		PAGE级primer	HPLC纯度≥90%	PAGE级单一主带 (HPLC纯度≥90% ^{*1})
		HPLC级primer	HPLC纯度≥95% (特殊序列≥90% ^{*2})	HPLC纯度≥95% (特殊序列≥90% ^{*2})
Probe	外观及性状	半透明或不透明的片状粉状物	半透明或不透明的片状粉状物	
	引物探针的总量	相对误差≤10%	相对误差≤10%	
	相对分子质量	相对误差≤0.05%	相对误差≤0.05% (500 ppm)	
	碱基准确性	合成序列与定制序列100%匹配	合成序列与定制序列100%匹配	
	修饰基团准确性	修饰基团与定制序列完全一致	修饰基团与定制序列完全一致	
	纯度	HPLC纯度≥95% (特殊序列≥90% ^{*2})	HPLC纯度≥95% (特殊序列≥90% ^{*2})	







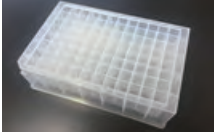

*1: Takara承诺标准，但是合格证中不体现该项检测内容，如需该项检测结果，另外收取费用；

*2: 特殊序列包括：当碱基数≥41，或引物有修饰，或GC%≥70%，或序列中有连续5个G以上，或RNA制品。

■ 包装定制、检测小样:

Takara为满足客户需求, 对IVD客户可以提供各种定制包装形式的产品, 例如tube、plate等, 根据客户提供检测用小样 (与大包装样品为相同lot分注的制品):

- ★ 产品交付量: nmol级~克级
- ★ 指定浓度
- ★ 按要求分装
- ★ 可提供离心管、广口瓶、96孔板多种包装

种类	试样	规格	种类	试样	规格
离心管 (避光)		1.5 ml	离心管 (15 ml)		15 ml 50 ml
离心管 (透明)		2.0 ml	广口瓶 (透明)		根据OD量确定 使用何种规格
离心管 (避光)		5.0 ml	离心管 (透明)		5.0 ml
Plate (96孔)		2.0 ml/孔	广口瓶 (避光)		根据OD量确定 使用何种规格

★ **Oligo Data Sheet:** 随制品同时发送包含下述内容的数据表。ODS例:

Oligo Data Sheet											
Mfg. ID	Name	Sequence(5'-3')	Size	MW	T _m (°C)	ε (L/mol.cm)	%GC	nmols	μg	OD/pc	
CIPF999-01	GAPDH F	5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3'	21	6557.3	64.4	209200	52	9.6	62.7	2.0	
CIPF999-02	GAPDH R	5'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3'	23	7118.7	57.3	232900	43	8.6	61.1	2.0	

Code: 5005 PO date: 2018/11/12

* 包含序列信息、GC含量、分子量、T_m值、摩尔消光系数、nmols数以及OD/PC等数据, 方便客户使用。

Takara还致力于GMP生产, 为了满足客户的各种需求, 建立了相应质量标准进行生产, 还建立了可追溯体系, 可以验证质量以及规格。同时也提供大规模生产、纯化、终产品的分装和包装服务。

■ 保存稳定性数据

对Oligo干品或溶液状态（TE或Milli-Q水溶解）制品，在不同保存温度、冻融状态和运输条件下的稳定性进行了验证，为客户保存提供了理论依据。

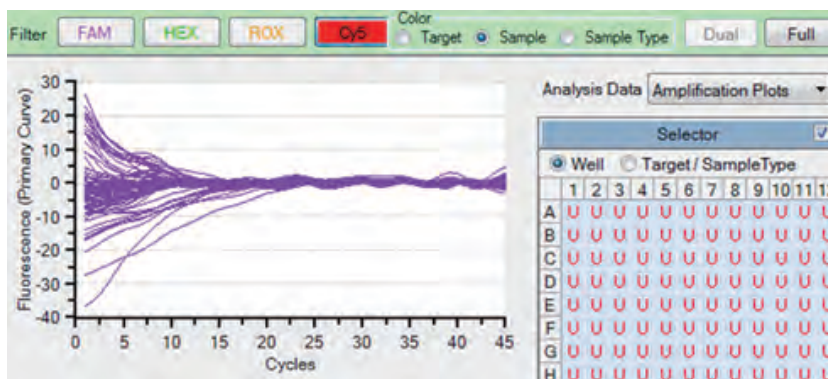
样品种类	稀释buffer	终浓度	保存温度	保存时间
Primer/probe	TE(10:0.1) pH8.0	10 μ M	-20 $^{\circ}$ C	24 months
	Milli-Q水	100 μ M	-20 $^{\circ}$ C	24 months
	干品	---	-20 $^{\circ}$ C	24 months

■ 防污染

防污染类型	能达到的标准
防外源模板污染	在洁净环境中进行产品的制造和分装，能够有效避免外源模板污染，达到200 NTC，0检出率
防交叉污染	进行严格的标准化操作，交叉污染率低于万分之一
防游离染料污染	痕量残留的染料不影响实验结果判定

☆ 防污染例

1. 防外源模板污染：200 NTC无污染



2. 防交叉污染：

标准：HPLC清洗引入交叉污染标准 \leq 1%，

Takara最高级别的防交叉污染，可达到下表的标准：

精制方法	交叉污染率
探针小量制备	<0.001%
引物小量制备	<0.003%
探针大量制备	<0.001%
引物大量制备	<0.003%

■ Oligo定量说明

在Oligo定量的过程中，由于设备和计算方法不同会造成结果的偏差。为此，Takara进行了一系列研讨，旨在找出合适的测定方法，以获得更为准确的测定数据。

1、样品的稀释

1) 根据标签信息将样品稀释至100 μ M:

将干粉配制成100 μ M溶液，加入溶剂的体积为V

$$V(\mu\text{l}) = \text{nmol数} \times 10$$

2) 测定前，根据测量设备的要求，进一步稀释至合适浓度。

如采用NanoDrop系列设备进行测定：建议将测定样品终浓度稀释至10 μ M

如采用UV法进行测定：建议将测定样品终浓度稀释至2 μ M

2、Primer & Probe测定

设备	Primer		Probe	
	UV法	NanoDrop	UV法	NanoDrop
模式	—	Nucleic Acid	—	Micro Array
Type	—	ssDNA	—	ssDNA
Dye/Chrom . Editor	—	—	—	添加修饰基团信息（见下表）
Dye1	—	—	—	选择标记的荧光基团

☆ 常见荧光基团的摩尔消光系数及吸收波长列表

荧光基团	Coeff.(l/mole-cm)/ 摩尔消光系数	Analysis Wavelength(nm)/ 吸收光波长
FAM	20960	494
HEX	31600	533
ROX	22600	587
ATTO488	12600	501
JOE	20100	520
TAMRA	29100	560
TEXAS RED	14400	595
TET	16300	521
BHQ1	8000	534
BHQ2	8000	579
BHQ3	13000	680
MGB-E	55700	522

3、摩尔浓度计算公式：

UV测定：摩尔浓度 $\mu M = \text{实测}A_{260}\text{值} \times \text{稀释倍数} \times 10^6 / \text{摩尔消光系数 } \epsilon$ ^{注1}

NanoDrop测定：Primer摩尔浓度 $\mu M = \text{实测}A_{260}\text{值} \times \text{稀释倍数} \times 10^6 / \text{摩尔消光系数 } \epsilon$

Probe摩尔浓度 $\mu M = \text{实测}A_{260}\text{值} \times 10^{22} \times \text{稀释倍数} \times 10^6 / \text{摩尔消光系数 } \epsilon$

注1：摩尔消光系数 ϵ 请参考Takara合成制品附带的Oligo Data Sheet。

注2：使用NanoDrop2000/2000c设备测定时，计算时需要乘以10（1 cm光程）；

使用NanoDrop One设备测定时，则不需要乘以10。

特殊说明1：NanoDrop设备在Micro Array模式下， A_{260} 值在计算核酸浓度时考虑到染料对吸光值的影响，对检测结果进行了校准，从而显示的 A_{260} 值和用来计算的核酸浓度的吸光值不一样。并且，由于NanoDrop在计算质量浓度时，是基于1个OD值的Oligo DNA/RNA的质量约为33 μg 来计算的，所以由于序列的不同，该平均值也会造成计算结果的偏差。因此不建议使用NanoDrop读取的质量浓度和分子量来计算摩尔浓度，尤其是探针的计算。

特殊说明2：NanoDrop One设备在样品测定页面增加了“基线矫正（Baseline Correction）”功能，旨在用来校正因颗粒光散射引起的任何偏移，测得数据中减去指定基线校正时测得的吸光度。而化学合成的有修饰的Oligo DNA/RNA样品中一般不含有一些在指定波长下有吸收的物质（如，核酸类似物、多糖等），其本身在260nm以外的波长下也会有吸收，所以不能进行矫正。在测定时，不论样品是否有修饰，选择“单链DNA”模式，不勾选“基线矫正”功能，能够获得偏差较小的 A_{260} 数值。

4、Oligo总量计算公式（单位：OD）

Oligo总量（OD）= 实测 A_{260} 值 \times 稀释倍数 \times 溶液总体积（ml）

■ Oligo DNA/RNA的摩尔数计算方法：

1个OD值的Oligo DNA/RNA的质量约为33 μg ，而每个碱基的平均分子量一般按330道尔顿进行计算。因此，合成DNA/RNA的nmol数一般按以下公式粗略地计算。

$$\text{nmol数} = \frac{\text{OD值} \times 33 (\mu g)}{\text{碱基数} \times 330} \times 1,000 = \frac{\text{OD值}}{\text{碱基数}} \times 100$$

如果需要计算合成DNA的精确浓度，请按以下公式进行计算。

$$\text{nmol数} = \frac{\text{OD值} \times 1,000}{(15.2 \times \text{A数}) + (7.4 \times \text{C数}) + (11.5 \times \text{G数}) + (8.3 \times \text{T数})}$$

如果需要计算合成RNA的精确浓度，请按以下公式进行计算。

$$\text{nmol数} = \frac{\text{OD值} \times 1,000}{(15.2 \times \text{A数}) + (7.2 \times \text{C数}) + (11.5 \times \text{G数}) + (9.9 \times \text{U数})}$$

注) 这里的OD值是指DNA/RNA制品的总OD值。

nmol数与OD值的关系： $\text{nmol} = 10^9 \times \text{OD} / \epsilon$

* ϵ 为Oligo的摩尔消光系数（单位： $L/mol \cdot cm$ ），该数据在Oligo Data Sheet中提供。

Q-1: 怎样对合成DNA/RNA制品进行定量?

A-1: 由于核酸在260 nm附近有强吸收, 因此常根据此性质, 用紫外分光光度计测定核酸溶液在260 nm的吸光度值, 据此对核酸进行定量, 用OD值来表示。1 OD是指: 置于光路长度为1 cm的比色皿中的DNA/RNA溶液, 如果其在260 nm处的吸光度值为1, 则称1 ml该溶液中溶解的DNA/RNA的量为1 OD。1个OD值的合成DNA/RNA的质量约为33 μg。

Q-2: 如何测定并计算OD值?

A-2: 将DNA/RNA溶液进行适当稀释, 使吸光度测定值与样品浓度的关系在直线范围内, 再根据原溶液的总容积与稀释倍数计算该溶液的总OD值。例如, 一个200 μl的DNA/RNA溶液, 如果对其进行6倍稀释, 测定值为1.0时, 则该溶液的总OD值为: 0.2 ml × 6 × 1.0 OD/ml = 1.2 OD。

Q-3: 合成的DNA、RNA、探针应如何保存?

- A-3:
1. 干燥的DNA制品很稳定, -20°C下保存2年没问题。溶解后的DNA也请保存于-20°C, 最好是分份保存, 避免反复冻融。
 2. 干燥的RNA制品如能存放于-80°C是最理想的, 如不能请于-20°C保存, 保存2年没问题。溶液状态的RNA最好保存在-80°C, 如无条件, 请保存于-20°C。
 3. 荧光探针必须避光保存。探针干燥品-20°C保存2年未发现降解。作为本公司试剂盒中的组分, -20°C保存2年, 探针功能正常。

Q-4: 合成DNA溶液在室温下放置了数天, 还可以使用吗?

A-4: 溶液中的Oligo DNA在常温下放置3~4天应该没问题, 但最好不要放置一个星期以上。其寿命与容器、溶剂的灭菌程度有关。

Q-5: 制品溶解后发现少许沉淀, 会影响实验结果吗?

A-5: 所有的制品纯化后都要进行脱盐, 脱盐是使用C18柱进行的, 偶而会有微量的树脂溢出而进入制品。树脂不影响任何反应结果, 请稍许离心后取上清使用。

Q-6: 测定了制品的OD值后发现OD₂₆₀/OD₂₈₀<1.8, 制品质量(纯度)合格吗?

A-6: 由于核酸在260 nm附近有强吸收, 而蛋白质在280 nm附近有强吸收, 从生物体内提取核酸时, 常用OD₂₆₀/OD₂₈₀比值来评价核酸纯度(比值在1.8~2.0之间), 这一判断是基于序列中A、G、C、T所占比例大致相同的结果。而合成的DNA/RNA则不同, 序列很短(通常在20~30个碱基之间), 其中A、G、C、T各种碱基所占比例很不相同, 由于各种碱基的摩尔消光系数不同, 因此不同碱基构成的合成DNA/RNA制品的OD₂₆₀/OD₂₈₀比值也不同, 例如当序列中C、T碱基的含量高时, 该比值会大大低于1.8。此外, 序列中碱基的排列顺序也影响该比值。所以不能根据OD₂₆₀/OD₂₈₀比值来评价合成DNA/RNA制品的纯度。

碱基组成	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
100%A	2.5
100%G	1.85
100%C	1.15
100%T	1.14
A、G、C、T (各25%)	1.66

Q-7: 能否根据电泳带的亮度对合成的DNA/RNA制品进行定量?

A-7: 不能。因为EtBr是通过嵌入到核酸的双螺旋间而使其着色的。合成的DNA/RNA分子为单链，只有通过自身回折形成局部发夹环结构或链间形成部分双螺旋结构，才能被EtBr染色。由于不同制品的序列不同，形成双螺旋的能力不同，因此染色能力不尽相同，也就不能根据EtBr染色带的亮度来对合成的DNA/RNA进行定量。

Q-8: 使用3%的Agarose凝胶电泳分析Oligo DNA制品，发现有很多条泳带，为什么?

A-8: Oligo DNA的电泳一定要使用变性PAGE电泳。Oligo DNA是单链DNA，容易形成复杂的立体结构，因此进行Agarose电泳时，容易出现多条泳带（更无法用Agarose电泳进行定量了）。

Q-9: 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?

A-9: 1. A、G、C、T的组成不同，电泳速度不同；
2. DNA的立体结构不同，电泳速度不同。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。

Q-10: PCR产物经克隆后测序发现，引物处的碱基有错误，怎么办?

A-10: 1. 如果测序后引物处出现了问题，不排除PCR错配的可能，但更主要的原因应在合成引物本身。因为引物纯度不可能是100%，因此，挑选克隆时，有可能挑选了杂质引物扩增出的PCR产物的克隆。此时，请重新挑选一个克隆测序，会得到正确的结果。
2. 如果挑选2~3个克隆测序情况还没改观，我们会免费重新合成引物。

Q-11: 怎样才能保证Oligo DNA的正确性?

A-11: 1. 合成Oligo DNA时，选用高纯度级制品。
2. 避免使用过长的Oligo DNA，最好选用小于35 mer的合成DNA制品。
3. 进行克隆实验时，每次克隆都须进行测序验证，以保证序列的正确性，然后再进行下一步实验。进行蛋白质表达实验时，尤其需要注意。

Q-12: Takara可合成多长的DNA，多长的RNA?

A-12: Takara合成DNA的长度为2~150个碱基；合成RNA的长度为2~110个碱基。当合成的DNA序列较长时，由于合成及纯化方法的限制，很难保证制品中每个序列都正确无误。此外需要说明的是：如果待合成序列比较特殊（例如多个“G”连续出现等），合成收率相对较低，我们可能会根据具体情况加收费用；有时我们也可能无法合成订购的序列，此时本公司保留不接受订单的权利。

Q-13: 一般的合成Oligo DNA的5'和3'末端有磷酸基团吗?

A-13: 没有，5'和3'末端均为-OH基。如需要加磷酸基团，订货时请特别注明，此时需收取磷酸化（PO₄修饰）费用。

Q-14: 平端的PCR产物难以克隆，为什么?

A-14: 由于一般的PCR用引物的5'末端都没有磷酸基团，因此，扩增后的PCR产物的5'末端也没有磷酸基团。当克隆于去磷酸化的末端平滑载体时，无法克隆进去；而当克隆于非去磷酸化的末端平滑载体时，背景会极高。此时请对PCR产物的5'端进行磷酸化（PO₄修饰）处理。

Q-15: 进行反义核酸实验时, 是否要对DNA链全部进行S代修饰, 除了S代外, 还有什么办法可增加核酸在生物体内的稳定性?

A-15: DNA经S代修饰后比较稳定, 在细胞中不会被核酸酶降解。如果整条链全部S代, 的确能增加DNA的稳定性, 但会降低其 T_m 值, 也即降低该反义DNA与靶序列的结合效率。因此, 科研人员一般采用将DNA片段两端插入数个(通常3个)S代磷酸酯键(Phosphorothioated Bonds), 这样既能增加DNA的稳定性, 又能增加反义DNA与靶序列的结合能力。不过如果要将反义DNA注入到活的动物体内, 为增强稳定性, 还是将整条链S代效果更好。2'-OMe-RNA也抵抗核酸酶降解, 可与S代DNA构成嵌合的反义核酸, 这样既能增强反义核酸的稳定性, 又能增加其与靶序列的亲合力(2'-OMe-RNA与RNA的亲合力要比DNA与RNA的亲合力大很多)。此外, 5-Me-dC由于能增强DNA双螺旋的稳定性, 有时也被掺入到S代的反义核酸中。

Q-16: 淬灭基团为TAMRA或BHQ系列染料的双标记荧光探针在使用上有什么不同?

A-16: 由淬灭基团TAMRA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), 用于Real Time PCR实验。由于这些淬灭染料的光谱学性质不同, 作为淬灭基团使用时的特点也不同, 现说明如下:

1. TAMRA为荧光染料, 在淬灭报告基团的同时, 自身会在更高波长处发射荧光, 此发射荧光会对报告基团的检测造成影响, 探针荧光本底(Background)相对较高。而BHQ系列为非荧光染料, 淬灭报告基团, 但自身不发射荧光, 因此, 探针荧光本底低, 信噪比更大, 检测灵敏度更高。
2. 淬灭基团对报告基团的淬灭有赖于二者的光谱迭盖(Overlapping), 也即报告基团的荧光光谱应与淬灭基团的吸收光谱相交搭。对比TAMRA及BHQ系列染料的吸收光谱, 可见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; 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(像Cyanine 3、Cyanine 5等的淬灭效果都很好)。因此可由BHQ系列染料组成一套双标记荧光探针用于多重PCR(Multiplexing PCR)。

Q-17: 双标记荧光探针设计时应遵循哪些原则?

- A-17:
1. 探针应位于两引物之间;
 2. 探针中碱基G、C含量应在20%~80%之间;
 3. 避免同种碱基成串出现, 特别是碱基“G”;
 4. 碱基G不要出现在5'末端;
 5. 探针的 T_m 值要比引物的 T_m 值高8~10°C, 应在68~70°C之间;
 6. 探针长度超过30个碱基时, 最好把淬灭基团放在中间, 以防止荧光本底过高, 这时探针的3'末端应加磷酸基封阻, 以防探针在PCR过程中延伸。

- 本宣传页上登载的制品，都是以科研为目的。请不要用于其它方面，如：不要用于人、动物的临床诊断和治疗。也不能用于食品、化妆品及家庭用品等方面。
- 未经本公司许可，严禁产品的转售·转让、以转售·转让为目的的产品更改、以及用于商品的制造。
- 专利许可信息请在本公司网站上确认：<http://www.takarabiomed.com.cn/>。
- 本宣传页上登载的公司名称及名称即使没有特殊标注，使用的也是各公司的商标或注册商标。
- 本宣传页仅限于中国大陆地区客户使用，其他地区客户请咨询当地代理商。
- 本宣传页上记载的产品信息是2024年2月1日的信息，最新信息请参考公司官网。



Clontech Takara cellartis

销售商：

宝日生物技术（北京）有限公司

Takara Biomedical Technology (Beijing) Co., Ltd.

地址：北京市昌平区科学园路22号（中关村生命科学园内）

电话：010-80720985, 80720986

制造商：

宝生物工程（大连）有限公司

Takara Biotechnology (Dalian) Co., Ltd.

地址：辽宁省大连市经济技术开发区东北二街19号

电话：0411-87621671

引物探针设计服务热线：0411-87621671转504

邮箱：primer@takara.com.cn

Oligo合成售前技术咨询热线：0411-87641683

邮箱：oligo@takara.com.cn

Oligo合成售后技术咨询热线：0411-87632430

邮箱：oligo_support@takara.com.cn