



DNA 合成原理概述

历史

寡核苷酸的化学合成起步于 20 世纪四十年代末。

1955 年, 剑桥大学的 Todd 实验室成功合成了具有磷酸二酯键结构的 TpT, 并获得 1957 年诺贝尔奖。

1965 年, Khorana 等利用化学方法大量合成脱氧核苷的单一聚合物或二种、三种脱氧核苷的重复序列, 以及人工合成的六十四种核糖三糖苷, 研究蛋白质的生物合成过程, 从而确定了氨基酸的三联密码子, 因此获得 1968 年诺贝尔奖。

六十至七十年代, 寡核苷酸的化学合成方法不断完善, 逐渐形成了今天被广泛应用的固相亚磷酰胺三酯法并实现了合成的自动化。

八十年代中后期, 随着 PCR 技术的广泛应用, 化学合成的寡核苷酸几乎进入了每一个分子生物学实验室, 为 PCR 这一分子生物学及医学工作者的利器提供了刀锋。

今天, 世界上每天化学合成的寡核苷酸数以十万计, 在 HGP、基因治疗、基因芯片等生物医学热点中有着广泛的应用。

基本原理

核酸分子的基本骨架是相邻核苷酸间的 3'→5'磷酸二酯键, 一个矛盾便是核苷酸为一个多官能基团的分子, 且人工化学合成核酸分子必定是一个多步连续的反应, 因此要求副反应尽可能的少, 否则目的产物的产率以及纯化的难度会使合成失败。所以化学合成的基本过程便是在合成过程中尽可能的将不需要的基团暂时保护起来, 在一轮偶联反应之后, 再将上一轮基团上的保护基选择性的脱下来, 以形成专一的磷酸二酯键。

固相亚磷酰胺三酯法

对此方法的最简单描述是: 溶液中的单体通过偶联反应形成 3'→5'磷酸二酯键, 从而连接到固相支持物上。下面是较详尽的描述:

- **基本材料:**

1. **支持物:** 固相合成是将核酸固定在固相载体上完成合成反应的, 最常用的固相载体为可控微孔玻璃珠 (CPG, controlled pore glass), CPG 的孔径根据所合成的寡核苷酸的长度而定, 一般合成链长小于 60mer 时, 选择孔径 500 埃 CPG; 链长大于 60mer 时, 使用 1000 埃 CPG。使用 CPG 的偶联效率高达 98%-99.9%, 可以满足合成长达 175mer



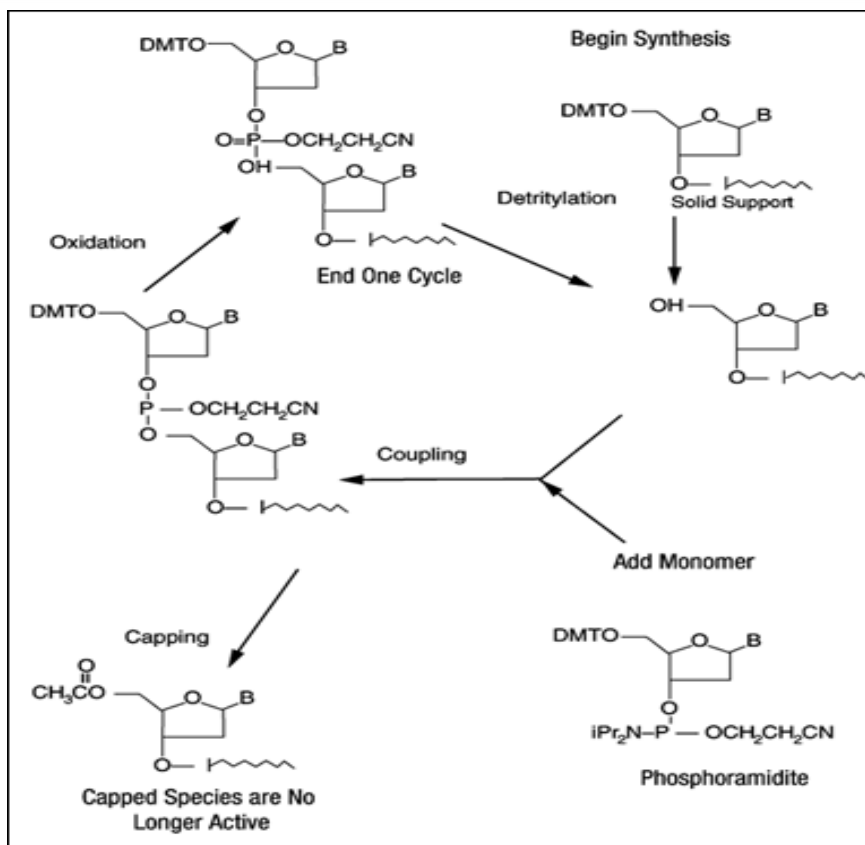
的寡核苷酸的条件。CPG 通过连接化合物与初始核苷酸的羟基共价结合，核苷酸的 5' 羟基用二甲氧基三苯甲基 (DMT) 保护。

2. **单体:** 合成所用单体为核苷亚磷酰胺, 是经过化学修饰的核苷酸, 含下面几个功能基团:

- 1) 3'位 P 上二异丙胺基, 偶联所用的功能基
- 2) 3'位 P 上脞乙基, 保护基, 合成完毕后脱去。
- 3) 5'-DMT, 保护基, 偶联前脱去。
- 4) A 和 C 的杂环氨基上的苯甲酸保护基, 合成完毕后脱去。
- 5) G 上嘌呤环氨基上的异丙酰保护基, 合成完毕后脱去。

● **反应步骤:**

1. 合成的第一步——**去封闭 (Deblocking)**, 用三氯乙酸去除 CPG 所连核苷上的 DMT, 以暴露 5'羟基, 供下一步偶联。此步需要注意 TCA 为一较强的酸, 可能会有脱嘌呤作用, 故 TCA 与寡核苷酸接触时间不要超过规定时间。
2. 第二步——**活化 (Activation)**, 在偶联之前, 单体与四唑混合并进入合成柱, 此时四唑提供一个质子给 3'磷酸上二异丙胺基的 N 原子, 质子化的二异丙胺是一个良好的游离基团, 与四唑形成亚磷酰胺四唑这种活性中间体。此步四唑过量保证了单体活化充分。
3. 第三步——**偶联 (Coupling)**, 亚磷酰胺四唑与 CPG 所连的核苷酸碰撞时, 与其 5'羟基发生亲核反应, 发生偶联并脱掉四唑, 合成的寡核苷酸链延长一个。此步单体相对于 CPG 所连核苷酸上 5'-羟基过量保证了偶联的高效率。
4. 第四步——**盖帽 (Capping)**, 为了防止未反应的与 CPG 相连的 5'羟基在随后的循环中被延长, 需要在偶联反应充分进行之后使之封闭, 常用乙酰化来封闭此羟基。临用前混合乙酸酐和 N-甲基咪唑等形成一活性很强的乙酰化试剂, 与少量未参与偶联反应的 5'羟基形成酯键。由于须封闭的羟基少且乙酰化试剂活性高和充分过量, 此步反应速度很快, 几秒钟即足够。太长的盖帽时间有在非预期位置发生乙酰化反应的可能, 且增加乙酸酐与痕量水形成酸攻击新生成的亚磷酸酯键的危险性。
5. 第五步——**氧化 (Oxidation)**, 偶联反应后新加上的核苷酸通过亚磷酸酯键 (磷为三价) 与 CPG 上的寡核苷酸链相连, 此亚磷酸酯键不稳定, 易被酸、碱水解, 因此需将此处三价磷氧化为五价的磷。常用的氧化剂为碘的四氢呋喃溶液。此步反应速度亦很快。应注意最后一个循环时, 氧化步骤不可省略。此外亦可用其他氧化剂来完成氧化, 从而得到各种符合实验需要的寡核苷酸。
6. 循环上述一至五步, 寡核苷酸链延伸至所需长度时即可完成。



DNA 合成基本原理

合成后处理

1. **切割:** 将合成好的寡核苷酸链从支持物上化学切割下来。常用新鲜的浓氨水来裂解 CPG 上连接化合物与初始核苷间的酯键。断裂下来的寡核苷酸带有自由的 3' 羟基。
2. **脱保护基:** 须在此步前选好后续的纯化方法。一般用新鲜的浓氨水处理较长时间以脱掉脞乙基、苯甲酰基、异丙基，用三氟乙酸脱 5'-DMT。
3. **纯化:** 根据所合成寡核苷酸的组成和应用来选定纯化的方法。常用的纯化方法有：C18 柱、OPC 柱、PAGE 和 HPLC。
4. **定量:** 根据寡核苷酸在 260nm 处的紫外吸收来定量。
5. **储存:** 通常一次合成提供的寡核苷酸的量会比所需要的量大得多，所以会涉及到寡核苷酸的储存问题。一般来说，这不成为问题，因为寡核苷酸的稳定性很好。需要注意的是避免紫外线等剧烈的物理环境，避免反复冻融，-20℃ 可稳定保存一年以上。

DNA 合成粗产物中的短片段

DNA 自动合成仪采用固相亚磷酸胺三酯法合成。现代最先进的 DNA 自动合成仪其单核苷酸的连接率高达 99%，也就是说，寡核苷酸中一个碱基与下一个碱基的化学反应（偶联）



效率达 99%。

虽然化学反应中 99%的效率是非常高的，但在检查粗制寡核苷酸中杂质的成分时，应考虑无效偶联率。如果有效偶联率是 99%，那么无效偶联率就是 1%。

下面以一条 10 个碱基长的寡核苷酸为例：

5'-AGC TAG CTA G-3'

虽然碱基计数从5'端开始，寡核苷酸的合成却从3'端开始。第10个碱基（-G）固定在固相CPG支持物上，碱基9和碱基10连接（-A到-G）的效率为99%，只剩下1%的碱基10未和碱基9连接。在自动合成循环中，给这1%的未反应碱基10带上乙酰化的‘帽子’，使之不再参与以后的偶联反应，即所谓的盖帽步骤（Capping step）。如果偶联反应就此终止了，则寡核苷酸粗产物中将会有如下组成：

AG	99%
G	1%

当与下一个碱基t连接后，粗反应混合物中组成为：

TAG	98%
AG	1%
G	1%

依次类推，与碱基c连接后，粗反应混合物组成则是：

CTAG	97%
TAG	1%
AG	1%
G	1%

忽略影响合成过程的其它因素（空间阻碍、试剂污染以及微小的计算误差），到第10个碱基末端时粗反应混合物组成为：

AGC TAG CTA G	91%
GCT AGC TAG	1%
CTA GCT AG	1%
TAG CTA G	1%
AGC TAG	1%
GCT AG	1%
CTA G	1%
TAG	1%
AG	1%
G	1%



10 个碱基的寡核苷酸合成完成后，粗反应混合物约含有 91% 的完整片段（精确计算应为 $0.999=91.35\%$ ）和约 9%（精确计算应为 $1-0.999=8.65\%$ ）的短片段即 **truncated sequence** 或称失败序列（**failure sequence**），因为在自动合成过程中，进一步的偶联反应已被加帽步骤阻止而不能进行了。尽管所有短片段约占粗反应产物组成的 9%，但其中任何一种都以很低的浓度存在。

一般 PCR 反应对少量杂质不敏感，因此一些研究者认为没有必要纯化去除短片段。以上讨论可以看出，50 个碱基的寡核苷酸粗制品中，其短片段累计约 50%（精确计算应为 $1-0.9949=38.89\%$ ），因此较长的寡核苷酸片段常常需要纯化。

DNA 寡核苷酸片段的纯化策略

有几种技术可用于纯化 DNA 寡核苷酸片段。选择正确的方法与以下因素有关：如寡核苷酸片段的应用目的、技术成本、是否具备某些设备、时间及预期产量等。

有四种普遍接受的 DNA 寡核苷酸片段纯化方法，即脱盐、OPC、HPLC 和 PAGE，下文将对每一技术做一简要介绍。

用固相亚磷酰胺三酯法自动合成后，寡核苷酸必需从 CPG 固相支持物上切割下来，并用浓氨水处理除去碱基上的保护基团。寡核苷酸从 CPG 上切割下来后，粗产物溶液包含各种杂质及反应副产物，其中有短片段、氨、盐及自由保护基团（如苯酰胺）。

短片段或失败序列在所有自动合成的 DNA 产品中均存在，这是由于碱基间的偶联效率低于 100% 的缘故。每次偶联后都积累短片段，但每一种短片段浓度均很低。粗略地估计（假如每次连接效率为 99%），每次偶联后短片段以 1% 的速度递增，因此，一个典型的（20 mer）寡核苷酸粗产物大约有 20% 的短片段，这些短片段可通过层析法或电泳法去除。

由于去除 CPG 支持物和脱保护是在浓氨水中进行的，所以粗产物中含有各种盐分。脱氧腺嘌呤、脱氧胞嘧啶在脱保护时有苯酰胺出现。虽然据报道氨、盐不会影响 PCR 及测序，但会干扰激酶反应。这些杂质可用脱盐法去除，也可用 OPC、HPLC、PAGE 电泳的方法除去。

● 脱盐

脱盐的 DNA 寡核苷酸片段的纯度可以满足大部分分子生物学研究。

最为可信的一种方法是利用反相 C-18 层析柱进行脱盐。粗制寡核苷酸片段随缓冲液进入层析柱后就被吸附在柱内。一些杂质，如氨、盐，不能被吸附，首先被洗脱，然后用有机溶剂洗脱寡核苷酸。这种技术成本较低，效果较好，但不能去除短片段。

另一种脱盐方法是凝胶过滤。DNA 粗产物通过一种装有葡聚糖或其它凝胶过滤基质的



柱子，杂质及不到 10 个碱基的短片段扩散入基质的小孔隙中，而寡核苷酸片段分子量较大，不能扩散入小孔隙中，所以首先流出。这种方法便宜、可靠。

尽管上述脱盐技术可去除杂质及小于 10 个碱基的短片段，长于 10 个碱基的短片段则需更为有效的方法去除，如 OPC、HPLC 或 PAGE。

● Cartridge (OPC) 纯化

OPC 纯化是用一种较便宜的反相层析柱对寡核苷酸进行纯化。这种方法可以去除杂质如氨、盐和短片段，所以寡核苷酸的纯度较高，但纯化回收量受 OPC 柱的容量限制。

OPC 纯化通常被称为“穷人”的 HPLC。这是由于运用了反相层析柱，而没有用昂贵的 HPLC 设备。这种技术用了一种小塑料柱，内装聚苯丙乙烯多聚树脂作为纯化载体，OPC 柱内的填料与反相 HPLC 柱的十分相似。

合成 DNA 寡核苷酸片段 (Oligo) 的最终产物上带有 DMT。纯化就是基于 DMT 与树脂的亲合力。Oligo 上只有最后一个碱基带有 DMT，其它碱基的 DMT 基团在逐步的合成过程中已被去除。因此，原则上只有真正所需的目的 DNA 片段末端有 DMT，而短片段末端无 DMT。末端 DMT 就象一个“把手”，让树脂在纯化过程中“抓紧”目的 DNA 片段。

用注射器将粗 Oligo 溶液注入树脂中，目的片段被吸附在树脂上，而短片段及杂质被洗出。然后用一种弱酸洗脱 DMT 基团，再用有机溶剂将纯化好的寡核苷酸片段洗脱。

OPC 柱的纯化量受柱子内填充的树脂量限制，容量不大，这是由于 OPC 最初是针对 PCR 应用而设计的，PCR 一般只用几个 OD 的纯化寡核苷酸已经足够了。

● HPLC 纯化

纯化中应用的 HPLC 方法有离子交换和反相 HPLC 两种。

离子交换 HPLC 一般用于分离较短的片段。该法是基于各个分子所带电荷不同而进行分离的。目的序列与短序列相比带有较多数目的电荷。但对仅差一个碱基的两条较长片段，离子交换 HPLC 难以将它们分开，尤其是偶联效率较低时更是如此。

反相 HPLC 纯化可以提供很纯的产品及较高的产量。与 OPC 纯化相似，这种技术也是依赖于目的 DNA 片段末端所带 DMT 与柱子内填充的树脂间的亲合力。更新的聚氯乙烯共聚树脂有更大的样品容量及更可靠的回收量，另外，它们可耐高 pH 值，使用起来很方便，也大大延长了柱子的寿命。因此，应用聚合柱子的反相 HPLC 法已成为最有效的寡核苷酸纯化的方法。可以制成各种规格的柱子，以纯化各种合成规格的产品，如 0.05、0.2、1.0 及 10 μ mol 的产物均可纯化，回收率一般超过 75%，HPLC 图谱可记录产品纯度。

● PAGE 纯化



PAGE 法是纯化的另一种方法，也能提供纯度很高的寡核苷酸。这种技术是基于带电荷的寡核苷酸片段在凝胶电泳时的迁移率差异，而分离不同长度的寡核苷酸。目的 DNA 片段由于长度最大，在凝胶中移动最慢。该方法比较费时、费力，然而，许多研究人员仍乐于使用 PAGE 法，主要因为它是大多数生物技术实验室的常规方法。

- 本公司的纯化方式

本公司提供 OPC、PAGE 和 HPLC 纯化供用户选择。若用户无特殊要求，我们将根据经验选择纯化方式。一般说来，小于 40 bases 的 oligos 用 OPC 纯化；大于 40 bases 及修饰、标记的 oligos 用 PAGE 或 HPLC 纯化。

寡核苷酸的修饰 (Modified Oligo)

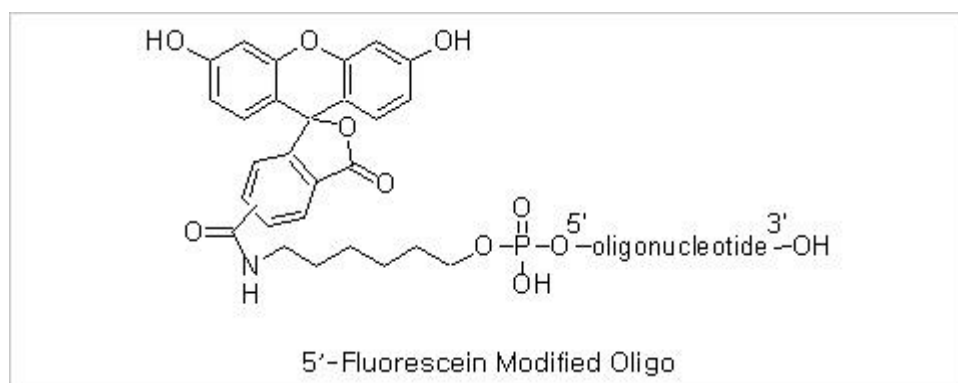
- Fluorescein

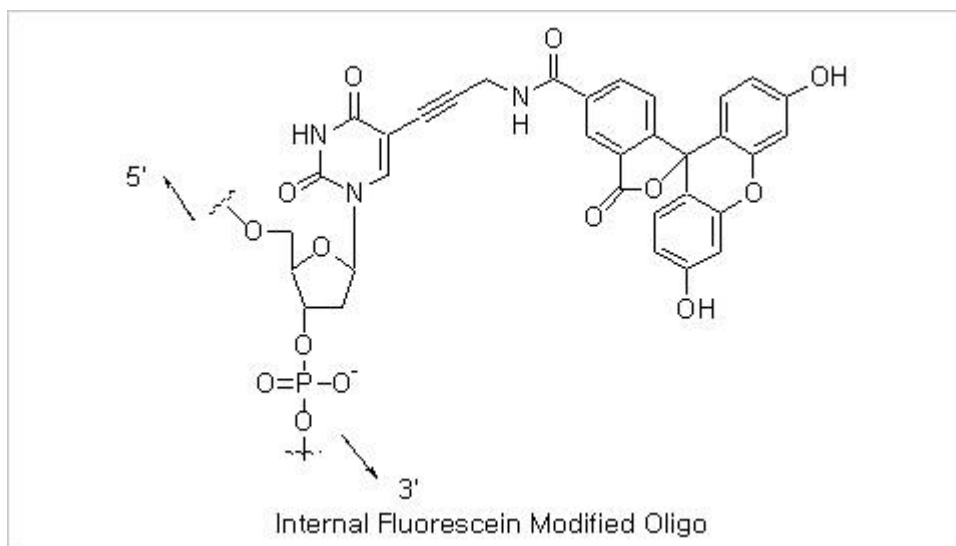
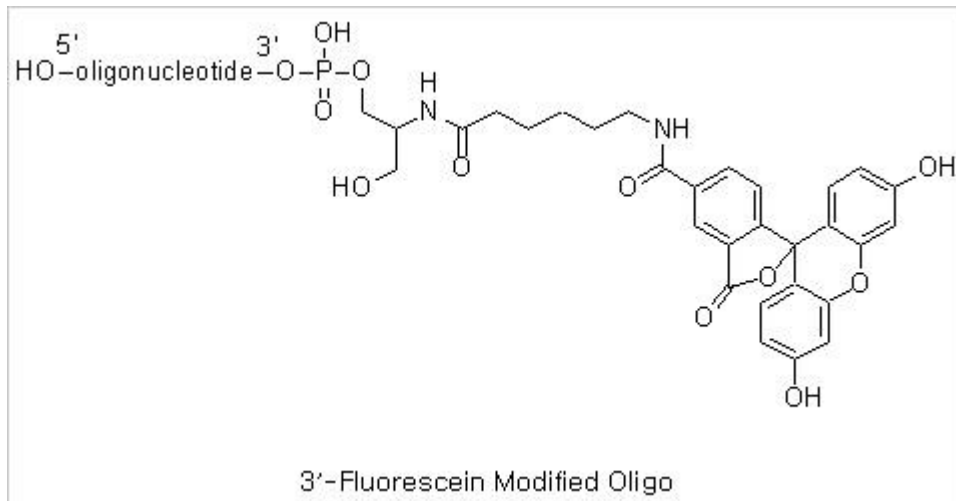
标准荧光素 (Reference standard) 之一，在其基础上进行结构改造，可产生一系列荧光素衍生物。

Fluorescein 适用于 Argon-ion Laser 的 488nm 光谱线，有相对高的荧光吸收，较好的荧光产率以及良好的水溶性。标记蛋白时通常不会产生蛋白沉淀。

与其他荧光素类衍生物一样，Fluorescein 具有光淬灭率高，pH 敏感性强与发射波谱宽的缺点。

主要应用于共焦激光扫描显微法 (Confocal laser scanning microscopy) 和流式细胞计应用 (Flow cytometry)。荧光素标记的寡核苷酸也广泛用于 DNA 自动测序、定量 PCR 与原位杂交等。





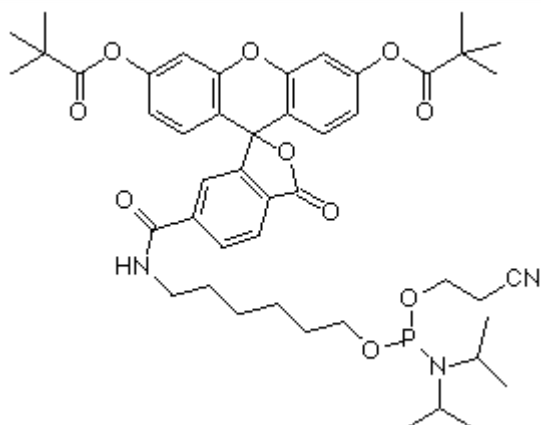
● **FAM**

羧基荧光素，Carboxyfluorescein，是荧光素衍生物的一种，5-FAM 较 6-FAM 更经常使用。Carboxyfluorescein-5-succimidyl ester，即 5-FAM (NHS) 广泛存在于荧光标记试剂盒。

与 FITC 相比，FAM 与氨基反应更快，产物也更稳定，但 FITC 结合蛋白的量更大且进程更易于控制。

FAM 也适用于 Argon-ion Laser 的 488nm 光谱线，Abs/Em=492/518nm (pH=9.0)，具有荧光素衍生物的普遍特性，在水中稳定。

5-FAM 主要应用于 DNA 自动测序中，标记其中的 d/ddCTP (PE 公司)，也经常用于 PCR 产物定量、核酸探针等。

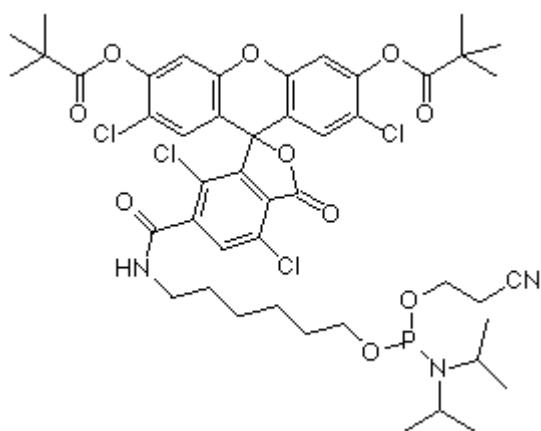


● TET

四氯荧光素，Tetrachloro fluorescein，是荧光素衍生物的一种。

TET 以及 HEX 均是在 FAM 基础上加以改进的，氯原子使 FAM 的 Abs 与 Em 值都产生一定的红移，并在一定程度上减弱了 pH 敏感性。TET 也适用于 Argon-ion Laser 激发光源，Abs/Em=521/536nm 。

TET, HEX, FAM 和 TAMRA 可配合用于 DNA 自动测序，其中 TET 用于标记 d/ddATP，HEX 用于标记 d/ddGTP 或 d/ddATP（PE 公司）

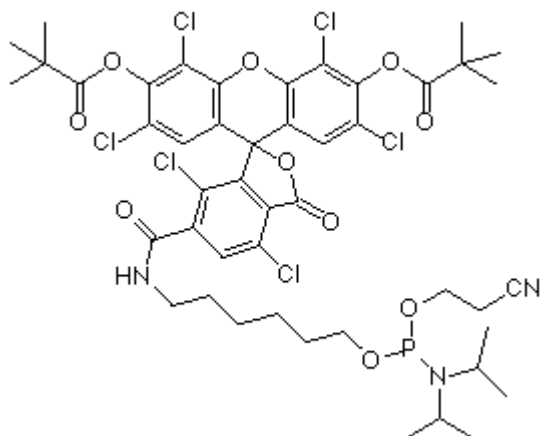


● HEX

六氯荧光素，Hexachloro fluorescein，是荧光素衍生物的一种。

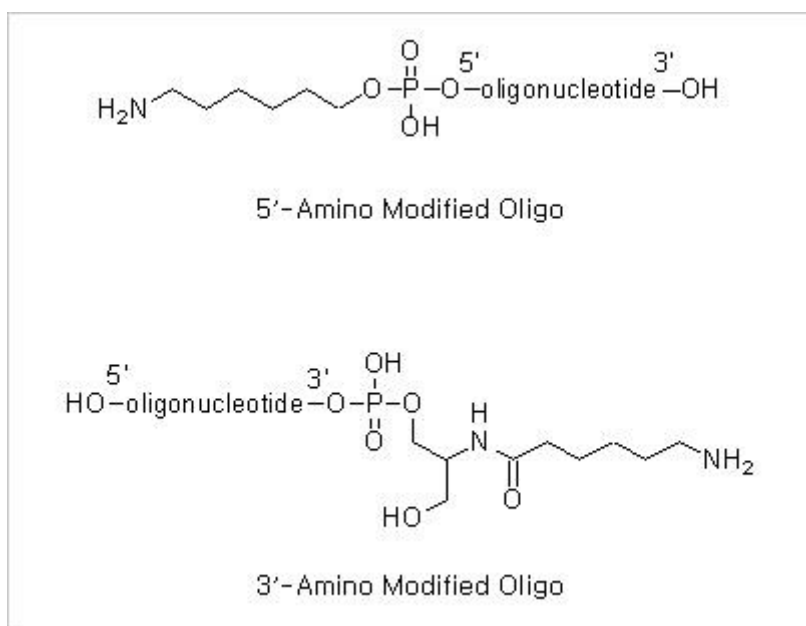
适用于 Argon-ion Laser 激发光源，Abs/Em=535/556nm 。

（请参见 TET 介绍）



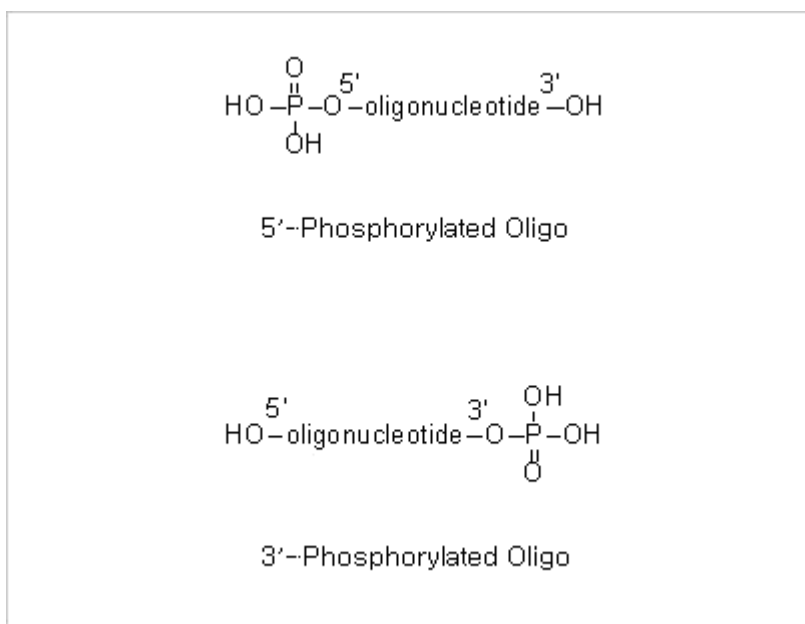
- **5' Amine & 3' Amine modification**

对寡核苷酸的 5' 末端或 3' 末端进行氨基修饰后，其末端附带的一级脂肪胺可连接氨基反应分子，氨基修饰的寡核苷酸也用于固定目的寡核苷酸在微阵列基质上。



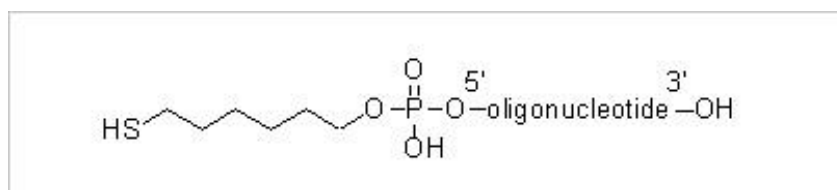
- **5' Phosphorylation & 3' phosphorylation**

5'端磷酸化修饰的寡核苷酸一般被用于定点突变和接头插入。



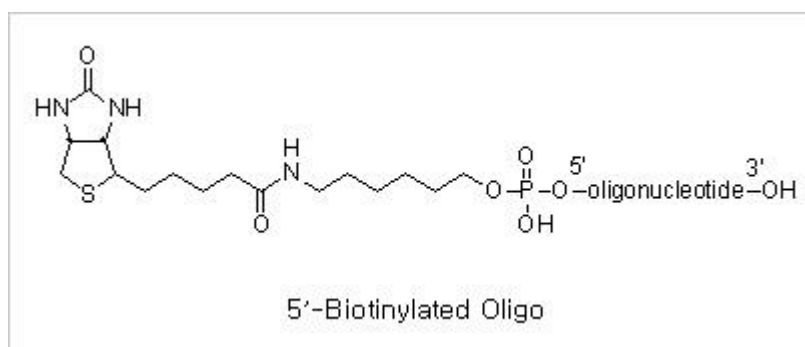
● **5' Thiol Modification**

5'端巯基修饰的寡核苷酸用于连接巯基反应分子，其巯基部分被偶联上荧光基团后，也用于 DNA 测序与杂交。



● **5' Biotin & Internal Biotin Modification**

生物素标记的寡核苷酸作为探针，用于 Southern 印迹杂交或染色体原位杂交及随后的显色检测。也可以用包被链霉亲和素（Streptavidin）的磁珠来捕获带有生物素探针的杂交核酸，用于限制酶切作图、基因组步移与差异显示。

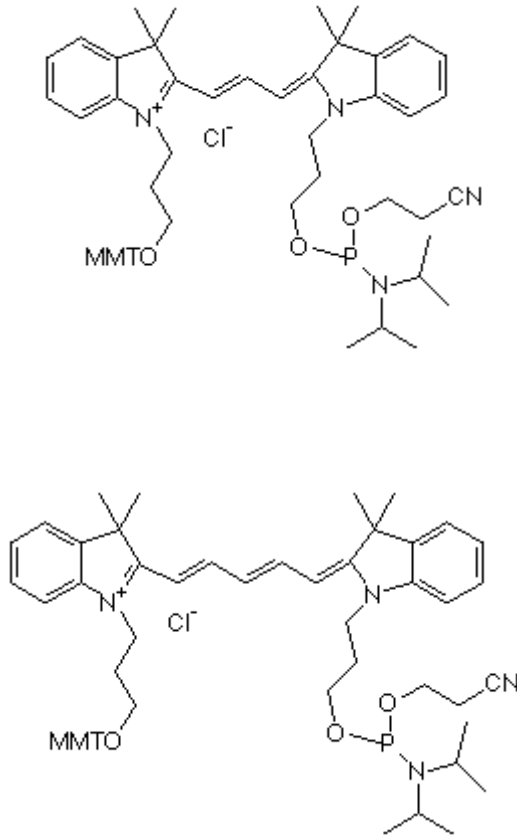


● **5' Cy3 & 5' Cy5 modification**

Cy3 与 Cy5 是新的荧光分子，具有很好的光稳定性、高水溶性和高荧光效率。

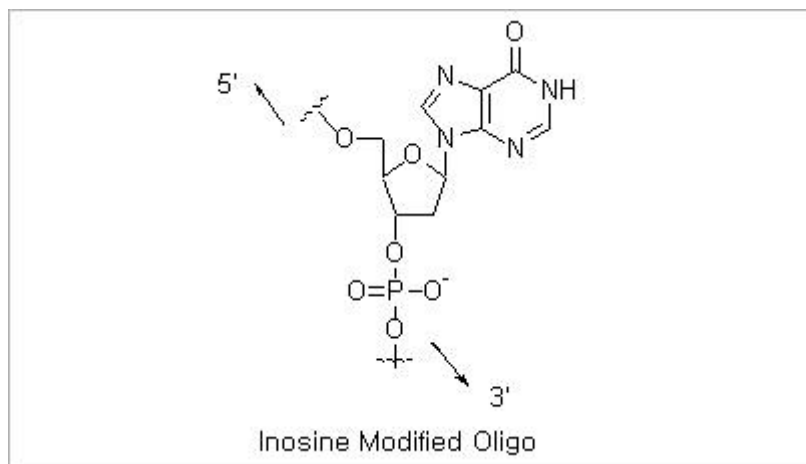


Cy3 与 Cy5 的激发光谱和发射光谱峰值分别为 548/562nm 与 646/664nm。Cy3 和 Cy5 的分子结构和分子量都非常相似，但两者之间的光谱却分得很开，因此，Cy3 和 Cy5 常用于很多双色实验中，如被广泛应用在基因芯片和蛋白质芯片领域。



● Inosine modification

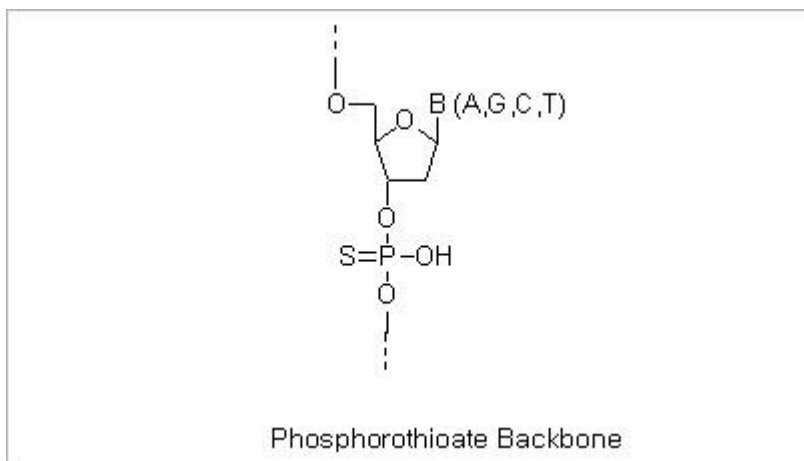
次黄嘌呤可与 C、A、T、G 稳定地配对，其配对的稳定性次序为 I:C>I:A>I:T=I:G。含有 I 的寡核苷酸已广泛用作杂交探针，以筛选 cDNA 和基因组文库，从而获得仅知部分氨基酸编码序列蛋白的基因。也可以成功地从复杂的 cDNA 和基因组中克隆到许多基因。





● Phosphorothioate modification

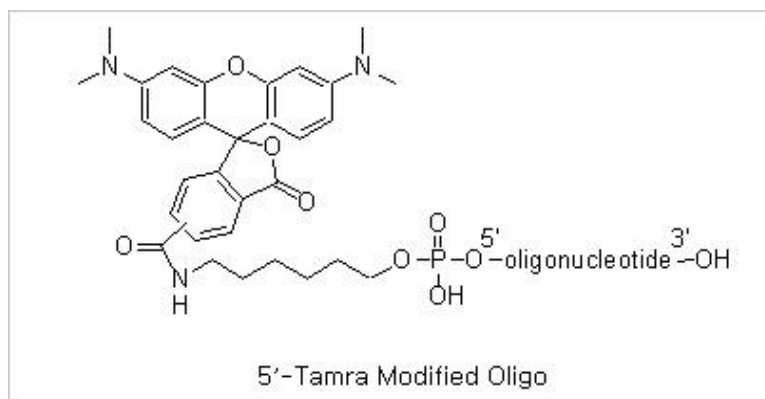
进行硫代磷酸酯寡核苷酸合成时,寡核苷酸间非桥键的等价氧之一被硫所取代,形成了一个手性硫代磷酸二酯,一种体内核酸酶代谢的拮抗剂,在细胞内可防止核酸酶的降解,增加 DNA 的稳定性。

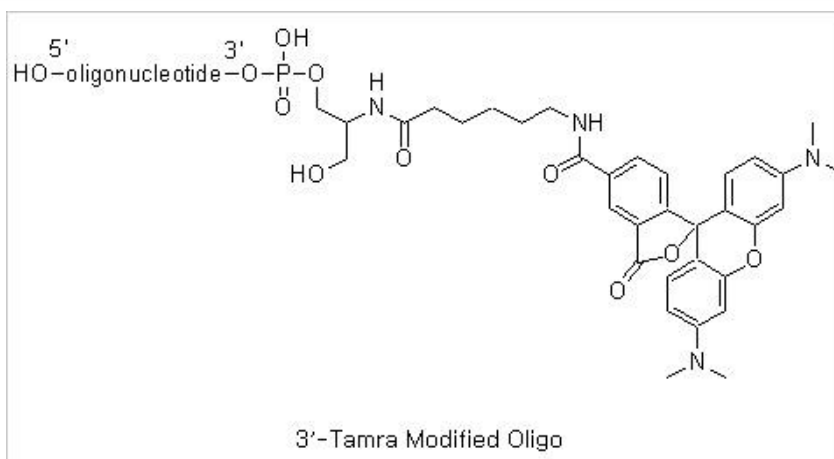


● 5' TAMRA & 3' TAMRA modification

与荧光素具有光淬灭率高、pH 敏感性强的缺点相比较, TAMRA 具有更好的光稳定性,而且 pH 在 4-10 之间时, TAMRA 的光谱不会受到影响。

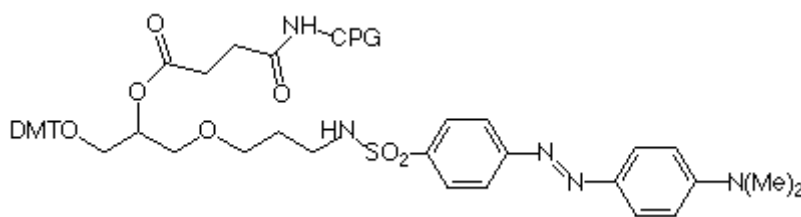
TAMRA 偶联物的荧光产率约为荧光素偶联物的 1/4, 然而 TAMRA 易于被 mercury-arc lamps 的 546nm 光谱线所激发, 且比荧光素具有更好的光稳定性, 因此, TAMRA 偶联物常常显示出比相应的荧光素偶联物更强的荧光。TAMRA 也可以被 green He-Ne laser 的 543nm 光谱线有效激发, 广泛用于分析仪器。TAMRA 标记的寡核苷酸也常用于定量与实时定量 PCR、DNA 测序等。





● 3'Dabcyl modification

当 Dabcyl 在空间上邻近荧光基团时，可以吸收能量使荧光淬灭，因此它在分子信标、分子淬灭探针中等得到广泛应用。



● TaqMan probes

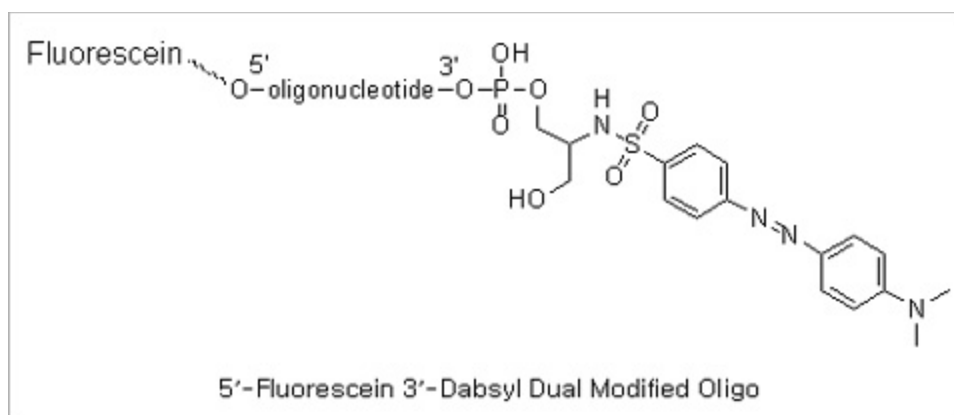
TaqMan 探针已被广泛用于实时定量 PCR 的实验中，以实现为目的基因的定量检测。这种探针通常为 20-24bp 的双标记荧光寡核苷酸，在它的 5'末端标记一个荧光基团（FAM,HEX 或 TET），3'末端标记淬灭基团（通常为 TAMRA），3'末端一般用 PO₄、NH₂ 或封闭碱基予以封闭，以防在扩增时作为引物延伸。这种标记的寡核苷酸加入到含有引物的 PCR 反应管中，一起进行靶序列的扩增。当荧光基团和淬灭基团二者同时紧密地并置在一个完整的杂交探针上时，在实时 PCR 过程中从染料报道分子的任何发射均由淬灭染料所吸收，因而荧光发射是低的。由于扩增反应的进展，靶 DNA 的含量的增加，寡核苷酸探针与变性靶 DNA 的杂交的数量也持续地增加。在 PCR 循环的延伸阶段，利用热稳定 DNA 聚合酶的 3'-5'聚合酶活性及 5'-3'外切核酸酶活性，可以在链延伸过程中实现链替换，并切割探针的荧光基团，因为切割下的荧光基团不再靠近淬灭基团，开始发出荧光，荧光的强度是直接与 PCR 过程中合成的靶 DNA 的浓度成比例，配合使用 PCR 扩增与荧光检测合二为一的仪器，可进行实时（real-time）定量检测。

● Molecular beacons

Molecular beacon 探针的原理与 TaqMan 探针一样，不同的是其探针由一条具有发夹



结构的寡核苷酸构成。环形部分的碱基序列与靶序列互补；茎部分是由互相配对的碱基组成，但它不能与靶序列相配对。在 **Molecular beacon** 的 5'末端和 3'末端标记有荧光基团和淬灭基团，在室温时发夹紧闭，两者之间的距离相当近，荧光淬灭。当 **PCR** 反应进行到退火步骤时，环形部分伸展，荧光基团与淬灭基团分开，荧光信号得以检测，从而实现了对目的基因的定性及定量检测。



缩写	全称	吸收波长	发射波长	颜色
Fluorescein	Fluorescein	494nm	525nm	Green
FAM	6-carboxy-fluorescein	492nm	518nm	Green
TET	5-tetrachloro-fluorescein	521nm	536nm	Orange
HEX	5-hexachloro-fluorescein	535nm	556nm	Pink
Cy3	Indodicarbocyanine	552nm	570nm	Red
Cy5	Indodicarbocyanine	643nm	667nm	Violet
TAMRA	Tetramethyl-6-carboxyrhodamine	560nm	582nm	Rose
ROX	6-carboxy-x-rhodamine	587nm	607nm	Red

化学合成的 Oligo 用于克隆须知

不管化学合成的 oligo DNA 为短片段还是长片段，只要用于 PCR 克隆，最好对 Oligo DNA 粗制品进行纯化。尽管如此，客户还是须考虑如下风险：

1. 内部缺失 (n-1, n-2, etc) 产物。这是化学合成 DNA 最普遍与最主要的限制因素，且不能通过纯化 oligo DNA 来解决这个问题。化学合成 DNA 不及活细胞内 DNA 复制具有高保真性。在活细胞内存在大量的校正与修复系统，将碱基突变率降低至 $1/(1 \times 10^6)$ 甚至 $1/(1 \times 10^9)$ 以下。PCR 反应也具有较高的保真度，例如：错误率在 1/1000 或 1/10000。PCR 反应可通过 DNA 聚合酶的性能提高保真度。但是化学合成 DNA 与活细胞及 PCR 反应扩增 DNA 不同，每次合成循环的错误率约为 1/100，主要包括以下几



方面的因素：

- 1) Oligo DNA 的化学合成是碱基与碱基之间通过化学反应偶联而成，而化学反应的偶联效率一般在 99% 左右，也就是说，在每次进行偶联反应时，都会有 1% 的 DNA 片段附加不上新的碱基，对这种截断的失败序列，为了防止其参与后续的偶联反应，采用 CapA 与 CapB 进行化学封闭，以阻断其延伸，但化学封闭反应的效率不可能达到 100%，导致合成失败的 DNA 片段或截断序列残留在合成的 DNA 粗制品中。
- 2) Oligo DNA 的不完全脱保护。寡核苷酸的完全脱保护包括从磷酸酯基团、碱基上的环外氨基和 5'-OH 部分上去掉保护基团。脱保护的化学反应效率不可能达到 100%，未脱保护的碱基无法参加偶联反应而导致 oligo DNA 内部缺失碱基。
- 3) 不断延长的 DNA 链与不断减少的合成试剂会干扰 oligo DNA 的化学合成。

对于以上三方面问题，至今为止还没有找到一个完美的试剂给予解决。因为延长盖帽时间也不能保证封闭反应效率达到 100%；而对于脱保护反应来说，增加脱保护试剂量及延长脱保护时间又会导致 oligo DNA 脱嘌呤。因此只能采取折衷方法将不完全脱保护与脱嘌呤同时控制在低水平上。内部缺失碱基的截断序列绝不可能 100% 去除干净，对于几种纯化方法来说，OPC 或 HPLC 不可能去除内部缺失碱基的截断序列，最好的方法是通过 PAGE 纯化降低截断序列数量。

OPC 与 HPLC 纯化法是通过两种不同形式的柱层析方法对 oligo DNA 进行纯化，PAGE 纯化法是使用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行纯化，但都不易将缺失一个碱基 (n-1) 或两个碱基 (n-2) 的 oligo DNA 与全长 oligo DNA 分离。柱层析与 PAGE 对于分析检测少量的 oligo DNA 是一种合适的手段，但作为纯化制备目的 DNA 片段，并不是非常有效。因此，在合成的目的 oligo DNA 中，总会存在少量的截断序列。由于这些错误的随机性（不同分子有不同的碱基突变，同时多数分子没有碱基突变），这种序列的错误率通常对普通 PCR、测序或杂交不会存在问题，对于合成不太长的序列，更是如此。然而，克隆过程是单个 oligo DNA 分子的选择与扩增过程，若单个亲本分子存在序列错误，那么单克隆中所有分子都存在相同的序列错误。

2. 单核苷酸的插入是存在于目的 oligo DNA 产物中的另一种常见的序列错误。

当同一 oligo DNA 分子中存在 G-偶联或单碱基插入 (n+1) 同时又存在单碱基缺失 (n-1) 时，此条 oligo DNA 的长度与目的 DNA 分子的长度相同，因此无法通过 OPC、HPLC 或 PAGE 纯化将此“失败序列”去除。

3. OPC、HPLC 特别是 PAGE 是产率损耗很大的纯化方法，因此会导致低产量（OPC 与 HPLC 的得率约为 30%~50%，PAGE 的得率约为 10%~30%），主要的原因是大量的目的 oligo DNA 分子（全长与正确的 oligo DNA）在纯化过程中会随着失败序列一起



被去除。

Oligo DNA 化学合成存在的这些弊端曾被 Hecker KH 与 Rill R 报道过(Error analysis of chemically synthesized polynucleotides. *Biotechniques*, 1998 Feb; 24: 256-260)。在这篇文章中, 作者合成并 PAGE 纯化了长链 oligo DNA, 用它们进行 PCR 克隆, 然后测序鉴定了 10 个克隆, 发现存在 7 个单碱基缺失, 一个连续的 4 个碱基缺失, 一个 G-C 替换。除了这些碱基错误, 其它学者还曾报道存在 G-偶联、分支及其 n+x 产物。

解决这些碱基出错的方法:(1)对 oligo DNA 粗制品进行纯化。不仅要通过 OPC、HPLC、PAGE 等方法对 oligo DNA 进行纯化, 而且需要优化化学合成方法来提高 Oligo DNA 的纯度。(2)当 OPC、PAGE 或 HPLC 纯化的 oligo DNA 用于 PCR 克隆时, 可能会存在一些序列错误的“突变”克隆(这些碱基错误的克隆可能源于 oligo DNA 的合成)。因此, 我们建议客户多挑几个克隆(而不仅仅是一个或两个克隆), 一般情况下会挑到正确的克隆。(3)减少转化后温浴时间(未加抗生素)。因为在未加抗生素情况下, 延长温浴时间可能会导致单个突变克隆的扩增。(4)挑克隆时, 应挑选分隔良好、新鲜的、不太大的单菌落。(5)若可能, 尽量使用较短的 oligo DNA, 避免合成长链 oligo DNA。

客户不要因上面的警告而感到合成 oligo DNA 出错的风险无法避免。其实, 挑到正确克隆的可能性很大, 特别是对 oligo DNA 进行纯化后, 情况更是如此。如果测序后发现 oligo DNA 出现错误, 公司免费重新合成。上面所提出的建议仅仅是帮助客户理解目前 oligo DNA 化学合成所存在的问题, 对客户订购与使用 oligo DNA 时提供一些帮助。

常见问题及参考意见

● Oligo DNA 制品的形态

Oligo DNA 制品呈现白色粉末或无色透明均为正常形态。我公司提供的 oligo DNA 制品为白色粉末或絮状物, 一方面客户能肉眼观察到白色制品, 另一方面保证 oligo DNA 能即刻溶解。但由于 oligo DNA 制品受空气中水份的影响, 制品被潮解而吸附于离心管壁或管盖上, 呈现无色透明状或难以观察到, 遇到这种情况时请在使用前先离心收集 oligo DNA 制品于管底, 然后溶解 oligo DNA 制品。

● 如何稀释 oligo DNA 制品?

收到 oligo DNA 后, 首先请短暂离心, 收集 oligo DNA 制品于管底, 然后慢慢打开管盖, 加适量的无菌超纯水或 TE 缓冲液, 盖上管盖, 充分上下振荡或用手指弹管底, 使 oligo DNA 充分溶解。相关的说明及数据请参照我公司的 DNA 合成报告单。下面举例说明:

例: 您得到一管标为 5 OD₂₆₀ 的 20mer Oligo DNA:

TGG GCG GCG GTT GGT GTT AC



$$A=1 \quad C=3 \quad G=10 \quad T=6$$

$$MW=(1 \times 312)+(3 \times 288)+(10 \times 328)+(6 \times 303)-61=6213$$

关于分子量，您也可以采用平均分子量的近似算法：

$$MW=20 \times 324.5=6490$$

$$\text{质量数}=5 \times 33=165\mu\text{g}$$

$$\text{摩尔数}=165/6490=0.025\mu\text{mol}=25\text{nmol}$$

若加入 250 μl 超纯水溶解，则浓度为：25nmol/250 μl =100 μM =100pmol/ μl

- **怎样制备 100 μM 的储备液？**

体积 (μl) = DNA 合成报告单上的 nmol 数目 \times 10

- **Oligo DNA 制品如何保存？**

- 1) Oligo DNA 干燥制品很稳定，常温下可保存数月，但最好置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。
- 2) 溶解后的 DNA 溶液可于 4 $^{\circ}\text{C}$ 短期保存，长期保存请置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 。在溶解和使用 DNA 溶液时，请避免核酸酶污染，减少 DNA 溶液的反复冻融。
- 3) 荧光标记 oligo DNA 对光敏感，在日光下荧光强度会降低。为了保持荧光标记 oligo DNA 的荧光效率，请于-20 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。Cy3 与 Cy5 在溶液 pH>9 的条件下会发生分解，所以稀释 Cy3 与 Cy5 标记的 oligo DNA 时请注意溶液的 pH 值。

- **Oligo DNA 制品在常温下放置了一周还能正常工作吗？**

Oligo DNA 的干燥制品是非常稳定的，即便在溶液中也稳定。一般情况下，只要没有核酸酶、细菌等的污染，oligo DNA 制品于常温下放置一周仍然能够正常工作，但长期保存请最好置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 。

- **Oligo DNA 制品可以用琼脂糖凝胶电泳检测吗？**

由于化学合成的寡核苷酸所具有的特性，不能使用 agarose gel 及 EB 染色方法进行质量和浓度检测，必要时请使用变性 PAGE 电泳检测。主要原因如下：

- 1) Oligo 是单链 DNA，容易形成立体结构。跑琼脂糖凝胶电泳时，容易出现多条带。
- 2) Oligo 为单链，而 EB 染色是嵌入到 DNA 双链的碱基之间。因此，单链 DNA 形成的立体结构越复杂，EB 染色就越容易，DNA 条带就越亮。如果单链 DNA 不形成立体结构，EB 就无法染色。

- **长度相同、碱基组成不同的 oligo DNA 进行变性 PAGE 电泳时，电泳带应该在同一位置吗？**



对于短链 DNA 来说，会有差异，但长链 DNA 差别很小，主要原因如下：

- 1) A、G、T、C 组成不同，电泳速度不同。
- 2) DNA 立体结构不同，电泳速度不同。

● **含有较长的连续鸟嘌呤的寡核苷酸可以合成吗？**

我公司成功的合成过含有连续 15 个鸟嘌呤以上的寡核苷酸。

高嘌呤含量的寡核苷酸，特别是含有较长的连续鸟嘌呤的寡核苷酸，有发生聚集的倾向而形成 **guanine tetraplex**，纯化时需要较强的变性条件，而变性剂往往会危害到寡核苷酸的具体应用。通过 Inosine 替换其中的一些鸟嘌呤，可一定程度降低 **guanine tetraplex** 的形成。

● **如何制备双链 DNA？**

- 1) 用退火缓冲液（10mM Tris pH8.0, 50mM NaCl, 1mM EDTA）溶解单链 DNA，浓度为 1-5 OD/100 μ l。
- 2) 将两条互补单链等摩尔数混合。
- 3) 94 $^{\circ}$ C 温浴 2-5 分钟，然后缓缓冷却到室温（25 $^{\circ}$ C 以下）。
- 4) 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

● **普通合成的 oligo DNA 5'末端带磷酸基团吗？**

不带磷酸基团。Oligo DNA 的 5'末端和 3'末端均为-OH 基。如果合成 oligo DNA 时需要带磷酸基团，请特别注明，同时我公司需收取磷酸化修饰费用。

● **合成的 Oligo DNA 多次 PCR 无目的产物**

如果 PCR 后无目的产物，可以从以下几方面寻找原因：

- 1) Oligo DNA 设计是否合理。
- 2) Oligo DNA 和模板是否配对或同源性有多大。
- 3) PCR 反应试剂是否存在问题：模板 DNA、DNA 聚合酶、Mg²⁺、dNTPs、oligo DNA 等。
- 4) PCR 仪是否正常工作。
- 5) 退火温度及其它反应条件是否优化。
- 6) 模板是否存在复杂结构：GC 含量高、重复序列等。

影响 PCR 失败的因素很多，可从多方面分析考虑，若仍然扩增不出带，可要求我公司重新合成 oligo DNA，以排除合成因素的影响。

● **常用简并 oligo DNA（混合碱基）的代码：**



M= (A/C), W= (A/T), H= (A/T/C), V= (G/A/C), D= (G/A/T), Y= (C/T), K= (G/T), S= (G/C), B= (G/T/C), N= (A/G/C/T), R= (A/G)。

● 简并性 oligo DNA 对 PCR 扩增的影响

通常一条 oligo DNA 中简并的碱基不要超过 4 处，如果简并的碱基数过多，则会造成反应体系中有效 oligo DNA 的量相对减少，此时应适当增加 oligo DNA 的使用量。但 oligo DNA 量过大，容易引起非特异扩增，应加以注意。

● 琼脂糖凝胶分析 PCR 产物时观察到非特异条带，为什么？

可能原因	建议解决方法
形成引物二聚体	设计在 3'端没有互补序列的引物。
引物与模板非特异性退火	1) 以 2℃ 间隔增加退火温度，减少退火时间。 2) 在开始几个循环使用较高的退火温度，然后使用较低的退火温度。 3) 采用 Hot start 法或 Cool start 法。
镁离子浓度太高	对于每一个模板和引物组合优化镁离子浓度。
污染外源 DNA	在 PCR 过程中使用良好的实验步骤减少污染源。
因为二级结构导致引物结合位点无法接近	对于 GC%>50%模板，使用改善模板 GC 含量的优化剂。
引物设计不合理	1) 改变引物的位置，增强特异性。 2) 增加引物长度，增强特异性。
模板 DNA 量过多	模板 DNA 量 20% 递减

● 进行反义 DNA (antisense DNA) 实验时，对 DNA 链是采取点硫代还是全程硫代修饰？

进行硫代磷酸酯寡核苷酸合成时，寡核苷酸间非桥键的等价氧之一被硫所取代，形成了一个手性硫代磷酸二酯，一种体内核酸酶代谢的拮抗剂。特定的片段使特定基因表达中的 mRNA 转录无效，这种现象被称为“反义效应”。

为了取得最好的保护效果，许多学者将整条链进行硫代修饰，但这样会使碱基的配对效率降低。因此，通常将片段的两端进行硫代修饰，这样也可取得良好的保护效果，同时又可避免中央片段配对效率的降低。但具体的实验方案须根据您的实验目的及要求决定。

● PCR 产物经克隆后测序发现 oligo DNA 处碱基有误，为什么？

- 1) PCR 过程的错配：DNA 聚合酶忠实性低、循环数太多、四种 dNTP 的浓度不同都可能导致在 PCR 产物序列中 oligo DNA 错误。
- 2) 克隆过程中引起的突变。



- 3) 测序导致的错误。
- 4) 合成仪管路的瞬时阻堵, 结果引起单个碱基或一部分碱基缺失。
- 5) 计算机程序失灵导致错误合成。
- 6) 碱基在偶联到 DNA 片段之前, 碱基与碱基之间发生了偶联, 然后再附加到了 DNA 片段上, 导致多碱基现象。
- 7) 合成过程中出现脱嘌呤, 对脱嘌呤后的碱基, DNA 聚合酶不能识别, 可能导致 PCR 后出现 A 或 G 缺失。
- 8) 脱保护不完全导致碱基缺失。
- 9) Capping 反应不完全, 截断 DNA (n-1) 继续参与后续合成, 导致缺失碱基。

出现以上情况的概率极低, 您可以通过多挑几个克隆得到解决; 您也可以通过点突变的方式予以纠正。如果这两种方式您不愿意做, 我们可以提供免费合成一次。

● **能保证合成的 oligo DNA 100%正确吗?**

不能。Oligo DNA 的合成是化学反应的过程, 由于化学反应的特性, oligo DNA 的纯度不可能是 100%, 因此多测几个克隆, 也许会挑到正确的克隆。

● **怎样保证合成 Oligo DNA 的高正确率?**

- 1) 选用高纯度 oligo DNA。
- 2) 选用小于 35mer 的 oligo DNA。
- 3) 进行克隆实验时需进行测序验证, 尤其进行蛋白表达实验时更须如此。

● **PCR 产物可以直接克隆吗?**

PCR 用 oligo DNA 的 5'端为-OH, 因此扩增后的 PCR 产物 5'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。建议对 PCR 用 oligo DNA 的 5'端进行磷酸化修饰或对 PCR 产物的 5'端进行磷酸化处理。

北京赛百盛基因技术有限公司

全国统一热线: 400 666 3029

地址: 北京市海淀区上地四街 1 号院 2 号楼 202 室 邮编: 100085

电话: 010-62969345/46, 010-82784296/92 传真: 010-82784290

Email: info@sbsbio.com

<http://www.sbsbio.com>