**2017年工作总结**

转眼间在公司的引物部已经工作了三年多的时间，现在对引物生产的整个流程比较熟悉。本次总结先对引物合成作一个简要的介绍，然后对公司引物生产的整个流程及一些需要注意的问题做一个比较全面的总结，希望对部门今后的发展有所帮助。

###### 引物合成简介

引物合成是利用化学的方法合成特定的已知序列的寡核苷酸片段，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，由待合成引物的3'端向5'端合成延伸，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：

1) 用三氯乙酸去除固相载体5'-羟基的保护基团DMT，获得游离的5'-羟基；

2) 将亚磷酰胺保护的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，与固相载体上游离的5'-羟基发生缩合反应；

3) 由于可能有极少数5'-羟基没有参加反应，所以一般用乙酸酐和1-甲基咪唑试剂将其封闭，以防止其在随后的循环反应中被延伸；

4) 在氧化剂碘液的作用下，亚磷酰形式转变为更稳定的磷酸三酯。

经过以上四个步骤，一个脱氧核苷酸就被连接到固相载体上。重复以上步骤，直到所有要求合成的碱基连接完成，最后再用三氯乙酸去除5'-羟基的保护基团DMT。合成过程中可以监控脱下的保护基团DMT的颜色以初步判定合成效率。

寡核苷酸合成后，通过氨解使寡核苷酸从固相载体上分离，2-氰乙氧基-磷酸二脂键的保护基团以及碱基的保护基团基（苯甲酰基和异丁基）被去除，从而形成天然的DNA结构。

氨解后寡核苷酸混合物还包含几种必须被去除的小分子有机化合物。所有非必须有机化合物被移除的过程通常叫做脱盐。尽管脱盐纯化可以移除所有的非必须有机杂质，但它不能移除合成中产生的提前终止的寡核苷酸杂链,所以纯度要求比较高的引物还需要进一步纯化。

目前我们对引物进一步纯化的方式有PAGE纯化及HPLC纯化这两种。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。PAGE纯化是一种非常有效的DNA纯化方法，纯化后的DNA纯度大于98%，对长链Oligo DNA (大于50 mer)的纯化特别有效。但它在额外的步骤方面有一些缺陷，比如在PAGE之后需要脱盐，继而将导致纯化产率的下降。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。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。

###### 引物生产流程

###### 我们生产引物主要的基本流程为：邮箱接收订单→订单录进系统→上机合成→氨解→纯化→定量→分装→烘干→包装，下面作详细的介绍。

2.1订单录进系统

客户发过来的引物序列需要录进系统才好安排上机合成及对账等，具体操作步骤如下：

1) 把客户名，引物名称，引物序列复制到引物登记表对应的位置上，同时把客户发过来的附件保存好。

2) 点击系统上的录入订单，输入客户名后点提交。

3) 系统显示多个客户信息时需要选择与订单上相对应的，然后从引物登记表复制引物信息，粘贴后点提交系统。

4) 提交系统后输入要求合成的OD值、分装管数、纯化方式以及订单来源后再点提交系统即可。

**2.2上机合成前表格整理及贴标签**

**2.2.1**分配合成：当引物条数足够多或者到时间点时就要安排上机。此时在系统上选择要准备上机的引物并分配到对应的批次。

**2.2.2**合成上机表：从系统导出上机表后把相应的信息复制到上机模板中，根据情况看是否需要排序，最后文件名另存为相对应的批次号。

**2.2.3**合成操作表：从系统上导出操作表后把相应的信息复制到与上机表顺序对应的操作表模板中，另存为相对应的批次号后打印操作表。

**2.2.4**测量OD表：从系统导出标签表后把相应的信息复制到测量OD表模板上,另存为相对应的批次号。

**2.2.5**贴标签：把标签表另存为相对应的批次号后把相应的信息复制到标签格式表上并保存，然后打印管壁标签及管盖标签，最后对着操作表贴标签。

**2.3上机合成**

合成是合成仪根据设定的程序及导入的上机表自动合成引物序列。目前实验室有两台DNA合成仪，但无论采用哪台机器合成，合成的原理都相同，主要差别在于试剂消耗量的不同和单个循环用时的多少。国产机的优点是打试剂的频率比较快，所以合成所需的时间较短，缺点是所合成引物质量的稳定性比较差，对单体及氩气的消耗量较大，密封性不是很好导致合成时气味较大。Dr.Oligo192合成仪稳定性较好，也比较智能化（如导入的上机表有问题时会有提示，气压不够时会自动暂停），缺点是合成所需时间较长。

**2.3.1上机前准备工作**

1) 清洗合成仪，Dr.Oligo192合成仪需要检查密封膜是否挡到喷头。

2) 检查是否需要添加试剂。

3) 检查氩气量是否充足。

4) 检查废液桶是否需要更换。

5) Dr.Oligo192合成仪需要检查是否在试剂档。

6) 上机前打流量并检查流量是否正常。

**2.3.2上机时操作**

1) 把上机表导入合成程序中。

2) 根据上机表上的引物条数在合成板上捶好合成柱后把合成板置于60℃烘箱中约5分钟。

3) 把合成板固定在合成仪的合成槽上。

4) 密封好合成仪后开始运行程序。（开始合成时要仔细观察打到合成柱里的试剂是否都正常吹干，存在吹不干的情况时要及时暂停程序并分析原因；Dr.Oligo 192合成仪上机后需要接DMT并观察颜色是否正常。）

**2.3.3下机时操作**

1) 打开密封盖并取出合成板。（Dr.Oligo192合成仪下机前需要接DMT并观察颜色是否正常。）

2) 用乙腈清洗合成板及合成柱上残留的试剂，待氨解前处理。

3) 清洗合成仪。

**2.4氨解前处理**

氨解前处理主要是为了清洗合成柱及合成板上残留的试剂，具体操作步骤如下：

1) 往每个合成柱各加入70%甲醇500ul（每个合成柱的容量约400ul，所以有一部分会溢出流到合成板上），平衡后离心（转速2000转，时间2min，下同），离心后倒掉合成板以及废液板上的液体。

2) 重复步骤1。

3) 往每个合成柱各加入400ul DDH2O，离心。

4) 往每个合成柱各加入200ul 100%乙腈，离心。

5) 将合成板内液体吸干，待氨解。

**2.5氨解**

氨解的作用一是使连接在固相载体上的引物被切割下来；二是脱保护基（磷酸二脂键上的保护基团以及碱基上的保护基团基）。具体操作步骤如下：

1) 往氨解仪中加入100ml氨水和甲胺（1:1）的混合液，然后放入合成板并密封好。

2) 将氨解仪放入80℃水浴锅中（水位比氨解仪的密封垫低一点），待压力达到0.35MP后开始计时,氨解1h。

3) 氨解好之后将氨解仪放入冷水中（水位大概是氨解仪高度的1/3）冷却，待压力低于0.1MP后打开氨解仪，取出合成板。

4) 将合成板放入75℃烘箱中烘干约30min，待氨解后处理。

**2.6氨解后处理**

氨解后处理的作用是脱盐（即引物的DSL纯化）以及对引物的回收。（氨解之后合成柱里还包含几种必须被去除的小分子有机化合物，所有非必须有机化合物被移除的过程通常叫做脱盐。）具体操作步骤如下：

1) 往每个合成柱各加入400ul 100%乙腈,离心。

2) 往每个合成柱各加入200ul 90%乙腈,离心。

3) 重复步骤2。

4) 重复步骤2。

5) 往每个合成柱各加入200ul 90%乙腈,静置2min后离心。

6) 用收集板（新的96孔板，提前在上面做好标记）替换废液板，往每个合成柱各加入150ul洗脱液,静置5min后离心以收集引物，待测OD值。

**2.7引物的定量、分装、包装**

1) 测量板每个孔各加入195ul的DDH2O，用酶标仪测在波长为260nm时的光密度, 把测好的数据粘贴到测量表对应的位置上。

2) 测量板每个孔再对应加入5ul的引物，再用酶标仪测在波长为260nm时的光密度，同样把测好的数据粘贴到测量表对应的位置。

3) 测量表根据设置好的公式自动算出每条引物的OD值，在分装表上显示各自对应的分装体积。

4) 打印分装表，普通引物按照分装表上的数据把收集板上的引物分装到对应的EP管中，放入75℃烘箱中烘干；需要做PAGE或HPLC纯化的引物则还不能分装。

5) 引物干了后盖好盖子并包装到对应的袋子或盒子中，待发货。

**2.8引物的质检**

现在做的是抽样跑胶，具体操作步骤如下：

1) 预电泳：把提前做好胶板固定在电泳槽后倒入1%TBE缓冲液（缓冲液没过胶孔即可），电流调到25mA（胶板每增加一块，电流增加25mA）,600V电压预电泳20min。

2) 点样：尿素板每个孔先加入4ul左右的水,再加入0.2OD的引物，用沸水泡5min后按顺序在胶孔上点样。

3) 电泳：点样后把电流调到10mA（胶板每增加一块，电流增加10mA）,慢速电泳10min，使胶孔的引物跑到胶里；慢跑后再把电流调到25mA（胶板每增加一块，电流增加25mA）, 等marker条带跑过胶的2/3的位置时停止跑胶。

4) 剥胶拍照：电泳后先回收电泳槽上的缓冲液，拆胶板后把胶块倒扣在保鲜膜上，然后置于荧光TLC板上检测带型并拍照。

5) 编辑胶图并分析引物质量，引物条带不正常的需要安排重合。

**2.9引物的PAGE纯化**

60bp以上的引物一般需要做PAGE纯化，具体操作步骤如下：

1) 取样抽干：从收集板中吸取客户所订购引物OD值约5倍的量到已做好标记的EP管中，然后抽干。

2) 样品处理：往抽干后的样品中加入100ul饱和尿素溶液，充分震荡溶解后用沸水泡5min使引物变形。

3) 上样跑胶：将样品缓慢加入已提前预电泳的PAGE胶槽内，等marker条带跑过胶的2/3的位置时停止。

4) 切胶回收：在荧光TLC板上用干净的刀片将引物主带所在位置的胶块割下，将胶块置于已提前做好标记泡胶管中，加入约4ml0.5mol/L的NaCl溶液使胶块完全浸泡在里面，盖好管盖后置于80度水浴锅中至少3h使胶块里的引物析出到NaCl溶液中。

引物析出之后需要用C18柱去除NaCl。

5) C18柱活化：往C18柱中加入5ml80%甲醇，快速抽干后再重复做一次。

6) 柱子平衡：往C18柱中加入5ml0.5mol/L的NaCl溶液，慢速抽干。（不需要抽太干）

7) 样品吸附：将泡胶管里的溶液加到已平衡好的C18柱中，泡胶管管口置于C18柱下面，慢速抽干使样品从C18柱里慢慢滴出来后再重复做一次。

8) 脱盐：往C18柱中加入8mlDDH2O,快速抽干后再重复做9次。

9) 收集引物：拿干净的收集管置于C18柱下面，往C18柱中加入2ml60%甲醇，慢速抽干使引物充分冲洗下来。

10) 测量分装：测量板每个孔各加入1801ul的DDH2O，用酶标仪测在波长为260nm时的光密度, 把测好的数据粘贴到PAGE专用测量表对应的位置上；测量板每个孔再对应加入20ul的引物，再用酶标仪测在波长为260nm时的光密度，同样把测好的数据粘贴到测量表对应的位置；测量表根据设置好的公式自动算出每条引物的OD值及每OD的体积，根据每条引物所需的OD量进行分装；分装好的引物再拿去抽干，干了后包装，待出货。

11) 清洗柱子：往C18柱中加入5ml80%甲醇，快速抽干，然后再加入5ml80%甲醇让其慢慢滴下来即可。

###### 需要注意的问题

3.1订单录进系统时需要注意的问题

1) 录单时需要仔细核对订单上的客户信息跟系统上保存的是否一致。存在不同客户名字一样或同一个客户更换了单位的情况，如果没仔细核对就容易导致订单上客户信息的出错。

2) 最后一次提交系统前要注意核对引物条数，序列等信息是否跟订单上的一致。引物名称中含有3'、5'、冒号等特殊符号时不能正常录进系统，如果没有认真核对就会导致这些引物的遗漏。另外，有些客户发过来的引物序列格式不够规范造成引物录进系统后序列上多一个数字160，这种情况偶有发生，如不能及时发现并修改就可能导致这条引物合成的出错。（用Dr.oligo192合成仪合成时会有提示，可以及时修改,用国产机合成时不会有提示，合出来的引物就是有问题的。）

3.2表格整理及贴标签时需要注意的问题

1) 确保上机表、操作表、测量表、标签表上的引物信息都是相对应的。

2) 打印标签前最好先快速预览一下。因为有些引物名称比较长，直接打印时会导致后面的信息不能正常打印出来；另外，有一个单位的客户导出标签时上面还有课题组的名字，直接打印就会导致引物名称与客户课题组上的名字相重叠。通过打印预览可以及时发现并作适当的调整。

3) 每次贴完一批标签后最好对着操作表再全部检查一遍。标签贴错的情况偶有发生，目前主要出现的问题是相邻两条引物的标签顺序贴反，导致不能跟操作表上的相对应。这种错误一般在包装时可以发现，但最好还是确保每次贴好的标签是准确的，所以贴完之后的检查还是有必要的。

4) 每个EP管上的标签尽量都贴整齐。存在个别标签贴的很歪的情况，看上去很不美观。

**3.3上机合成时需要注意的问题**

1) 进合成室前要戴好口罩，开抽风机，避免吸入易挥发的试剂。

2) 每次上机合成前务必检查一下密封膜。今年Dr.Oligo192合成仪合成时出现过几次密封膜挡到喷头的情况，换了新的密封膜后这个问题还是发生过。

3) 更换试剂时合成间湿度不能太高，所以需要提前打开除湿机。

4) 更换试剂时一定要对好瓶子上的标签，更换之后要注意检查瓶盖是否拧紧。

5) 更换氩气时气瓶上的开关以及减压阀都要拧到合适的位置，开始合成时需要观察下气压表是否在正常的范围内。

6) 国产机下机时要留意柱子是否都吹干。

7) 合成室的温度不能太高，所以除湿机不能一直开着。

**3.4氨解时需要注意的问题**

1) 氨解仪必须密封好，以避免氨解时漏气导致氨解不充分。

2) 若有引物的序列中连续G含量比较高的，氨解时间需改为1.5h。因为这种引物在氨解时比较难被切割下来。

3) 氨解仪放进水浴锅及拿出来时不能倾斜，以避免液体碰到合成柱中的固相载体导致引物的损失。

4) 氨解仪放入冷水中冷却的时间不能太长，不然水蒸气液化会导致引物的损失。

5) 合成板放在烘箱的时间不能太短，不然也会导致引物的损失。

**3.5氨解后处理时需要注意的问题**

1) 加洗脱液前务必留意废液板是否已更换成收集板，收集板上的标记是否跟合成板上相对应。

2) 引物回收后收集板要平稳拿好，及时盖好密封垫，以避免引物贱出后相互污染。

**3.6引物的定量、分装、包装时需要注意的问题**

1) 拿测量板时手要放在测量板的两侧，否则会影响测量数据的准确度。

2) 用排枪吸引物时不能太快，尽量保证每个枪头吸上来的体积是准确的。

3) 加到测量板上的引物要保证与收集板上的相对应。

4) 分装前要戴好口罩避免引物受微生物的污染。

5) 分装时要保证每条引物都分装到对应的EP管中。

6) 包装前要检查每条引物是否都烘干或是否有其它明显的杂质；EP管管盖是否都盖紧。

7) 包装时要保证每条引物都包装到对应的引物袋或引物盒。

8) 包装后要检查每个客户的引物是否齐全。

**3.7引物质检时需要注意的问题**

1) 选取跑胶的引物要具有代表性。最好每个客户的引物都至少选一条，同一批次的尽量选取碱基数不同的引物。

2) 往尿素板加水的体积要根据实际加引物的体积而定。水加多了则样品比重过低导致跑胶后的条带不好，水加少了则尿素不能充分溶解导致不易点样。

**3.8引物PAGE纯化时需要注意的问题**

1) 取样抽干时要保证充足的取样量。碱基数比较高的引物要适当增加取样量，因为碱基数越高，合成失败片段的含量越高。

2) 上样跑胶前要在胶板上做好标记，同时要留意胶孔是否完好避免上样时样品流到相邻引物的胶孔里造成交叉污染。

3) 每割一条引物前都要冲洗刀片，避免不同引物的交叉污染，同时注意不要割到marker的条带。