

# 投标文件

项目名称:引物合成

采购编号: 62024052114610850

投标人: 北京擎科生物科技股份有限公司湖南分公司

2024年5月22日



## 目录

一、报价单.....	1
二、服务偏离表.....	2
三、技术方案.....	3
(一) 一代测序及引物合成背景介绍.....	3
(二) 物流方案.....	5
(三) 样品处理方案.....	8
(四) 测序合成实验流程.....	13
(五) 引物合成流程.....	20
四、体系证书.....	23
五、营业执照.....	26

# 一、报价单



参数名称	采购需求	需求响应
商品名称	引物合成	引物合成
商品类目	核酸合成	核酸合成
建议品牌	生工；擎科	擎科
数量	4000bp	4000 件
最高单价（元）	1.50	0.7
预算总价（元）	6000.00	2800.00


## 二、服务偏离表

采购需求		需求响应	
参数名称	竞价要求	响应值	符合情况（供应商自评）
纯化方式	PAGE 纯化, 引物 长度 15-45bp	PAGE 纯化, 引物 长度 15-45bp	<input checked="" type="checkbox"/> 符合要求



## 三、技术方案

### (一) 一代测序及引物合成背景介绍



基因测序，又称 DNA 测序，是现代生物学研究中重要的工具之一。它经历了三个发展阶段。第一代 DNA 测序技术是由桑格和考尔森于 1975 年提出的链终止法。第一代技术准确率高、读取长度长，是唯一可以实现“从头至尾”测序的方法，但成本高、速度慢等问题限制了其应用。人类基因组计划使用第一代 Sanger 测序技术完成，耗费了巨资，用了十三年的时间。

引物合成采用固相亚磷酰胺三酯法。亚磷酰胺三酯法合成 DNA 片段，具有高效、快速的偶联以及起始反应物比较稳定的特点。亚磷酰胺三酯法是将 DNA 固定在固相载体上完成 DNA 链的合成，合成的方向是由待合成引物的 3' 端向 5' 端合成的，相邻的核苷酸通过 3' → 5' 磷酸二酯键连接。引物合成特点：1. 引物合成的纯度高；2. 合成的序列长；3. 合成的效果好。

测序技术的快速发展为现代农业科学的研究进步起到了巨大的推动作用。测序技术逐渐应用到农业科学研究的多个领域，如作物分子育种、动植物抗病基因、抗逆基因的筛选作物经济性状的发育机理等研究，并取得了重大的进展。第一代基因测序技术由于准确性高、价格低廉，设备运行时间短等优点，常应用于：①功能基因鉴定；②品种鉴定；③遗传改良；④病虫害防治；⑤生物育种等。


测序原理：利用一种 DNA 聚合酶来延伸结合在特定序列模板上的引物。直到掺入一种链终止核苷酸为止。每一次序列测定由一套四个单独的反应构

成，每个反应含有所有四种脱氧核苷三磷酸(dNTP)，并混入限量的一种不同的双脱氧核苷三磷酸(ddNTP)。由于 ddNTP 缺乏延伸所需要的 3-OH 基团，使延长的寡聚核苷酸选择性地在 G、A、T 或 C 处终止。终止点由反应中相应的双脱氧而定。每一种 dNTPs 和 ddNTPs 的相对浓度可以调整，使反应得到一组长几百至几千碱基的链终止产物。它们具有共同的起始点，但终止在不同的核苷酸上，可通过高分辨率变性凝胶电泳分离大小不同的片段，凝胶处理后可用 X-光胶片放射自显影或非同位素标记进行检测。

Sanger 测序是 DNA 测序技术的“金标准”，曾在人类基因组计划中发挥了关键推动作用，至今仍被用于获得高度准确且可信赖的测序数据。擎科生物先后为数千家科研院所，医院及工业企业提供数千万次测序服务，是您可靠的 Sanger 测序服务商。自创立以来，擎科生物不断探索和优化 Sanger 测序技术，自主开发了“磁珠法测序平台”，以磁珠为依托的半自动测序流程较传统膜纯化方法，采用磁珠方法大幅提高了生产效率及模板纯度和浓度，有效避免信号弱、信号衰减、甚至无信号的风险，测序成功率为国内领先水平。

本项目测序及引物合成承诺参数：

引物合成参数	OPC 纯度:85%以上
	PAGE 纯度:95%以上
	HPLC 纯度: 95%以上
	交付时间:8-24h
	突变率: ≤5%
	合成范围:8-150nt
Sanger 测序参数	有效读长:800-1200bp (特殊结构除外)



结果时间:10-24h
取样方式:上门取样/快递
结果文件:seq、abi
下单方式:在线订单/手写纸质订单
测序准确度:99%

## (二) 物流方案

规范公司物流配送签收操作流程,对操作的全过程和操作过程中的各个环节进行有效控制,确保为客户提供安全、高效、优质的配送服务。

### 1. 人员路线安排

客户可通过微信、电话、邮箱和在线系统提交取样要求,取样员每日根据客户取样信息情况合理安排车辆和路线,进行及时高效配送及取样;

### 2. 货物包装要求

货物外包装必须完整、无破损、无软化变形,内包装无漏包、无漏液;对于包装存在破损的情况应做好记录并告知对应人员解决。

### 3. 运输保存条件

条件	产品类型
常温运输	主要是普通化学试剂、分子试剂盒、塑料耗材、仪器等; 包装上中文标记: 储存: 常温保存; 表示室温储藏; 包装上英文标记: Storage: RT (25~25°C) 表示室温储藏。





冰袋运输	<p>主要是生物原料如酶类、细胞因子、蛋白、抗体类试剂、载体、测序样本、引物；</p> <p>包装上标记：Storage/Store at: 4℃；表示需存放在 4℃ 冰箱（普通冰箱）；</p> <p>包装上标记：Storage/Store at: 4℃ (do not freeze)；表示需要 4℃ 保存，切勿冷冻（如脂质体 2000）；</p> <p>包装上标记：Storage/Store at: -20℃；表示需存放在-20℃ 冰箱（普通冰箱/超低温冰箱）；</p>
干冰运输	<p>主要是感受态细胞、生物样本、血清、高通量测序样本；</p> <p>包装上标记：Storage/Store at: -85℃；需存放在-80℃ 冰箱，即超低温冰箱；</p> <p>包装上标记：Storage/Store at: -20℃；表示需存放在-20℃ 冰箱，也可暂存在-80℃ 冰箱；</p>

#### 4. 配送作业规范

##### 取货：

- 1) 配送人员根据客户预约时间、地址，合理安排时间进行取货；
- 2) 取货时需仔细检查客户订单信息、货物（样本）信息是否一致，货物轻拿轻放，合理保存，保存条件参考上文运输保存条件，冰袋、干冰均需要提前准备，切勿因缺失而导致货品运送延误，或者运输条件不符，从而造成客户投诉；若货物信息与客户订单信息不一致，需及时联系客户进行确认。

##### 送货：

- 1) 配送人员采用物流终端机扫描货物配送单二维码开始配送；
- 2) 配送人员必须根据货物类型采取相应的运输保存条件，并按照订单上的地址进行配送；

3) 配送人员到达配送地址后，与收货人清点核对订单和货物是否一致；如在交接过程中发现异常情况，如数量不符、规格型号不对、质量问题等，应第一时间与公司相关人员反馈汇报，并及时处理；

4) 全部货物清点完好无误后，由客户在订单上签收或者采用物流终端机扫码完成签收，正楷书写、字迹工整；签收回执是表明货物发生转移的主要凭据，要求合格有效 100% 签单返回公司存档。

#### 5. 配送员行为规范

配送人员应注意礼貌用语，着装整洁、语言表达清楚、认真严肃。


#### 6. 异常情况处理

在配送过程中出现以下异常情况配送人员必须第一时间汇报反馈：

- a、收件人地址不详或错误，电话无法接通
- b、收货人没有下过订单
- c、订单产品错误（数量、型号、质量）
- d、拒收货物
- e、其他情况

#### 7. 测序样品送样要求

样品类型	送样要求
质粒	将质粒溶解于双蒸水中；浓度 > 50 ng/μl，总体积大于 20μl。 大片段质粒 (>10kb) 请在测序单上注明长度。
已纯化 PCR 产物	请将回收后的产物溶于双蒸水中；浓度 > 10ng/μl，体积大于 10μl。 电泳检测条带单一，且大小正确。



未纯化 PCR 产物	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 条带不单一的 PCR 产物：浓度需 <math>&gt;10\text{ng}/\mu\text{l}</math>，体积 <math>&gt;20\mu\text{l}</math></li> <li>• 条带单一的 PCR 产物：浓度需 <math>&gt;10\text{ng}/\mu\text{l}</math>，体积 <math>&gt;10\mu\text{l}</math></li> </ul> <p>若片段大小 <math>&lt;200\text{bp}</math>，建议克隆后测序；送样前取 <math>2\mu\text{l}</math> 样品做电泳检测，确保目的条带清晰可见。</p>
菌液/平板菌落	<p>菌液：请将 <math>100\mu\text{l}</math>（不少于 <math>30\mu\text{l}</math>）过夜培养的新鲜菌液或甘油菌，装入 <math>1.5\text{ml}</math> 离心管中，清晰标注样品编号。</p> <p>并封口保存，防止交叉污染或泄漏。</p> <p>平板菌落： 请将待测的菌落圈选标注并编号，并使用缓冲垫以防运输过程中出现破损。</p> <p>请在测序单上注明载体的抗性，我们提供 Amp, Kana 两种抗生素。</p> <p>若为低拷贝质粒或需特殊培养条件，建议直接提供质粒（按照质粒要求）。</p>

投诉处理：公司应对客户提供方便的投诉渠道，投诉处理在 24 小时内给出具体答复；所有投诉整理汇总，定期给出相应的整改措施；所有的投诉记录在案，随时可以查询进度。

### （三）样品处理方案

#### 1. 样品接收

样品接收标准：

- ① 订单客户姓名、单位、联系电话及邮箱信息完整。
- ② 订单样品信息中，样品类型及测序要求完整。
- ③ PCR 类型（包含 PCR 切胶&PCR 已纯化）订单信息样品名、片段大小、测序引物及测序要求信息完整。
- ④ 质粒类型订单信息样品名、载体名称、测序引物及测序要求信息完整。



⑤菌液和沉降菌类型订单信息样品名、插入片段大小、抗生素类型（本公司只提供氨苄青霉素（Amp）和卡那霉素抗生素（Kan））、载体名称、是否鉴定、测序引物及要求、是否甲基化信息完整。

⑥沉降菌类型样品体积 1.5ml 以上（含），菌体明显浑浊。

⑦自备引物引物浓度（pmol/l、uM）信息完整。

## 2. 订单整理

2.1 客户信息：确认客户姓名、单位地址及邮箱的完整；

2.2 样品信息

样品类型及在 lims 系统中的首字母代号如下表所示：

储存板类型	Lims 系统首字母代号
沉降菌	F
菌液	A
质粒	B
PCR 已纯化	D
PCR 切胶	E
PCR 切胶试做	C

2.2.1 核对本订单样品及引物数量，信息不符优先与客户或业务员联系

a) 联系上，按客户要求处理，若与订单出现明显冲突，在订单上按客户要求修改，并注明“已电联”；

b) 联系不上：

①样品、引物名称以管盖为准，并在订单上修改；

②样品多送，备用处理并在订单上备注，质粒、PCR 产物-20℃保存，

沉降菌、菌液 4℃保存；



③引物多送，在订单上注明引物名称及备用并对其引物在 lims 系统中编号。

④样品引物少送（含空管）：在订单上标出并写问题交接。

#### 2.2.2 引物整理编号：

①订单上将自备引物名称用红色签字笔圈出，并对其进行编号，订单上编号形式例如：20230728-P001-A01。

②在引物标签左下角填写客户姓名，引物标签右侧填写引物名称，引物标签右下角填写引物浓度。

③将填写完毕的引物标签贴入引物管侧身，放入对应冰盒孔中。

#### 2.2.3 PCR 切胶类型整理编号：

①PCR 切胶类型样品细分为试做、加急、试做后、散样（样品个数少于 48 个且不加急）。

②排样顺序按 96 孔 A01-H12 纵向摆放样品，样品信息在切胶记录表上注明，必须填写片段大小或者备注（主带、最亮带、最大带、全切）并在切胶记录表上注明，对于有特殊要求客户要在其旁明确注明要求。

③对于加急客户统一排在一起，单独命名加急板。

④样品数  $\geq 48$  个或反应数  $\geq 100$  个根据试做标准进行试做挑取，挑取时样品系列、引物都要包含，挑取部分样品订单上编号如：20230728-C001-A01。挑取试做后剩余样品统一排在一起，在切胶信息单上备注客户姓名和试做后样品。对于一个样品对应一个引物类型随机挑取 8 个试做。具体试做要求参



照《实验常规试做标准操作流程》；

⑤散样（样品个数 $<48$ 且不加急）统一排在一起，单独命名板号，订单上编号例如：20230728-E001-A01。

#### 2.2.3 PCR 已纯化类型整理编号：

①排样顺序按 96 孔 A01-H12 纵向摆放样品，样品信息在切胶记录表上注明，填写片段大小。

②订单上对其样品编号命名例如：20230728-D001-A01。

#### 2.2.4 质粒类型整理编号：

①排样顺序按 96 孔 A01-H12 纵向摆放样品。

②订单上样品编号命名例如：20230728-B001-A01。

#### 2.2.5 沉降菌类型整理编号：

排样顺序按 96 孔 A01-H12 纵向摆放样品，样品管体积在 2.0ml 以上的用试管架摆放，摆放顺序横向摆放，并用空白标签注明其板孔号。并在菌液记录表上填写客户姓名、样品名称。

#### 2.2.6 菌液类型整理编号：

①排样顺序按 96 孔 A01-H12 纵向摆放样品，并在菌液记录表上填写客户姓名、样品名称、抗生素类型。需要保菌返还质粒客户特殊标注。对于平板菌在平板上用 Marker 笔写上客户姓名、所要接菌板孔号、抗生素类型及挑取个数。

②反应数 $\geq 48$ 个，要对其进行试做挑取，通用引物测序的挑取 4 个样品排入加急板上，并在菌液记录表上标注需菌 P 鉴定。自备引物测序只需挑



取4个样品排入加急板即可。对于甲基化样品反应数 $\geq 10$ 个进行试做挑取，挑取后排入加急板并标注甲基化样品试做。具体试做标准参照《实验室试做标准操作流程》

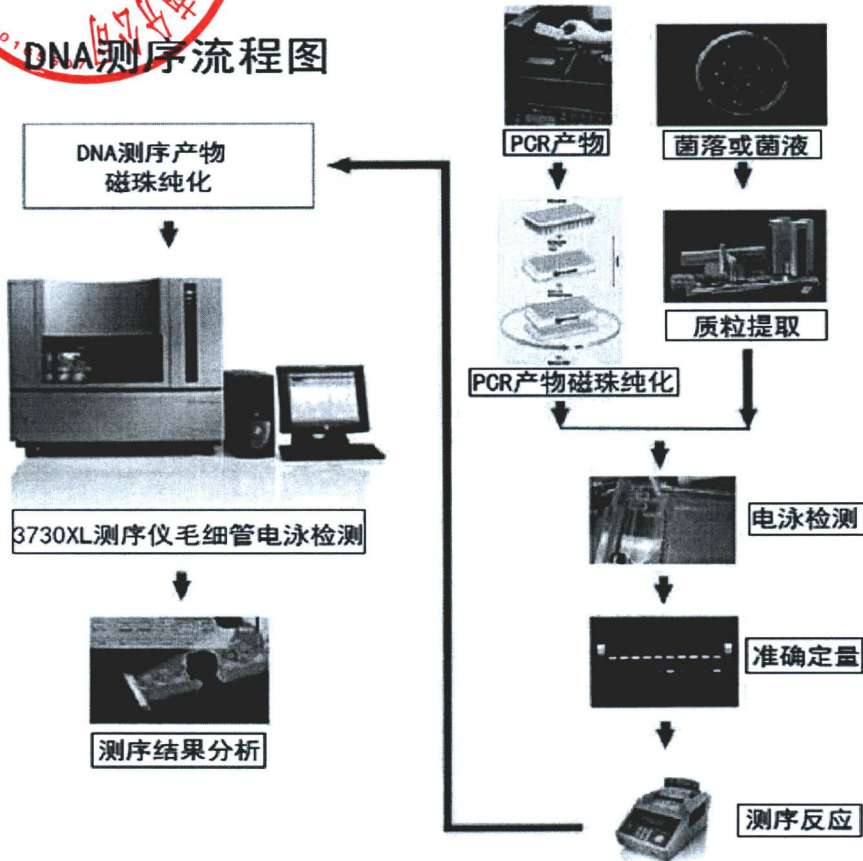
③对于常见 T 载体扩增测序样品:常见 T 载体如: PEASY-T1、PEASY-T1-SIMPLE、PEASY-T3、PEASY-T3-SIMPLE、PEASY-BLUNT、PEASY-BLUNT-SIMPLE、PGEM-T、PGM-T、PMD18/19/20-T、PUCm-T、PUC18/19-T、EZ-T; 在切胶记录表上填写客户姓名、样品名称(含系列名称)、片段大小及特殊要求信息。平板菌在平板上用 Marker 笔写上客户姓名、所编板孔号及挑取个数。在订单上所编号例如: 20230728-A050-A01。

④PET 系列载体菌液编号例如: 20230728-A030-A01。并在菌液记录表上填写客户姓名、样品名称、抗生素类型。将排好菌液记录表复制一份交于模板组(用于接菌), 一份交于反应组(用于滚环复制)。

### 3. 注意事项

①对样品编号时要记录详细、清楚, 样品板上贴上板号标签, 排序样品时, 样品顺序要与所编板号顺序一致。


#### (四) 测序合成实验流程



#### PCR 凝胶回收及纯化

1. 将核对后的 PCR 样品配平离心至 4000rpm，检查各样品的体积，补水至 50ul；
2. 按照样品：6X Loading buffer=5：1 加入 10ul 6X Loading buffer，若样品体积在 50-70ul 补加 6X Loading buffer 5ul，离心至 4000rpm 混匀；
3. 将样品点入事先准备好的 1.2%纯化胶中，点样顺序为：纯化胶第一行 1-8 孔点入样品第一列，第 9 孔为 marker，10-17 孔点入样品第二列。以此类推点完 96 孔，最后在纯化胶每行第 9 孔中分别点入 2ul DL2000，在模





具侧边贴上市点样品板的日期和板号，例如：0826-E001（标记是否加急），电泳仪电压设定 160V 接上接头正负极恒压电泳 40-60min，开始电泳后要观察纯化胶槽正负极有气泡冒出后，定时。

注意：若样品中有矿物油或者甘油等粘稠物质，可以只吸取下层样品加入，加入时缓慢加入，以免冲出胶孔，造成样品损失。

4. 将胶块放入凝胶成像仪器中采集图像，图像必须保证 marker 条带清晰。按照日期+板号+第几次电泳的形式命名胶图，保存在：服务器/测序相关/模板组/胶图/当月的 PCR 电泳记录文件夹中，如 20230726-E001-S-1 /20230726-E001-X-1；

5. 对照胶图填写切胶记录预检信息，预检信息用黑色签字笔标记，溶度正常标记√，溶度低标记半对钩，对于片段大小>1000bp 且总 DNA 量≤300ng 的样品用红色 marker 笔将预检栏圈上标记。

6. 在紫外透射仪下，用手术刀切下目的条带，切取的胶块质量应小于 3g，将其放入对应的板孔号中；

7. 4000rpm 离心 1min，加入 500ul Buffer GL，盖上封口膜，65℃水浴 12min，定时；

8. 检查每孔胶块是否完全溶解，若没有完全溶解再次 65℃水浴 3min，揭开封口膜，用连续加液器每孔加入 100ul 混匀的磁珠，对于预检标记为红色的在补入 100ul 磁珠，盖上硅胶垫，漩涡震荡 30s，转入水平震荡仪 600-800rpm 震荡 5min。

9. 将 96 孔板卡入磁力架中，磁吸 30s，将磁力架和样品正反轻微颠倒 3

次，再次静置磁吸 1min

10. 弃废液，吸水纸上轻磕，用 50-1200ul 8 道电动移液器向每孔移取 500ul Buffer W1，盖上硅胶垫漩涡震荡 30s，将 96 孔板卡入磁力架中，磁吸 30s，将磁力架和样品正反轻微颠倒 3 次，再次静置磁吸 1min

11. 弃废液，吸水纸上轻磕，用 50-1200ul 8 道电动移液器向每孔移取 500ul Buffer W2 盖上硅胶垫漩涡震荡 30s，将 96 孔板卡入磁力架中，磁吸 30s，将磁力架和样品正反轻微颠倒 3 次，再次静置磁吸 1min；

12. 弃废液，吸水纸上轻磕，倒离心至 600rpm；


13. 取下磁力架，加入 35ul 的 Eluent (已 65℃水浴加热)，盖上封口膜，65℃水浴 5min；

14. 离心至 1000rpm，将 96 孔板卡入磁力架中，磁吸 1min

15. 2ul 样品+5ul 1.4X 溴酚蓝混合后点入 0.8%的鉴定胶中，按照 A01-H01 的竖向顺序横向点入，中间空出 2 孔，分别加入 1ul、2ul 量的 DL2000，300V 电泳 11min；

16. 将鉴定胶放入凝胶成像仪中采集图像，图像必须保证 marker 条带清晰。按照日期+板号+第几次电泳的形式命名胶图，保存在：服务器/测序相关/模板组/胶图/当月的 PCR 电泳记录文件夹中，如 20230726-E001-S-2 /20230726-E001-X-2；

17. 对照纯化前后胶图，根据 PCR 定量标准在 PCR 记录表上标注每孔模板浓度并稀释至指定浓度，对回收后电泳无条带的样品按照 4ul 样品 +5ul 1.4X 溴酚蓝再次电泳鉴定；



18. 将稀释后模板水浴 5min, 离心至 4000rpm, 标记 Lims 系统模板状态, 确认提交前需要再次核对模板状态, 确认无误后将模板转交反应组, 若有反应同事上班放置于实验桌面, 并填写模板交接记录。若无反应同事上班将模板放置于反应组 4℃冰箱保存, 并填写模板交接记录。

### 菌液质粒提取

1. 整理好的菌液放 37℃摇床过夜培养 8-12h, 将过夜培养的菌液, 4000rpm 离心 3 min, 收集菌体, 倒掉上清;

2. 加入 250 μL Buffer S1 (请先检查是否已加入 RNase A) 重悬菌体沉淀, 涡旋震荡至无菌块为止;

注: 若菌体沉淀未彻底悬浮会影响裂解效果, 导致提取得率和纯度偏低。

3. 加入 250 μL Buffer S2, 温和地上下翻转 6-8 次, 使菌体充分裂解;

注: 此步需要温和翻转, 不能剧烈震荡, 以免打断基因组 DNA, 使提取的质粒中含有基因组 DNA 片段。混合后菌体应变得清亮粘稠, 若未变得清亮, 可能是由于菌体量过多, 裂解不充分导致, 应减少菌体量。

4. 加入 350 μL Buffer S3, 温和地上下翻转 6-8 次, 充分混匀 (此时会出现白色絮状沉淀), 4000rpm 离心 10-15 min;

5. 小心吸取上清, 将上清转入新的 96 孔板中 (注意不要吸出沉淀);

6. 用连续加液器每孔加入 100ul 混匀的磁珠, 对于预检标记为红色的在补入 100ul 磁珠, 盖上硅胶垫, 漩涡震荡 30s, 转入水平震荡仪 600-800rpm 震荡 5min。

7. 将 96 孔板卡入磁力架中, 磁吸 30s, 将磁力架和样品正反轻微颠倒



3 次，再次静置磁吸 1min;

8. 弃废液，吸水纸上轻磕，用 50-1200ul 8 道电动移液器向每孔移取 500ul Buffer W1，盖上硅胶垫漩涡震荡 30s，将 96 孔板卡入磁力架中，磁吸 30s，将磁力架和样品正反轻微颠倒 3 次，再次静置磁吸 1min

9. 弃废液，吸水纸上轻磕，用 50-1200ul 8 道电动移液器向每孔移取 500ul Buffer W2 盖上硅胶垫漩涡震荡 30s，将 96 孔板卡入磁力架中，磁吸 30s，将磁力架和样品正反轻微颠倒 3 次，再次静置磁吸 1min;

10. 弃废液，吸水纸上轻磕，倒离心至 600rpm;

11. 取下磁力架，加入 35ul 的 Eluent (已 65°C 水浴加热)，盖上封口膜，65°C 水浴 5min;

12. 离心至 1000rpm, 将 96 孔板卡入磁力架中，磁吸 1min

13. 2ul 样品+5ul 1.4X 溴酚蓝混合后点入 0.8% 的鉴定胶中，按照 A01-H01 的竖向顺序横向点入，中间空出 2 孔，分别加入 1ul、2ul 量的 DL2000，300V 电泳 11min;

14. 将鉴定胶放入凝胶成像仪中采集图像，图像必须保证 marker 条带清晰。按照日期+板号+第几次电泳的形式命名胶图，保存在：服务器/测序相关/模板组/胶图/当月的 PCR 电泳记录文件夹中，如 20230726-A001-2 /20230726-C001-2;

15. 对照纯化前后胶图，根据 PCR 定量标准在 PCR 记录表上标注每孔模板浓度并稀释至指定浓度，对回收后电泳无条带的样品按照 4ul 样品 +5ul 1.4X 溴酚蓝再次电泳鉴定;

16. 将稀释后模板水浴 5min, 离心至 4000rpm, 标记 Lims 系统模板状态, 确认提交前需要再次核对模板状态, 确认无误后将模板转交反应组, 若有反应同事上班放置于实验桌面, 并填写模板交接记录。若无反应同事上班将模板放置于反应组 4℃冰箱保存, 并填写模板交接记录。

### 质粒和 PCR 已纯化处理流程

1. 直接取 2ul 样品+5ul 1.4X 溴酚蓝混合后点入 0.8%的鉴定胶中, 按照 A01-H01 的竖向顺序横向点入, 中间空出 2 孔, 分别加入 1ul、2ul 量的 DL2000, 300V 电泳 11min;

2. 将鉴定胶放入凝胶成像仪中采集图像, 图像必须保证 marker 条带清晰。按照日期+板号+第几次电泳的形式命名胶图, 保存在: 服务器/测序相关/模板组/胶图/当月的 PCR 电泳记录文件夹中, 如 20230726-B001-2 /20230726-D001-2;

3. 对照纯化前后胶图, 根据 PCR 定量标准在 PCR 记录表上标注每孔模板浓度并稀释至指定浓度, 对回收后电泳无条带的样品按照 4ul 样品+5ul1.4X 溴酚蓝再次电泳鉴定;

4. 将稀释后模板水浴 5min, 离心至 4000rpm, 标记 Lims 系统模板状态, 确认提交前需要再次核对模板状态, 确认无误后将模板转交反应组, 若有反应同事上班放置于实验桌面, 并填写模板交接记录。若无反应同事上班将模板放置于反应组 4℃冰箱保存, 并填写模板交接记录。

### 测序反应及反应纯化

1. 测序反应体系:



PCR 纯化产物 1ul

BigDye® Terminator v3.1 2ul

primer (3.2pmol) 1ul

ddH<sub>2</sub>O 6ul

总体积 10ul

4.2 测序反应循环条件:

96°C 2min

96°C 10sec

50°C 10sec 30 cycles

60°C 3min

4°C 保温

2. 反应纯化

1) 用 8 道移液器往样品板加入 38ul 一步到位，盖硅胶垫震荡 10s，静置 1min，再次震荡 10s，离心至 1000rpm；

2) 将样品板放入磁力架中，卡好，静置 2min；

3) 取下硅胶垫，倒置样板甩弃废液，吸水纸上轻磕；

4) 加入 100ul Magical Buffer，静置 30 秒，倒置样板甩弃废液，吸水纸上轻磕，550rpm 离心 10s，换上新的吸水纸，再次离心 10s；

5) 将样品板从磁力架上取出，放在 96 孔板板托上，自然晾干 2min，加入 20ul 灭菌高纯水。盖上干净的硅胶垫震荡 30s，4000rpm 离心 1min

6) 从 LIMS 管理系统导出上机表，上 3730 测序仪。

## (五) 引物合成流程



引物合成是使用美国 Bioautomation 公司的 MerMade192E 全自动合成仪进行合成。

1. 将引物序列导入仪器要求格式文件（seq）中。
2. 打开 MerMade192E 合成仪的软件，将制好的 seq 文件导入合成仪中，开始合成。
3. 每间隔 1h 对仪器进行监控，确保合成无异常，合成完后进行氨解纯化。

### 引物氨解

1. 将氨解仪总电源插上，打开控制器开关，将仪器升温到 90℃，压力达到 480psi。
2. 将合成完的引物放入气相氨解仪中进行氨解 2h。
3. 氨解结束后清洗杂质，往合成柱内加入 200u1 乙腈，放到负压装置上抽干，重复清洗 3 次。
4. 洗脱产品，取一块干净 96 孔洗脱板，放在合成板下，往合成柱内加入 450u1 洗脱液洗脱引物。

### 引物 PAGE 纯化

1. 将洗脱下来的引物抽干后加入 200u1 的饱和尿素溶液。
2. 将引物样品放入 95℃ 的热水中水浴，为使 DNA 充分变性，水浴约 10（±2）min 后，方可取出进行电泳。

3. 引物样品上完后，打开电泳仪，调整电流至 40-50mA/板，进行电泳 2h 左右 (20bp)。

4. 将跑好胶的引物，放在紫外灯下，进行割胶，再用镊子夹入 15ml 干净离心管中。

5. 泡胶，往 15ml 的离心管中加入，0.3mol/L 的 NaCl 溶液，加入体积以凝胶完全浸没为准。

6. 将离心管盖上进行泡胶，泡胶时间 30bp 以内的 80°C 2h。

7. 引物回收，用 C18 柱对泡胶好的引物进行回收。

### 引物测量定量

1. 将纯化好的引物放到 BioTek 酶标仪上测量定量。

2. 计算分装体积，※分装体积 (ul) = OD 值 / 稀释倍数 / 测量值

3. 用移液器按计算出体积进行分装。

4. 分装好后放入离心机进行抽干，发货。

### 测序结果发送时间

类型	周期	备注
PCR 产物	12 小时	次日 10-15 点
PCR 已纯化	8 小时	次日 10 点前
质粒	8 小时	次日 10 点前
菌液	20 小时	次日 15-24 点
困难模板测序	48 小时	高 GC，回文结构
长片段 walking 测通	24h walking 一次	菌液、质粒、PCR，PCR 已纯化

引物合成发货时间

规格	产量(OD)	纯化方式	生产周期	备注
引物长度 10~ 59base	1-5	OPC	1 个工作日	
引物长度 10~ 40base	2	OPC	1 个工作日	
	5	PAGE	1 个工作日	
引物长度 60 ~ 90base	5	OPC	1-2 个工作日	
	2	PAGE	2 个工作日	



# 四、体系证书



兹证明

## 北京擎科生物科技股份有限公司

统一社会信用代码: 91110302MA00C6UG00  
注册地址: 中国·北京市·北京经济技术开发区经海四路156号院5号楼401  
办公地址: 中国·北京市·大兴区经海产业园5号楼B1-2栋3层, 4层  
质量管理体系符合标准

GB/T 19001-2016/ISO 9001:2015

认证范围如下:

**DNA/RNA 引物合成及基因测序服务; 生物化学实验仪器研发及销售; 生物试剂和酶制试剂的研发及销售**

换证日期: 2023年5月16日

本证书有效期至2025年4月28日

认证范围涉及法律法规要求的行政许可、资质许可、强制性认证的, 证书与资质共同使用有效。  
在正常接受年度审核的情况下, 与年度监督保持通知一并使用有效。

本证书信息可在国家认证认可监督管理委员会官方网站 ([www.cnca.gov.cn](http://www.cnca.gov.cn)) 上查询。



总经理:

颁证日期:

2022年4月29日



中国认可  
国际互认  
管理体系  
MANAGEMENT SYSTEM  
CNAS C021-M



CCCI



# 环境管理体系认证证书

注册号: 02123E10417R1M

兹证明

## 北京擎科生物科技股份有限公司

统一社会信用代码: 91110302MA00C6UG00

注册地址: 中国·北京市·北京经济技术开发区经海四路156号院5号楼401

办公地址: 中国·北京市·大兴区经海产业园5号楼B1-2栋3层, 4层

环境管理体系符合标准

**GB/T 24001-2016/ISO 14001:2015**

认证范围如下:

**DNA/RNA 引物合成及基因测序服务, 生物化学实验仪器研发及销售, 生物试剂和酶制试剂的研发及销售及相关管理活动**

本证书有效期至2026年5月15日

认证范围涉及法律法规要求的行政许可、资质许可、强制性认证的, 证书与资质共同使用有效。  
在正常接受年度审核的情况下, 与年度监督保持通知一并使用有效。

本证书信息可在国家认证认可监督管理委员会官方网站 ([www.cnca.gov.cn](http://www.cnca.gov.cn)) 上查询。



无锡认证中心有限公司

中国江苏省无锡市太湖新城环太湖路211号太极大厦  
官方网站: [www.wsc.com.cn](http://www.wsc.com.cn)

总经理:

颁证日期:

2023年5月16日



中国认可  
国际互认  
管理体系  
MANAGEMENT SYSTEM  
CNAS C021-M





注册号: 02123S10410R1M

兹证明

### 北京擎科生物科技股份有限公司

统一社会信用代码: 91110302MA00C6UG00  
 注册地址: 中国·北京市·北京经济技术开发区经海四路156号院5号楼401  
 办公地址: 中国·北京市·大兴区经海产业园5号楼B1-2栋3层, 4层

职业健康安全管理体系符合标准:  
**GB/T 45001-2020/ISO 45001:2018**

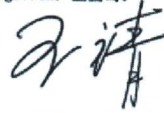
认证范围如下:

**DNA/RNA 引物合成及基因测序服务, 生物化学实验仪器研发及销售, 生物试剂和酶制试剂的研发及销售及相关管理活动**

本证书有效期至2026年5月15日  
 认证范围涉及法律法规要求的行政许可、资质许可、强制性认证的, 证书与资质共同使用有效。  
 在正常接受年度审核的情况下, 与年度监督保持通知一并使用有效。  
 本证书信息可在国家认证认可监督管理委员会官方网站 ([www.cnea.gov.cn](http://www.cnea.gov.cn)) 上查询。



中国认证中心有限公司  
 中国北京市海淀区中关村中路211号太极大厦  
 网站: [www.ccci.com.cn](http://www.ccci.com.cn)

总经理:   
 颁证日期: 2023年5月16日



中国认可  
 国际互认  
 管理体系  
 MANAGEMENT SYSTEM  
 CNAS C021-M

## 五、营业执照

			
统一社会信用代码 91430104MM7Q6UHGXN		<b>营业执照</b> (副本) 副本编号: 1-1	
名称 北京康科生物科技股份有限公司湖南分公司		负责人 何英	
类型 其他股份有限公司分公司(非上市)		成立日期 2018年12月21日	
经营范围 在隶属企业经营范围内开展下列经营活动: 生物技术开发服务、咨询、交流服务; 化工产品的销售。(依法须经批准的项目, 经相关部门批准后方可开展经营活动)		经营场所 湖南省长沙市岳麓区枫林岭街道枫林南路317号湘能大厦中栋6楼	
		登记机关  2023年12月21日	

国家企业信用信息公示系统网址: [www.gsxt.gov.cn](http://www.gsxt.gov.cn) 市场监管总局于每年1月1日至6月30日通过国 国家市场监督管理总局监制