



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109505012 A
(43)申请公布日 2019.03.22

(21)申请号 201910036315.4

(22)申请日 2019.01.15

(71)申请人 依科赛生物科技(太仓)有限公司
地址 215434 江苏省苏州市太仓市太仓港
经济技术开发区滨江大道88号

(72)发明人 习杨 蒋国成 陈旭 陈刚

(74)专利代理机构 上海卓阳知识产权代理事务
所(普通合伙) 31262

代理人 巫蓓丽

(51) Int. Cl.
C40B 50/06(2006.01)

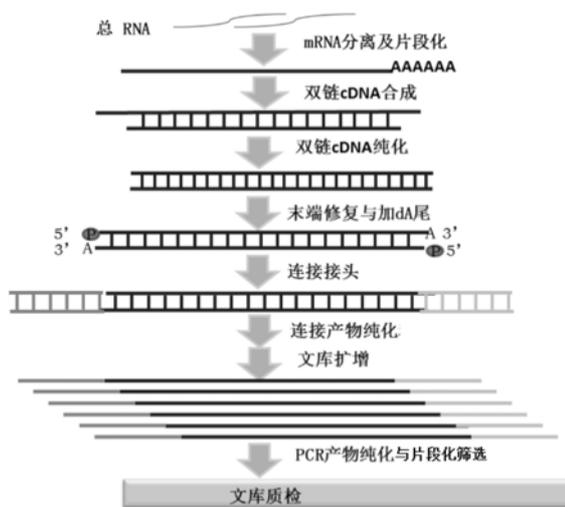
权利要求书1页 说明书11页
序列表1页 附图2页

(54)发明名称

一种针对FFPE样本的mRNA二代测序文库构建的试剂盒及其应用

(57)摘要

本发明涉及一种针对FFPE样本的mRNA二代测序文库构建的试剂盒,所述的试剂盒包含:mRNA分离/片段化体系,双链cDNA合成的酶体系,末端修复,加dA尾的酶体系,接头连接的酶体系,PCR扩增的Mix;本发明还涉及上述试剂盒的用途和使用方法。该试剂盒不仅可实现常规样本的mRNA建库,尤其对于低起始量的mRNA文库的样本(如FFPE样本)有突出的表现,优于同类产品2~3倍建库产量,目的片段更富集,且操作简单、快速、无偏好PCR扩增。



1. 一种针对FFPE和cfDNA样本的mRNA二代测序文库构建的试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒包含:mRNA分离/片段化体系,双链cDNA合成的酶体系,末端修复,加dA尾的酶体系,接头连接的酶体系,PCR扩增的Mix。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述的mRNA片段化体系中,Mg离子浓度范围为0.5~2mM。

3. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述的末端修复,加dA尾的酶体系为T4 DNA聚合酶,T4多聚核苷酸激酶,Taq DNA聚合酶;加dA尾的反应条件为30℃,30mins,72℃,20mins。

4. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述的接头连接的酶体系为T4 DNA连接酶;接头连接的反应条件为30℃,30mins。

5. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述的PCR扩增的Mix为ExHiFi 2X PCR Master Mix。

6. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒还包含末端修复、加dA尾的5X反应缓冲液,接头连接的反应缓冲液,dNTP和ATP。

7. 权利要求1-6任一所述的试剂盒在mRNA二代测序文库构建中的应用。

8. 根据权利要求7所述的应用,其特征在于,所述的mRNA二代测序文库构建是针对FFPE样本的。

9. 权利要求1-6任一所述的试剂盒的使用方法,其特征在于,包括以下步骤:

a) 样品总RNA提取后通过磁珠分离得到mRNA然后进行片段化和双链cDNA合成;

b) 将片段化的双链DNA加入末端修复、加dA尾的酶反应体系中,混匀后置于PCR仪上进行反应;

c) 将步骤b)的产物里直接依次加入酶体系buffer,接头和连接酶,混匀后进行连接反应;

d) 将步骤c)中的连接产物用磁珠进行全纯化并根据目的片段的大小进行片段化筛选;

e) 将步骤d)中纯化产物进行PCR扩增并用磁珠纯化回收。

10. 根据权利要求9所述的使用方法,其特征在于,所述的末端修复、加dA尾的酶反应体系中T4多聚核苷酸激酶:T4DNA聚合酶:Taq DNA聚合酶的酶活力单位比例为10:1:1。

一种针对FFPE样本的mRNA二代测序文库构建的试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及分子生物学技术领域,具体地说,涉及一种针对FFPE样本的mRNA二代测序文库构建的试剂盒及其应用。

背景技术

[0002] 二代测序技术又称高通量测序或者大规模平行测序,是继Sanger法的一代从头测序技术之后基于边合成边测序技术的新一代测序方法,能够同时对上百万甚至数十亿个DNA分子进行测序,从而实现大规模、高通量等一代测序技术无法企及的目标。

[0003] 二代测序技术可广泛地应用于动物,植物,微生物,环境及医学的所有基于大规模基因序列研究的领域,特别是在临床医学领域的应用呈现快速增长的态势。在分子诊断的不同技术平台中,随着近两年“精准医疗”概念迅速崛起成为最受关注的领域。

[0004] 在二代测序技术中,测序平台主要包括罗氏公司的454测序平台、ABI公司的Solid测序平台,以及Illumina公司的Solexa测序平台三种,但是Illumina公司的Solexa测序平台是目前全球使用量最大的二代测序机器。

[0005] Solexa测序技术的原理为:将基因组DNA片段随机附着到光学透明的玻璃表面(即Flow cell),这些DNA片段经过延伸和桥式扩增后,在Flow cell上形成了数以亿计的Cluster,每个Cluster是具有数千份相同模板的单分子簇。然后利用带荧光基团的四种特殊脱氧核糖核苷酸,通过可逆性终止的边合成边测序(SBS)技术对待测的模板DNA进行测序。

[0006] 二代测序技术的操作流程是:

[0007] 1) 测序文库的构建(Library Construction)

[0008] 首先准备基因组,然后将DNA随机片段化成几百碱基或更短的小片段,并在两头加上特定的接头(Adaptor)。如果是转录组测序,则文库的构建要相对麻烦些,RNA片段化之后需反转成cDNA,然后加上接头,或者先将RNA反转成cDNA,然后再片段化并加上接头。片段的大小(Insert size)对于后面的数据分析有影响,可根据需要来选择。对于基因组测序来说,通常会选择几种不同的insert size,以便在组装(Assembly)的时候获得更多的信息。

[0009] 2) 锚定桥接(Surface Attachment and Bridge Amplification)

[0010] Solexa测序的反应在叫做flow cell的玻璃管中进行,flow cell又被细分成8个Lane,每个Lane的内表面有无数的被固定的单链接头。上述步骤得到的带接头的DNA片段变性成单链后与测序通道上的接头引物结合形成桥状结构,以供后续的预扩增使用。

[0011] 3) 预扩增(Denaturation and Complete Amplification)

[0012] 添加未标记的dNTP和普通Taq酶进行固相桥式PCR扩增,单链桥型待测片段被扩增成为双链桥型片段。通过变性,释放出互补的单链,锚定到附近的固相表面。通过不断循环,将会在Flow cell的固相表面上获得上百万条成簇分布的双链待测片段。

[0013] 4) 单碱基延伸测序(Single Base Extension and Sequencing)

[0014] 在测序的flow cell中加入四种荧光标记的dNTP、DNA聚合酶以及接头引物进行扩增,在每一个测序簇延伸互补链时,每加入一个被荧光标记的dNTP就能释放出相对应的荧光,测序仪通过捕获荧光信号,并通过计算机软件将光信号转化为测序峰,从而获得待测片段的序列信息。从荧光信号获取待测片段的序列信息的过程叫做Base Calling,Illumina公司Base Calling所用的软件是Illumina's Genome Analyzer Sequencing Control Software and Pipeline Analysis Software。读长会受到多个引起信号衰减的因素所影响,如荧光标记的不完全切割。随着读长的增加,错误率也会随之上升。

[0015] 5) 数据分析(Data Analyzing)

[0016] 这一步严格来讲不能算作测序操作流程的一部分,但是只有通过这一步前面的工作才显得有意义。测序得到的原始数据是长度只有几十个碱基的序列,要通过生物信息学工具将这些短的序列组装成长的Contigs甚至是整个基因组的框架,或者把这些序列比对到已有的基因组或者相近物种基因组序列上,并进一步分析得到有生物学意义的结果。

[0017] 由上可知,测序文库的构建为二代测序的第一步也是最为重要的一步,后续的步骤因为几乎完全依赖平台的设定、仪器的精密以及软件的支持,是相对比较可控的部分,而第一步的文库构建因为人为操作因素影响较大,成为后续结果是否精确可靠的重要依托。

[0018] 在所有mRNA建库的样本中,随着临床测试的不断增加,临床标本常见的保存形式FFPE(石蜡包埋)样本的二代测序检测方兴未艾。然而由于FFPE样本RNA降解程度高,导致普通的mRNA建库试剂盒往往无法满足这类样本的建库需求。

[0019] 基于此,我们研发了这款针对FFPE样本的mRNA二代测序文库构建试剂盒,在低起始量时优于同类产品2~3倍建库产量,能有效富集目的片段,与此同时也能进行常规的mRNA文库构建,且操作简单、快速、无偏好PCR扩增。

发明内容

[0020] 本发明的目的是针对现有技术中的不足,提供一种建库质量更优的针对FFPE样本的mRNA二代测序文库构建试剂盒。

[0021] 本发明再一的目的是,提供所述的试剂盒的应用。

[0022] 本发明另一的目的是,提供所述的试剂盒的使用方法。

[0023] 为实现上述第一个目的,本发明采取的技术方案是:

[0024] 一种针对FFPE样本的mRNA二代测序文库构建的试剂盒,所述的试剂盒包含:mRNA分离/片段化体系,双链cDNA合成的酶体系,末端修复,加dA尾的酶体系,接头连接的酶体系,PCR扩增的Mix。

[0025] 在上述针对FFPE样本的mRNA二代测序文库构建的试剂盒中,作为一个优选方案,所述的mRNA片段化体系中,Mg离子浓度范围为0.5~2mM。

[0026] 在上述针对FFPE样本的mRNA二代测序文库构建的试剂盒中,作为一个优选方案,所述的末端修复,加dA尾的酶体系为T4 DNA聚合酶,T4多聚核苷酸激酶,Taq DNA聚合酶。

[0027] 在上述针对FFPE样本的mRNA二代测序文库构建的试剂盒中,作为一个优选方案,所述的末端修复,加dA尾的反应条件为30℃,30mins,72℃,20mins。

[0028] 在上述针对FFPE样本的mRNA二代测序文库构建的试剂盒中,作为一个优选方案,所述的接头连接的酶体系为T4 DNA连接酶。

[0029] 在上述针对FFPE样本的mRNA二代测序文库构建的试剂盒中,作为一个优选方案,所述的接头连接的反应条件为30℃,30mins。

[0030] 在上述针对FFPE样本的mRNA二代测序文库构建的试剂盒中,作为一个优选方案,所述的PCR扩增的Mix为ExHiFi 2X PCR Master Mix。

[0031] 在上述针对FFPE样本的mRNA二代测序文库构建的试剂盒中,作为一个优选方案,所述的试剂盒还包含末端修复、加dA尾的5X反应缓冲液,接头连接的反应缓冲液,dNTP和ATP。

[0032] 为实现上述第二个目的,本发明采取的技术方案是:

[0033] 如上任一所述的试剂盒在mRNA二代测序文库构建中的应用。所述的mRNA二代测序文库构建是针对FFPE样本的。

[0034] 为实现上述第三个目的,本发明采取的技术方案是:

[0035] 如上任一所述的试剂盒的使用方法,包括以下步骤:

[0036] a) 样品总RNA提取后通过磁珠分离得到mRNA然后进行片段化和双链cDNA合成;

[0037] b) 将片段化的双链DNA加入末端修复、加dA尾的酶反应体系中,混匀后置于PCR仪上进行反应;

[0038] c) 将步骤b)的产物里直接依次加入酶体系buffer,接头和连接酶,混匀后进行连接反应;

[0039] d) 将步骤c)中的连接产物用磁珠进行全纯化并根据目的片段的大小进行片段化筛选;

[0040] e) 将步骤d)中纯化产物进行PCR扩增并用磁珠纯化回收。

[0041] 在上述试剂盒的使用方法中,作为一个优选方案,所述的末端修复、加dA尾的酶反应体系中T4多聚核苷酸激酶:T4DNA聚合酶:Taq DNA聚合酶的酶活力单位比为:10:1:1。

[0042] 本发明优点在于:本发明提供了一种针对FFPE样本的mRNA二代测序文库构建试剂盒。该突变试剂盒不但具有普通mRNA建库的功能,而且当遇到建库困难的RNA样本(FFPE样本)时,也可以实现高效建库,解决了普通mRNA建库试剂盒由于FFPE样本RNA降解程度高,导致普通的mRNA建库试剂盒往往无法满足这类样本的建库需求。在低起始量时优于同类产品2~3倍建库产量,目的片段更富集,且操作简单、快速、无偏好PCR扩增。

附图说明

[0043] 附图1是本发明的原理与操作简示图。

[0044] 附图2是实施例1中AMPure XP beads文库分选纯化反应条件。

[0045] 附图3是实施例1中文库浓度换算方法。

[0046] 附图4是实施例1中Agilent 2100 Bioanalyzer检测NEBNext Ultra II mRNA文库制备试剂盒和本发明所述的试剂盒中文库片段长度分布图(以1μg和100ng为例)。

具体实施方式

[0047] 下面结合具体实施方式,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。此外应理解,在阅读了本发明记载的内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限

定的范围。

[0048] 应用本发明的mRNA二代测序文库构建试剂盒进行mRNA文库构建的总体思路为：分离并片段化mRNA，进行cDNA合成，加入末端修复、加dA尾的酶反应体系中，混匀后置于PCR仪上进行反应；然后加入接头和连接酶体系，混匀后进行连接反应；用磁珠对连接产物进行全纯化；将纯化产物进行PCR扩增并用磁珠纯化回收，最后根据目的片段的大小进行片段化筛选并回收(图1)。

[0049] 实施例1

[0050] 一、试剂准备

[0051] 1) Beads Binding Buffer制备

[0052]

试剂原液浓度	终浓度
LiCl	2M
2M Tris HCl (pH 7.5)	80mM
0.5M EDTA	4mM
Triton X-100	0.20%

[0053] 2) Beads Wash Buffer制备

[0054]

试剂原液浓度	终浓度
5M LiCl	150mM
2M Tris HCl (pH 7.5)	20mM
0.5M EDTA	1mM
Triton X-100	0.01%

[0055] 3) 1st Strand Buffer制备

[0056]

试剂原液浓度	终浓度
2.5M KCl	430mM
2M MgCl	20mM
1M DTT	57mM
25mM dNTP	2mM

[0057] 4) 1st Strand Enzyme Mix制备

	试剂原液浓度	体积
[0058]	Murine RNase Inhibitor	500 ul
[0059]	ProtoScript II Reverse Transcriptase	1000

[0060] 5) 2st Strand Buffer制备

[0061]

试剂原液浓度	体积
1M NaCl	2.5ml
2M MgCl	0.55ml
1M DTT	0.75ml
25mM dNTP	1.6ml
RNaseH	2.5ml

[0062] 6) 2st Strand Enzyme Mix制备

[0063] 即NEB产品M0209L DNA Polymerase I (E.coli) 按包装规格分装即可。

[0064] 7) Frag/Prime Buffer的配制:6 μ l Frag Buffer里Tris HCl (pH 8.3) 终浓度为167mM, MgCl₂终浓度为0.75mM, 再与1.5 μ l随机引物3600 μ m N6, 7.5 μ l的ddH₂O混匀。[0065] 8) End Prep Enzyme Mix的配制:10U/ μ l T4多聚核苷酸激酶 (NEB, M0201L) :3U/ μ l T4 DNA聚合酶 (NEB, M0203L) :5U/ μ l Taq (ExCell, MB000-1461) 按照酶活力单位比10:1:1配制。[0066] 9) End Rapid Repair Reaction Buffer的配制:100mM dATP 0.55 μ l, 100mM dCTP 0.15 μ l, 100mM dTTP 0.15 μ l, 100mM dGTP 0.15 μ l, 10X T4 DNA Ligase Buffer 6 μ l。[0067] 10) Ligase Mix的配制:T4 DNA连接酶 (NEB, M0202L) 为5 μ l。[0068] 11) Rapid ligase Buffer的配制:10X T4 DNA Ligase Buffer 4 μ l, ATP (100mM) 0.1 μ l, 50% PEG6000 8 μ l, 灭菌双蒸水17.9 μ l。

[0069] 12) PCR引物及Adapter准备:

[0070]

名称	引物和接头序列 5'-3'
Primer 1	5'AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC3'
Primer 2	5'CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT3'
Index Adapter	5'AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT3' /5'Phos/GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACAACGTGATATCTCGTATGCCGCTTCTGCTTG3'

[0071] 根据以上序列进行序列合成, 并配制Primer 1/2的终浓度为12.5 μ M, Index Adapter终浓度为25 μ M, -20 $^{\circ}$ C保存备用。

[0072] 二、RNA样本准备

[0073] 1) FFPE样本: 采用针对FFPE样本的RNA提取试剂盒获得纯化的总RNA;

[0074] 2) 常规样本的总RNA通过Trizol或其他类似试剂进行提取;

[0075] 3) 尽量采用完整性比较好的RNA样本, RIN值应 \geq 8。

[0076] 三、mRNA分离/片段化

[0077] 1. 准备RNA样品: 在PCR管中, 将10ng-1 μ g总RNA溶解于50 μ L DEPC水中, 冰上放置备用。[0078] 2. 吸取10 μ L mRNA Binding Beads加入到0.2mL PCR管中。[0079] 3. 吸取100 μ L Beads Binding Buffer加入到磁珠中, 用移液器吹打6次充分混匀。

[0080] 4. 将PCR管置于磁力架上室温放置2min。

- [0081] 5.小心移除所有上清,注意不要接触到磁珠。
- [0082] 6.重复第3-5步骤一次。
- [0083] 7.用50 μ L Beads Binding Buffer重悬磁珠,将步骤1中的50 μ L总RNA加入到磁珠中,充分混匀。
- [0084] a、吸取10 \times (样本数+0.5) μ L mRNA Binding Beads加入到0.2mL PCR管或者1.5mL离心管中;
- [0085] b、将管置于磁力架上室温放置2min,小心移除所有上清,注意不要接触到磁珠;
- [0086] c、吸取200 μ L Beads Binding Buffer加入到磁珠中,用移液器吹打6次充分混匀;
- [0087] d、将管置于磁力架上室温放置2min,小心移除所有上清,注意不要接触到磁珠;
- [0088] e、重复第c-d步骤一次;
- [0089] f、用50 \times (样本数+0.5) μ L Beads Binding Buffer重悬磁珠,吸取50 μ L磁珠加入到步骤1中的50 μ L总RNA中,充分混匀,继续步骤8实验。
- [0090] 8.样品置于PCR仪中,65 $^{\circ}$ C孵育5min,使RNA变性,4 $^{\circ}$ C保存。
- [0091] 9.PCR仪温度达到4 $^{\circ}$ C后,将样品重悬,室温放置5分钟,使mRNA结合到磁珠上。
- [0092] 10.再次充分重悬磁珠后,室温再放置5分钟,使mRNA结合到磁珠上。
- [0093] 11.将样品置于磁力架2分钟,使mRNA与总RNA分离,小心移除上清。
- [0094] 12.将样品从磁力架上取出,加入200 μ L Beads Wash Buffer吹打6次充分混匀。在磁力架上静置2分钟,小心移除上清。
- [0095] 13.重复步骤12一次。
- [0096] 14.将样品从磁力架上取出,加入50 μ L Tris Buffer重悬磁珠,用移液器吹打6次充分混匀。
- [0097] 15.将样品置于PCR仪中,80 $^{\circ}$ C孵育2min,25 $^{\circ}$ C保存,将mRNA洗脱下来。
- [0098] 16.待PCR仪温度降至25 $^{\circ}$ C时,取出样品加入50 μ L Beads Binding Buffer,用移液器轻轻吹打6次充分混匀。
- [0099] 17.室温放置5分钟,使mRNA结合到磁珠上。
- [0100] 18.再次重悬磁珠,室温再放置5分钟,使mRNA结合到磁珠上。
- [0101] 19.将样品置于磁力架上静置2分钟,使mRNA与总RNA分离,小心移除上清。
- [0102] 20.将样品从磁力架上取出,用200 μ L Beads Wash Buffer轻轻吹打6次充分混匀磁珠,在磁力架上静置2分钟,移除全部上清。
- [0103] 21.加入18 μ L Frag/Prime Buffer,充分混匀。放入PCR仪上,运行94 $^{\circ}$ C10min片段化程序。
- [0104] 22.反应结束后立即将样品放回磁力架上室温静置2分钟,待溶液澄清后吸取15 μ L上清至一新的PCR管内,立即进行cDNA第一链反应。
- [0105] 四、双链cDNA合成
- [0106] 1. cDNA第一链合成
- [0107] 1.1配置cDNA第一链合成反应液

	Fragmented mRNA	15 μ L
[0108]	First Strand Synthesis Reaction Buffer	4 μ L
	First Strand Synthesis Enzyme Mix	1 μ L
	Total	20 μ L

[0109] 1.2在mini离心机上瞬时离心样品,再将样品放入PCR仪中按如下程序进行第一链cDNA合成反应

[0110]	25°C	10 min
	42°C	15 min
[0111]	70°C	15 min
	4°C	hold

[0112] 2. cDNA第二链合成

[0113] 2.1配置cDNA第二链反应液

	First Strand cDNA	20 μ L
	Second Strand Synthesis Reaction Buffer	20 μ L
[0114]	Second Strand Synthesis Enzyme Mix	5 μ L
	Nuclease-free water	5 μ L
	Total	50 L

[0115] 2.2在mini离心机上瞬时离心样品,再将样品放入PCR仪中按如下程序进行第二链cDNA合成反应

[0116]	16°C	60 min
	4°C	hold

[0117] 五、双链cDNA纯化

[0118] 1.吸取90 μ L (1.8 \times) AMPure XP磁珠至上述反应管中,用移液器轻轻吹打10次,充

分混匀。

[0119] 2. 室温孵育5min。

[0120] 3. 将反应管瞬时离心后,置于磁力架上静置5分钟进行磁珠的分离。待溶液澄清后,小心移除上清,避免接触并吸取磁珠。

[0121] 4. 保持反应管始终置于磁力架上,加入200 μ L新鲜配制的80%乙醇漂洗磁珠。室温孵育30秒,小心移除上清。

[0122] 5. 重复步骤4。

[0123] 6. 将反应管瞬时离心,并用移液器再次吸尽残留液体。

[0124] 7. 打开反应管盖并保持反应管始终置于磁力架中,将磁珠暴露于空气中直至磁珠干燥(约5分钟)。

[0125] 8. 将反应管从磁力架中取出,加入51 μ L灭菌超纯水洗脱DNA,涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀。

[0126] 9. 将反应管瞬时离心并置于磁力架中,待溶液澄清后(约5分钟),小心吸取50 μ L上清至新的灭菌PCR管中。

[0127] 六. 末端修复、加dA尾反应

[0128] 1) 向PCR薄壁管中依次加入下列试剂:

	End Rapid Repair Reaction Buffer	7 μ L
	End Prep Enzyme Mix	3 μ L
[0129]	Purified cDNA	50 μ L
	ddH ₂ O	Up to 60 μ L

[0130] 2) 使用移液器轻轻吹打,充分混匀上述溶液后,进行瞬时离心,将所有组分收集到管底;

[0131] 3) 按照下表设置PCR仪反应程序,将反应管放入PCR仪中。

[0132]

温度	时间
30 $^{\circ}$ C	30 min
72 $^{\circ}$ C	20 min
4 $^{\circ}$ C	Hold forever

[0133] 七、接头连接

[0134] 1) 在完成末端修复的反应管中加入以下试剂:

[0135]

Rapid ligase Buffer	30 μ L
Adapter	2.5 μ L
ddH ₂ O	2.5 μ L
Ligase Mix	5 μ L

[0136] 反应管中溶液总体积为100 μ L；

[0137] 2) 用移液器轻轻吹打充分混匀后瞬时离心,使溶液收集到管底；

[0138] 3) 25 $^{\circ}$ C 反应30分钟。

[0139] 八、连接产物全纯化

[0140] 1) 将依科赛TrueLib片段选择磁珠 (ExCell,NGS00-4031) 从冰箱中取出,平衡至室温；

[0141] 2) 涡旋震荡混匀TrueLib磁珠；

[0142] 3) 取80 μ L (0.8 \times) 的TrueLib磁珠至上述反应管中,用移液器轻轻吹打10次,充分混匀；

[0143] 4) 置于室温条件下,孵育5分钟；

[0144] 5) 将反应管瞬时离心后,置于磁力架中进行磁珠的分离。待溶液澄清后(约5分钟),小心移除上清,避免接触并吸取磁珠；

[0145] 6) 保持反应管始终置于磁力架中,加入200 μ L新鲜配制的80%乙醇漂洗磁珠。室温孵育30秒,小心移除上清；

[0146] 7) 重复步骤6；

[0147] 8) 打开反应管盖并保持反应管始终置于磁力架中,将磁珠暴露于空气中直至磁珠干燥(约5分钟)；

[0148] 9) 将反应管从磁力架中取出,加入25 μ L 10mM Tris-HCl or 0.1 \times TE洗脱DNA(如果需要进行步骤B的片段长度分选纯化,请用101 μ L 10mM Tris-HCl or 0.1 \times TE洗脱DNA),涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀,室温静止2分钟；[0149] 10) 将反应管短暂离心并置于磁力架中,待溶液澄清后(约3分钟),小心吸取23 μ L(或者100 μ L)上清至新的PCR管中,进行PCR扩增。

[0150] 九、PCR扩增

[0151] 1) 在PCR管中按以下体系加入试剂,用移液器轻轻吹打,充分混匀

连接 Adapter 后的纯化产物	23 μ L
-------------------	------------

[0152] ExHiFi 2 \times PCR Master Mix 25 μ L

Primer Mix	2 μ L
------------	-----------

[0153] 反应总体积为50 μ L。

[0154] 2) 按下表设置PCR反应

	温度	时间	
	98 $^{\circ}$ C	30 s	
[0155]	98 $^{\circ}$ C	10 s	} 8-15 循环
	65 $^{\circ}$ C	30 s	
	72 $^{\circ}$ C	30 s	
	72 $^{\circ}$ C	1 min	

[0156] 起始RNA的量为1 μ g时,建议PCR循环数为8个循环;100ng时,建议PCR循环数为12个循环;10ng时,建议PCR循环数为15个循环;PCR循环数也可根据实验需要进行优化。

[0157] 十、PCR产物的纯化及片段化筛选(片段化筛选根据情况可选)

[0158] 1. 涡旋震荡混匀AMPure XP磁珠。

[0159] 2. 取45 μ L的AMPure XP磁珠至上述PCR反应产物中(约50 μ L),用移液器轻轻吹打10次,充分混匀。

[0160] 3. 置于室温条件下,孵育5分钟。

[0161] 4. 将反应管瞬时离心后,置于磁力架中进行磁珠的分离。待溶液澄清后(约5分钟),小心移除上清,避免吸取磁珠。

[0162] 5. 保持反应管始终置于磁力架中,加入200 μ L新鲜配制的80%乙醇漂洗磁珠。室温孵育30秒,小心移除上清。

[0163] 6. 重复步骤5。

[0164] 7. 将反应管瞬时离心,并用移液器吸尽残留液体。

[0165] 8. 打开反应管盖并保持反应管始终置于磁力架中,将磁珠暴露于空气中直至磁珠干燥(约5分钟)。

[0166] 9. 将反应管从磁力架中取出,加入28 μ L(或者102 μ L,做片段化纯化)无菌超纯水洗脱DNA,涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀。

[0167] 10. 将反应管瞬时离心并置于磁力架中,待溶液澄清后(约5分钟),小心吸取25 μ L(或者100 μ L)上清至新的PCR管中;

[0168] 如果选择片段化纯化,可按照图2所示比例向产物中加入对应磁珠用量继续下面的实验步骤(以下适用插入片段为250bp的文库)。

[0169] 11. 吸取70 μ L(0.7 \times)AMPure XP磁珠至上述反应管中,用移液器轻轻吹打10次,充分混匀。

[0170] 12. 室温孵育5分钟。

[0171] 13. 将反应管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠。待溶液澄清后(约5分钟),小心转移上清至干净管中。

[0172] 14. 取20 μ L(0.2 \times)混匀的AMPure XP磁珠至上清中,用移液器轻轻吹打至充分混

匀。

[0173] 15. 室温孵育5分钟。

[0174] 16. 将反应管短暂离心后置于磁力架中分离磁珠,待溶液澄清后(约5分钟),小心移除上清。

[0175] 17. 保持反应管始终处于磁力架中,加入200 μ L新配制的80%乙醇漂洗磁珠。室温孵育30秒,小心移除上清。

[0176] 18. 重复步骤17。

[0177] 19. 将反应管瞬时离心,并用移液器再次吸尽残留液体。

[0178] 20. 打开反应管盖并保持反应管始终置于磁力架中,将磁珠暴露于空气中直至磁珠干燥(约5分钟)。

[0179] 21. 将反应管从磁力架中取出,加入27 μ L无菌超纯水洗脱DNA(涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀)。

[0180] 22. 将反应管瞬时离心并置于磁力架中,待溶液澄清后(约5分钟),小心吸取25 μ L上清至新的PCR管中。

[0181] 23. 将制备好的DNA文库置于-20 $^{\circ}$ C保存。

[0182] 十一、文库浓度

[0183] 为了得到高质量的测序结果,需要对DNA文库进行精确定量,首先推荐使用Real-time PCR方法对DNA文库进行绝对定量。此外,还可使用荧光染料法,如Qubit法,此处请勿使用基于吸光度测量的定量方法。最终可使用附图3近似公式换算DNA文库的摩尔浓度。

[0184] 十二、文库长度分布

[0185] 制备好的DNA文库可用琼脂糖凝胶电泳、Agilent 2100 Bioanalyzer或Fragment Analyzer全自动毛细管电泳系统检测DNA文库中的片段长度分布范围(图4)。

[0186] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员,在不脱离本发明方法的前提下,还可以做出若干改进和补充,这些改进和补充也应视为本发明的保护范围。

SEQUENCE LISTING

<110> 依科赛生物科技(太仓)有限公司
 <120> 一种针对FFPE样本的mRNA二代测序文库构建的试剂盒及其应用
 <130> /
 <160> 4
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <400> 1
 aatgatacgg cgaccaccga gatctacac 29
 <210> 2
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <400> 2
 caagcagaag acggcatacg agat 24
 <210> 3
 <211> 58
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <400> 3
 aatgatacgg cgaccaccga gatctacact ctttcctac acgacgctct tccgatct 58
 <210> 4
 <211> 65
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <400> 4
 gatcggaaga gcacacgtct gaactccagt cacaacgtga tatctcgtat gccgtcttct 60
 gcttg 65

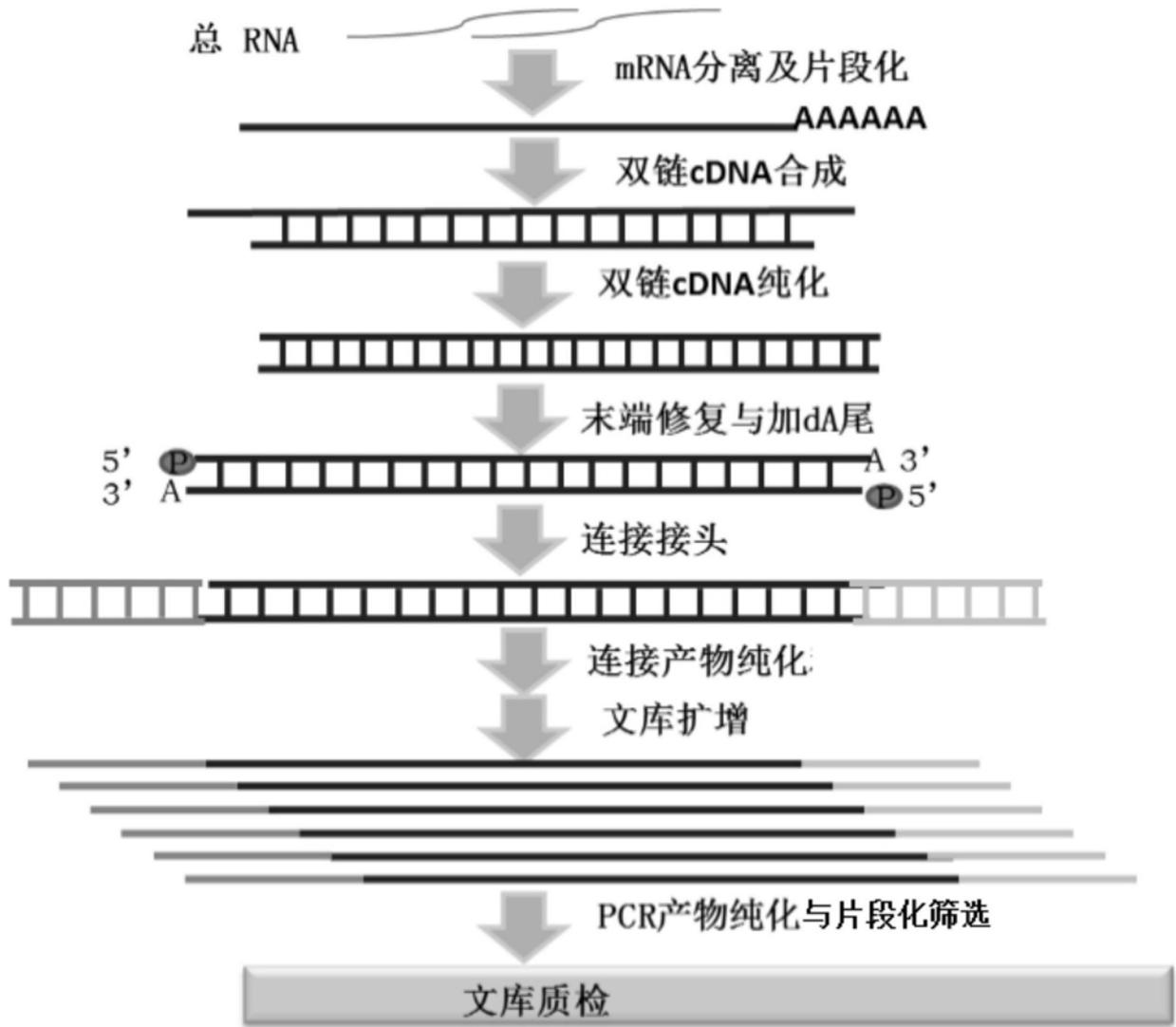


图1

DNA 文库大小	插入片段	150 bp	200 bp	250 bp	300 bp	400 bp	500 bp	700 bp
	(插入片段+接头)	270 bp	320 bp	370 bp	420 bp	520 bp	620 bp	820 bp
磁珠用量	第一次选择	0.9×	0.8×	0.7×	0.6×	0.55×	0.5×	0.45×
	第二次选择	0.2×	0.2×	0.2×	0.2×	0.15×	0.15×	0.15×

图2

文库平均总长度	近似转换公式	成簇反应 DNA 文库浓度
200 bp	1 ng/μL=7.5 nM	6-12 pM
300 bp	1 ng/μL=5.0 nM	6-12 pM
400 bp	1 ng/μL=3.8 nM	6-12 pM
500 bp	1 ng/μL=3.0nM	6-12 pM

图3

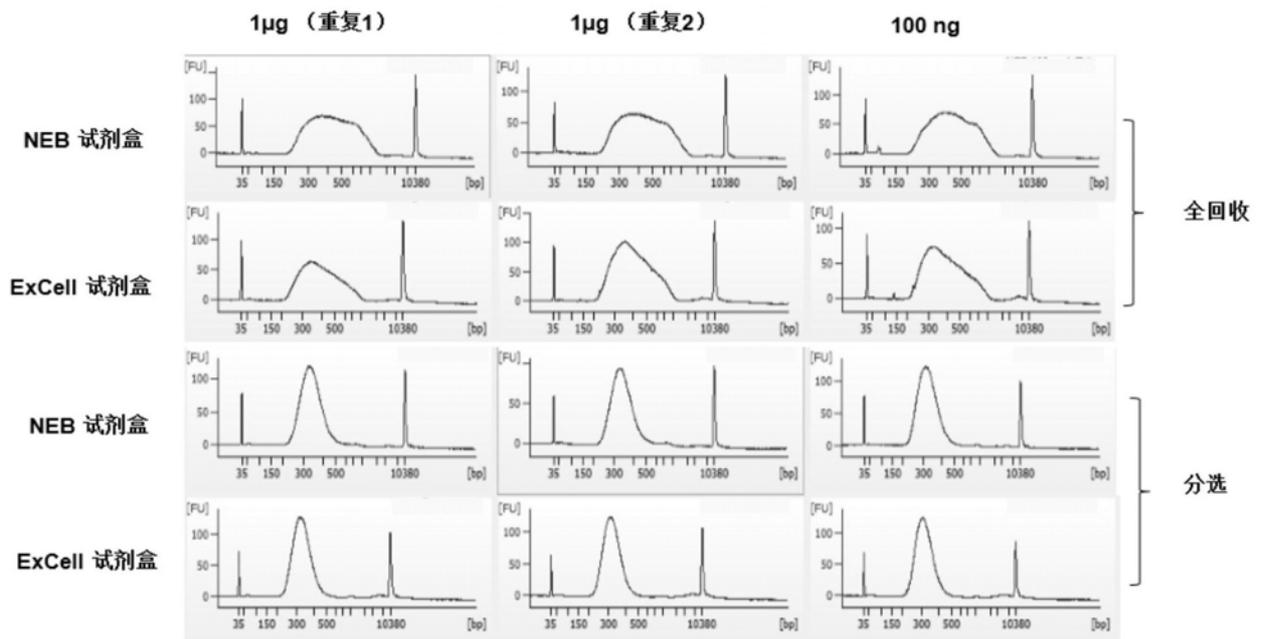


图4