



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107075508 B

(45) 授权公告日 2021.03.16

(21) 申请号 201480083529.2

(22) 申请日 2014.11.21

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107075508 A

(43) 申请公布日 2017.08.18

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2017.05.18

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2014/091953 2014.11.21

(87) PCT国际申请的公布数据
W02016/078096 ZH 2016.05.26

(73) 专利权人 深圳华大智造科技有限公司
地址 518083 广东省深圳市盐田区北山工
业区综合楼及11栋2楼

(72) 发明人 江媛 田凯 赵霞 章文蔚

徐怀前 蒋慧 拉多杰·德马纳克
耿春雨

(74) 专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事
务所(普通合伙) 11201

代理人 赵天月

(51) Int.Cl.

C12N 15/10 (2006.01)

C40B 50/06 (2006.01)

C40B 40/06 (2006.01)

C40B 80/00 (2006.01)

C12Q 1/6806 (2018.01)

C12Q 1/6869 (2018.01)

C12Q 1/6855 (2018.01)

审查员 熊壮壮

权利要求书3页 说明书10页

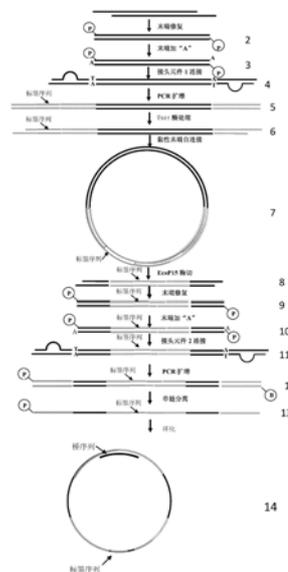
序列表2页 附图3页

(54) 发明名称

使用鼓泡状接头元件构建测序文库的方法

(57) 摘要

一种使用鼓泡状接头元件构建测序文库的方法,采用两个序列不同的鼓泡状接头元件,该鼓泡状接头元件的中间鼓泡结构为不匹配序列,以匹配的测序序列作为PCR引物,通过PCR过程,实现不匹配链的置换;该方法通过一次接头加载及PCR扩增过程就可以保证DNA片段两端连上不同的测序序列,同时实现片段扩增。利用该方法构建测序文库,可进行核酸测序。



1. 一种测序文库的构建方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 将双链DNA进行片段化,并对所得DNA片段进行平端修复、5'末端磷酸化和3'末端加碱基A;

2) 通过连接反应,在步骤1)所得DNA片段两端分别加上接头元件1;所述接头元件1包含一条核酸长链和一条核酸短链;所述核酸长链和核酸短链可退火形成两端序列互补、中间序列不互补而呈鼓泡状的杂交体;所述杂交体的核酸长链A的5'末端碱基经磷酸化修饰,所述杂交体的核酸短链B的3'末端带有突出的碱基T;所述接头元件1中具有III类限制性内切酶识别位点;

3) 以步骤2)所得DNA片段为模板,以分别对接头元件1的核酸长链和核酸短链的部分序列的两条序列不同的核酸单链为引物,进行PCR扩增;

所述两条引物的中部具有酶作用位点;

4) 利用所述酶作用位点,在步骤3)所得扩增片段两端制造粘性末端,利用粘性末端,将扩增片段连接成环状核酸双链;

5) 用III类限制性内切酶酶切消化步骤4)所得环状核酸双链,回收酶切后的DNA片段;

6) 对步骤5)所得酶切后的DNA片段进行平端修复和3'末端加碱基A;

7) 通过连接反应,在步骤6)所得DNA片段两端分别加上接头元件2;所述接头元件2包含一条核酸长链和一条核酸短链;所述核酸长链和核酸短链可退火形成两端序列互补、中间序列不互补而呈鼓泡状的杂交体;所述杂交体的核酸长链A的5'末端碱基经磷酸化修饰,所述杂交体的核酸短链B的3'末端带有突出的碱基T;

所述接头元件2的序列不同于接头元件1的序列;

8) 以步骤7)所得DNA片段为模板,以分别对接头元件2的核酸长链和核酸短链的部分序列的两条序列不同的核酸单链为引物,进行PCR扩增;其中一条引物的5'端第一个碱基带有磷酸化修饰,另一条引物的5'端第一个碱基带有生物素标记;

9) 利用亲和素磁珠回收步骤8)所得PCR产物,并进行变性处理,分离回收非生物素标记的核酸单链;

10) 将步骤9)所得非生物素标记的核酸单链进行环化,形成单链环状核酸产物,即为测序文库。

2. 根据权利要求1所述的构建方法,其特征在于,所述亲和素磁珠为连霉亲和素磁珠。

3. 根据权利要求1所述的构建方法,其特征在于,所述变性处理采用碱变性法或高温变性法。

4. 根据权利要求1所述的构建方法,其特征在于,利用介导片段实现所述核酸单链的环化,所述介导片段具有相应互补序列用于连接核酸单链的两端。

5. 根据权利要求1所述的构建方法,其特征在于,步骤10)中,还包括在核酸单链环化完成后,消化线性单链的步骤。

6. 根据权利要求5所述的构建方法,其特征在于,用核酸外切酶1和/或3进行所述消化。

7. 根据权利要求1所述的构建方法,其特征在于,步骤1)中,所述双链DNA片段是通过如下步骤制备的:

1-1) 对mRNA样本进行片段化处理,从而获得片段化的mRNA;

1-2) 对所述片段化的mRNA进行反转录,从而获得cDNA扩增产物,作为双链DNA片段。

8. 根据权利要求1所述的构建方法,其特征在于,所述双链DNA片段直接由DNA样本进行片段化处理而得。

9. 根据权利要求8所述的构建方法,其特征在于,所述片段化为利用物理方法或化学方法,对待测DNA进行随机打断或切断。

10. 根据权利要求9所述的构建方法,其特征在于,利用物理超声法或酶反应法进行待测DNA片段化。

11. 根据权利要求1所述的构建方法,其特征在于,所述平端修复是利用T4 DNA聚合酶进行的。

12. 根据权利要求1所述的构建方法,其特征在于,所述磷酸化是利用核苷酸激酶进行的。

13. 根据权利要求1所述的构建方法,其特征在于,所述磷酸化是利用T4多聚核苷酸激酶进行的。

14. 根据权利要求1所述的构建方法,其特征在于,所述3'末端加碱基A是利用去除3'→5'外切酶活性的Klenow聚合酶进行的。

15. 根据权利要求1所述的构建方法,其特征在于,所述接头元件1中的III类限制性内切酶为Acl I、Bpm I、BceA I、Bbv I、BciVI、BpuE I、BseMII、BseR I、Bsg I、BsmF I、BtgZ I、Eci I、EcoP15 I、Eco57M I、Fok I、Hga I、Hph I、Mbo II、Mnl I、SfaN I、TspDT I、TspDW I或Taq II。

16. 根据权利要求1所述的构建方法,其特征在于,所述III类限制性内切酶的识别位点距离所述杂交体的3'末端0-2bp。

17. 根据权利要求1所述的构建方法,其特征在于,所述接头元件1的核酸长链中包含标签序列。

18. 根据权利要求17所述的构建方法,其特征在于,所述标签序列长度为6-10nt。

19. 根据权利要求1-18任一项所述的构建方法,其特征在于,所述接头元件1的核酸长链的序列为:

5' -/Phos/ACTGCTGAGTCGAGA (N) CTGACAAGGTCGCCAGCCCTGAGTGCTTCGAA-3' ;其中/Phos/表示磷酸化修饰,N为标签序列。

20. 根据权利要求19所述的构建方法,其特征在于,所述标签序列长度为6nt-10nt。

21. 根据权利要求19所述的构建方法,其特征在于,所述标签序列为5' -TGTCATAAAT-3' ;

其核酸短链的序列为:

5' -CGAAGCACTCA AGGTCGCCAGCCCTCAGTACGTCAGCAGTT-3' 。

22. 根据权利要求1所述的构建方法,其特征在于,步骤3)中,PCR扩增所用引物分别为:

正向引物:5' -AGGUCGCCAGCCCUCAGTAC-3' ;

反向引物:5' -AGGGCUGGCGACCTGTCAG-3' 。

23. 根据权利要求1所述的构建方法,其特征在于,所述接头元件2的核酸长链的序列为:

5' -/Phos/AGTCGGAGGCCAAGCGTGCTTAGGATGAGTGCTCTCGAA-3' ,其中/Phos/表示磷酸化修饰;

所述核酸短链的序列为：

5' -CGAGAGCACTCCATGTAGTGTACGATCCGACTT-3' 。

24. 根据权利要求1所述的构建方法,其特征在于,步骤8)中,PCR扩增所用引物分别为：

正向引物:5' -TCCTAAGCACGCTTGGCCT-3' ；

反向引物:5' -CATGTAGTGTACGATCCGACTT-3' ；

所述正向引物的5' 端第一个碱基带有生物素标记,所述反向引物的5' 端第一个碱基具有磷酸化修饰。

25. 根据权利要求4所述的构建方法,其特征在于,步骤10)中,所述介导片段的序列为:5' -GTACTACTACATGTCCTAAGCACGC-3' 。

26. 根据权利要求1所述的构建方法,其特征在于,所述两条引物的中部具有的酶作用位点为U或dU,对应的酶为USER酶。

27. 一种测序文库,其特征在于,由权利要求1-26任一项所述构建方法制得。

28. 如权利要求27所述测序文库在基因组测序中的应用。

29. 根据权利要求28所述的应用,其特征在于,所述基因组测序为目标基因组区域测序。

30. 根据权利要求28所述的应用,其特征在于,使用单链环状文库测序平台进行测序。

31. 根据权利要求28所述的应用,其特征在于,使用Complete Genomics公司的测序平台进行测序。

32. 一种核酸测序方法,其特征在于,包括将权利要求27所述的测序文库进行测序的步骤。

33. 根据权利要求32所述的核酸测序方法,其特征在于,使用单链环状文库测序平台进行测序。

34. 根据权利要求32所述的核酸测序方法,其特征在于,使用Complete Genomics公司的测序平台进行测序。

35. 根据权利要求32所述的核酸测序方法,其特征在于,还包括将测序结果进行组装和/或拼接的步骤。

使用鼓泡状接头元件构建测序文库的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体地,涉及一种使用鼓泡状接头元件构建测序文库的方法,所构建的测序文库及其应用。

背景技术

[0002] 全基因组测序技术,是一种广泛覆盖物种全基因组碱基序列,检测个体基因组中全部遗传信息的研究手段。其准确性高,准确率可高达99.99%。随着二代高通量测序技术的发展,测序变得越来越快速、准确、低成本,全基因组测序在研究中得到了越来越广泛的应用。

[0003] CG测序是一种基于单链环化DNA的,需要引入已知序列的接头才能进行测序。通常,在构建基于Complete Genomics (CG) 测序平台的全基因组文库过程中,标准的CG全基因建库流程,需要分别加两组接头才能完成建库,且每组接头序列不同,加载步骤繁琐,用时较长。

[0004] 为解决Complete Genomics公司测序平台文库构建中存在的接头连接步骤过多,整体文库构建时间长等问题,特提出了本发明。

发明内容

[0005] 针对上述现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种使用鼓泡状接头元件构建测序文库的方法,所构建的测序文库及其应用。本发明通过使用一种鼓泡状接头元件,解决了CG测序平台双接头建库法中存在的接头连接步骤过多、PCR扩增次数多、整体文库构建时间长、成本高的问题,并且提高了建库效率,实现了双接头建库的优化。

[0006] 本发明通过以下技术方案实现上述目的:

[0007] 第一方面,本发明提供了一种测序文库的构建方法,该构建方法包括以下步骤:

[0008] 1) 将双链DNA进行片段化,并对所得DNA片段进行平端修复、5'末端磷酸化和3'末端加碱基A;

[0009] 2) 通过连接反应,在步骤1)所得DNA片段两端分别加上接头元件1;所述接头元件1包含一条核酸长链和一条核酸短链;所述核酸长链和核酸短链可退火形成两端序列互补、中间序列不互补而呈鼓泡状的杂交体;所述杂交体的核酸长链A的5'末端碱基经磷酸化修饰,所述杂交体的核酸短链B的3'末端带有突出的碱基T;所述接头元件1中具有III类限制性内切酶识别位点;

[0010] 3) 以步骤2)所得DNA片段为模板,以分别针对接头元件1的核酸长链和核酸短链的部分序列的两条序列不同的核酸单链为引物,进行PCR扩增;

[0011] 所述两条引物的中部具有酶作用位点;优选地,所述酶作用位点为U或dU,对应的酶为USER酶;

[0012] 4) 利用所述酶作用位点,在步骤3)所得扩增片段两端制造粘性末端,利用粘性末端,将扩增片段连接成环状核酸双链;

- [0013] 5) 用III类限制性内切酶酶切消化步骤4) 所得环状核酸双链,回收酶切后的DNA片段;
- [0014] 6) 对步骤5) 所得酶切后的DNA片段进行平端修复和3' 末端加碱基A;
- [0015] 7) 通过连接反应,在步骤6) 所得DNA片段两端分别加上接头元件2;所述接头元件2包含一条核酸长链和一条核酸短链;所述核酸长链和核酸短链可退火形成两端序列互补、中间序列不互补而呈鼓泡状的杂交体;所述杂交体的核酸长链A的5' 末端碱基经磷酸化修饰,所述杂交体的核酸短链B的3' 末端带有突出的碱基T;
- [0016] 所述接头元件2的序列不同于接头元件1的序列;
- [0017] 8) 以步骤7) 所得DNA片段为模板,以分别针对接头元件2的核酸长链和核酸短链的部分序列的两条序列不同的核酸单链为引物,进行PCR扩增;其中一条引物的5' 端第一个碱基带有磷酸化修饰,另一条引物的5' 端第一个碱基带有生物素标记;
- [0018] 9) 利用亲和素磁珠回收步骤8) 所得PCR产物,并进行变性处理,分离回收非生物素标记的核酸单链;
- [0019] 优选地,所述亲和素磁珠为连霉亲和素磁珠;
- [0020] 优选地,采用碱变性法或高温变性法;
- [0021] 10) 将步骤9) 所得非生物素标记的核酸单链进行环化,形成单链环状核酸产物,即为测序文库;
- [0022] 优选地,利用介导片段实现所述核酸单链的环化,所述介导片段具有相应互补序列用于连接核酸单链的两端;
- [0023] 优选地,还包括在核酸单链环化完成后,消化线性单链的步骤;进一步优选地,用核酸外切酶1和/或3进行消化。
- [0024] 对于上述构建方法,作为优选,步骤1) 中,所述双链DNA片段是通过如下步骤制备的:
- [0025] 1-1) 对mRNA样本进行片段化处理,从而获得片段化的mRNA;
- [0026] 1-2) 对所述片段化的mRNA进行反转录,从而获得cDNA扩增产物,作为双链DNA片段;
- [0027] 任选地,所述双链DNA片段直接由DNA样本进行片段化处理而得;
- [0028] 优选地,所述片段化为利用物理方法或化学方法,对待测DNA进行随机打断或切断;进一步优选地,利用物理超声法或酶反应法进行待测DNA片段化;
- [0029] 优选地,所述平端修复是利用T4 DNA聚合酶进行的;
- [0030] 优选地,所述磷酸化是利用核苷酸激酶、优选T4多聚核苷酸激酶进行的;
- [0031] 优选地,所述3' 末端加碱基A是利用去除3' →5' 外切酶活性的Klenow聚合酶进行的。
- [0032] 作为优选,所述接头元件1中的III类限制性内切酶为Acl I、Bpm I、BceA I、Bbv I、BciV I、BpuE I、BseM II、BseR I、Bsg I、BsmF I、BtgZ I、Eci I、EcoP15I、Eco57M I、Fok I、Hga I、Hph I、Mbo II、Mnl I、SfaN I、TspDT I、TspDW I或Taq II;
- [0033] 优选地,所述III类限制性内切酶的识别位点距离所述杂交体的3' 末端0-2bp;
- [0034] 优选地,所述接头元件1的核酸长链中包含标签序列;进一步优选地,所述标签序列长度为6-10nt。

[0035] 在一个优选的实施方案中,所述接头元件1中的核酸长链的序列为:5' -/Phos/ACTGCTGAGTCGAGA (N) CTGACAAGGTCGCCAGCCCTGAGTGCTTCGAA-3' ;其中,/Phos/表示磷酸化修饰,N为标签序列;优选地,所述标签序列长度为6nt-10nt;更优选地,所述标签序列为5' -TGTCATAAAT-3' ;即,在一个更优选的具体实施方案中,所述接头元件1中的核酸长链的序列为:

[0036] 5' -/Phos/ACTGCTGAGTCGAGATGTCATAAATCTGACAAGGTCGCCAGCCCTGAGTGCTTCGAA-3' (见SEQ ID NO:1);

[0037] 其核酸短链的序列为:

[0038] 5' -CGAAGCACTCAAGGTCGCCAGCCCTCAGTACGTCAGCAGTT-3' ,见SEQ ID NO:2。

[0039] 当采用上述接头元件1时,优选地,步骤3)中,PCR扩增所用引物分别为:

[0040] 正向引物:5' -AGGUCGCCAGCCCUCAGTAC-3' (见SEQ ID NO:5);

[0041] 反向引物:5' -AGGGCUGGCGACCTGTCAG-3' (见SEQ ID NO:6)。

[0042] 当采用上述接头元件1时,优选地,所述接头元件2中的核酸长链的序列为:5' -/Phos/AGTCGGAGGCCAAGCGTGCTTAGGATGAGTGCTCTCGAA-3' ,其中/Phos/表示磷酸化修饰,见SEQ ID NO:3;其核酸短链的序列为:5' -CGAGAGCACTCCATGTAGTGTACGATCCGACTT-3' ,见SEQ ID NO:4。

[0043] 当采用上述接头元件2时,优选地,步骤8)中,PCR扩增所用引物分别为:

[0044] 正向引物:5' -TCCTAAGCACGCTTGGCCT-3' (见SEQ ID NO:7);

[0045] 反向引物:5' -CATGTAGTGTACGATCCGACTT-3' (见SEQ ID NO:8);

[0046] 其中,所述正向引物的5' 端第一个碱基带有生物素标记,所述反向引物的5' 端第一个碱基具有磷酸化修饰。

[0047] 当采用上述接头元件2时,优选地,步骤10)中,所述介导片段的序列为:5' -GTACTACTACATGTCCTAAGCACGC-3' ,见SEQ ID NO:9。

[0048] 第二方面,本发明提供了一种测序文库,其是由如第一方面所述的测序文库的构建方法制得。

[0049] 第三方面,本发明提供了如第二方面所述测序文库在基因组测序、优选地在目标基因组区域测序中的应用;

[0050] 作为优选,使用单链环状文库测序平台进行测序;进一步优选地,使用Complete Genomics公司的测序平台进行测序。

[0051] 第四方面,本发明提供了一种核酸测序方法,该测序方法包括将如第二方面所述的测序文库进行测序的步骤;

[0052] 优选地,使用单链环状文库测序平台进行测序;进一步优选地,使用Complete Genomics公司的测序平台进行测序;

[0053] 优选地,还包括将测序结果进行组装和/或拼接的步骤。

[0054] 有益效果

[0055] 现有双接头建库,每次加接头需要加两种不同的接头,需要多步处理才能进行PCR扩增;整个建库过程需要使用四种不同的接头完成两次接头的加载。而本发明的测序文库构建方法,每次添加接头只需要用一种接头同时加载在DNA片段的3' 及5' 末端,就可以进行PCR扩增;整个建库过程需要使用两种不同的接头完成两次接头的加载(见附图2)。此外,本

发明构建方法所采用的接头元件通过中间鼓泡结构的不匹配序列,在PCR的过程中,不匹配链被替换,匹配的测序序列作为PCR引物而实现置换。这样,通过一次接头加载及PCR扩增过程,就可以保证DNA片段两端连上不同的测序序列,同时实现了片段扩增,节约了建库的时间成本和物料成本。

[0056] 本发明的测序文库的构建方法缩减了现有建库步骤,缩短了建库周期,有效节约了建库的成本,并且提高了建库效率,实现了双接头建库的优化。

附图说明

[0057] 图1显示实施例中接头元件1退火形成的杂交体结构;

[0058] 图2显示实施例中接头元件2退火形成的杂交体结构;

[0059] 图3图解说明了本发明的测序文库构建方案;其中  表示碱基被磷酸化;  表示碱基加有生物素标记;其中:1为打断后的DNA片段;2为经过平端修复、磷酸化作用后的片段;3为3'末端加上碱基A的DNA片段;4为加接头元件1后的DNA片段;5为加接头元件1的DNA片段进行PCR扩增后的产物;6为经过USER酶酶切后的具有粘性末端的DNA片段;7为利用粘性末端环化所形成的双链环状DNA;8为经过III类限制性内切酶切割之后形成的线状DNA片段;9为经过末端修复、磷酸化处理后的DNA片段;10为3'末端加碱基A的DNA片段;11为加接头元件2后的DNA片段;12为加接头元件2的DNA片段进行PCR扩增后的产物;13为利用生物素标记分离的单链DNA;14为文库构建最终产物,即单链环化DNA;

[0060] 图4为实施例中文库构建最终产物的电泳结果;左边泳道为单链环状DNA文库,右边泳道为Low Range RNA Ladder (FERMENTAS)。

具体实施方式

[0061] 为便于理解本发明,本发明列举实施例如下。本领域技术人员应该明了,所述实施例仅仅是帮助理解本发明,不应视为对本发明的具体限制。

[0062] 实施例1本发明的测序文库构建

[0063] 1、基因组打断

[0064] 取来源于人淋巴组织的炎黄细胞基因组DNA 1ug,用TE缓冲液稀释至80ul,加入Covaris专用打断平板,选用Covaris LE220超声打断仪,将DNA打断至约200bp到400bp之间。参数如下表所示:

| | | |
|--------|---------|--------|
| [0065] | 填充系数 | 21% |
| | 压力(PIP) | 500 |
| | 脉冲系数 | 500 |
| | 打断时间 | 20s,6次 |

[0066] 将打断完成的基因组吸入新的1.5ml不粘EP管,加入64ul的Ampure xp磁珠,混匀,室温静置5分钟后,置入磁力架吸附磁珠。5分钟后,吸取上清置于另一个新的不粘EP管,再加入32ul的Ampure xp磁珠,混匀,室温放置5分钟。置入磁力架吸附磁珠5分钟,弃去上清,用75%乙醇洗磁珠两次;晾干后加入42ul TE缓冲溶液或无酶水,混匀后放置5min溶解回收产物。

[0067] 2、末端修复

[0068] 预先配制末端修复的反应预混液,如下表所示:

| | | |
|--------|--------------|--------|
| [0069] | 10x多核苷酸激酶缓冲液 | 5.5ul |
| | 25mM三磷酸脱氧核苷酸 | 3ul |
| | T4 DNA聚合酶 | 3ul |
| | T4多核苷酸激酶 | 3ul |
| | Klenow片段 | 1ul |
| | 总体积 | 15.5ul |

[0070] 在上述步骤得到的DNA加入预混液,混匀,置于20℃孵育30分钟。取出后,加入60ul Ampure xp磁珠,混匀,室温静置5分钟。弃去上清,用75%酒精清洗两次。晾干,加入42ul TE缓冲液溶解(此为磁珠纯化标准步骤,如不做特殊说明,都用的是这种方式做磁珠纯化,下同,不再赘述)。

[0071] 3、末端加“A”

[0072] 按下表配制预混液:

| | | |
|--------|-------------------------|------|
| [0073] | 10xBlue缓冲液 (Enzymatics) | 5ul |
| | 10mM ATP | 1ul |
| | Klenow (3`-5`exo-) 酶 | 2ul |
| | 无酶水 | 2ul |
| | 总体积 | 10ul |

[0074] 在上述步骤得到的DNA加入预混液,混匀,置于37℃孵育30分钟,用50ul Ampure xp磁珠纯化,晾干后溶解于42ul TE缓冲液。

[0075] 4、连接接头元件1

[0076] 所述接头元件1的序列结构如附图1所示,其中标签序列N为5' -TGTCATAAAT-3'。

[0077] 按下表提前配制预混液:

| | | |
|--------|-----------------------|-----|
| [0078] | 10x连接缓冲液 (Enzymatics) | 5ul |
| | 接头元件1 (20uM) | 2ul |
| | 总体积 | 7ul |

[0079] 将上述预混液加入上一步所得DNA溶液,混匀后,加入2ul T4 DNA连接酶,再次混匀后置于20℃孵育1小时。用Ampure XP磁珠纯化后,溶于42ul TE。

[0080] 5、PCR扩增

[0081] 引物1的序列为:5' -AGGUCGCCAGCCCUCAGTAC-3' ;

[0082] 引物2的序列为:5' -AGGGCUGGCGACCTGTCAG-3' 。

[0083] 按下表提前配制反应预混液:

| | | |
|--------|--|-------|
| [0084] | 无酶水 | 4 ul |
| | 10x PfuTurbo Cx 缓冲液 (Agilent 公司) | 50 ul |
| | PfuTurbo Cx 热启动核酸聚合酶 (2.5U/ul) (Agilent 公司) | 2 ul |
| | 20 uM 引物 1 | 2 ul |
| | 20 uM 引物 2 | 2 ul |
| | 总体积 | 60 ul |

[0085] 在上述步骤得到的DNA溶液中加入预混液,混匀。置于PCR仪中进行PCR反应,程序如下:

| | | |
|--------|---------------|-------|
| [0086] | 95°C | 3 min |
| | 95°C | 30 s |
| | 56°C | 30 s |
| | 72°C | 90 s |
| | 步骤 2-4 重复 7 次 | |
| | 68°C | 7 min |

[0087] 反应完成后使用100ul Ampure XP磁珠进行纯化,溶于82ul TE。

[0088] 6、去尿嘧啶

[0089] 按下表提前配制反应预混液:

| | | |
|--------|---------------------|--------|
| [0090] | 无酶水 | 5.8ul |
| | 10X Taq缓冲液 (Takara) | 11ul |
| | USER酶 (1000U/ml) | 13.2ul |
| | 总体积 | 30ul |

[0091] 将所配制的反应预混液加入上步骤反应产物中,混匀后置于37°C反应1h。

[0092] 7、双链环化

[0093] 配制以下反应体系1:

| | | |
|--------|---------------------------|---------|
| [0094] | 无酶水 | 1520 ul |
| [0095] | 10× TA 缓冲液 (epicentre 公司) | 180 ul |
| | 总体积 | 1700 ul |

[0096] 将上一步骤反应产物加入反应体系1中,混匀后置于60°C反应30min。反应完成后置于24°C。

[0097] 配制以下反应体系2:

| | | |
|--------|--------------------------------------|-------|
| [0098] | 无酶水 | 194ul |
| | T4 DNA连接酶(快速)(600U/ul)(enzymatics公司) | 6ul |
| | 总体积 | 200ul |

[0099] 将反应体系2加入反应体系1中,置于24℃反应1h。

[0100] 取反应产物,加入1320ul Ampure XP磁珠,混匀后放置5分钟;置入磁力架后收集上清,在上清中加入680ul Ampure XP磁珠,混匀后放置5分钟;置入磁力架吸去上清,用75%乙醇洗磁珠两次;晾干后加入65ul TE缓冲溶液或无酶水,混匀后放置5分钟溶解回收产物。

[0101] 8、线性消化

[0102] 按下表提前配制反应预混液:

| | | |
|--------|--------------------------------------|-------|
| [0103] | 无酶水 | 2 ul |
| | 质粒保护性 10X 反应缓冲液 (Epicentre 公司) | 8 ul |
| | 质粒保护性三磷酸腺苷依赖性 DNA 核酸酶 (Epicentre 公司) | 10 ul |
| | 总体积 | 20 ul |

[0104] 将所制备的反应预混液加入上一步所得到的DNA溶液中,混匀后置于37℃反应1h。

[0105] 使用80ul Ampure XP磁珠纯化。使用42ul TE缓冲液或无酶水溶解回收产物。

[0106] 9、Ecop15酶切处理

[0107] 按下表所示提前配制反应预混液:

| | | |
|--------|-----------------------|-------|
| [0108] | 无酶水 | 274ul |
| | 10X NEBuffer3.1 (NEB) | 36ul |
| | Ecop15I内切酶(10U/ul) | 10ul |
| | 总体积 | 320ul |

[0109] 将反应预混液加入上一步所得到的DNA溶液,混匀,置于37℃反应16h。

[0110] 反应完成后,取反应产物,加入415ul Ampure XP磁珠,混匀后放置5min;置入磁力架后收集上清,在上清中加入296ul Ampure XP磁珠,混匀后放置5min;置入磁力架上吸去上清,用75%乙醇洗磁珠两次;晾干后加入42ul TE缓冲溶液或无酶水,混匀后放置5min溶解回收产物。

[0111] 10、末端修复

[0112] 按下表预先配制末端修复的反应预混液:

| | | |
|--------|--------------|--------|
| [0113] | 10x多核苷酸激酶缓冲液 | 5.5ul |
| | 25mM三磷酸脱氧核苷酸 | 3ul |
| | T4 DNA聚合酶 | 3ul |
| | T4多核苷酸激酶 | 3ul |
| | Klenow片段 | 1ul |
| | 总体积 | 15.5ul |

[0114] 在上述步骤得到的DNA溶液中加入所配制的反应预混液,混匀,置于20℃孵育30分钟。完成用60ul的Ampure xp磁珠纯化。晾干后,加入42ul TE缓冲液溶解。

[0115] 11、末端加“A”

[0116] 按下表所示提前配制预混液:

| | | |
|--------|------------------------|------|
| [0117] | 10xBlue缓冲液 (Ezymatics) | 5ul |
| | 10mM ATP | 1ul |
| | Klenow (3`-5`exo-) 酶 | 2ul |
| | 无酶水 | 2ul |
| | 总体积 | 10ul |

[0118] 在上述步骤得到的DNA溶液中加入如上配制的反应预混液,混匀,置于37℃孵育30分钟,用50ul Ampure xp磁珠纯化,晾干后溶解于42ul TE缓冲液。

[0119] 12、连接接头元件2

[0120] 接头元件2的序列结构如附图2所示。

[0121] 按下表所示提前配制预混液:

| | | |
|--------|---------------------------|-----|
| [0122] | 10x 连接缓冲液 (Enzymatics) | 5ul |
| | 接头 2 (20uM) | 2ul |
| | 总体积 | 7ul |

[0123] 将上述预混液加入上一步所得DNA溶液,混匀后,加入2ul T4 DNA连接酶,再次混匀后置于20℃孵育1小时。用Ampure XP磁珠纯化后,溶于42ul TE。

[0124] 13、PCR扩增

[0125] 引物3的序列为:5'-TCCTAAGCACGCTTGGCCT-3',其5'端第一个碱基T带有生物素标记;

[0126] 引物4的序列为:5'-CATGTAGTGTACGATCCGACTT-3',其5'端第一个碱基C具有磷酸化修饰。

[0127] 按下表所示提前配制反应预混液:

| | | |
|--------|--|-------|
| [0128] | 无酶水 | 4 ul |
| | 10x PfuTurbo Cx 缓冲液 (Agilent 公司) | 50 ul |
| | PfuTurbo Cx 热启动核酸聚合酶 (2.5U/ul) (Agilent 公司) | 2 ul |
| | 20 uM 引物 3 | 2 ul |
| | 20 uM 引物 4 | 2 ul |
| | 总体积 | 60 ul |

[0129] 在上述步骤得到的DNA溶液中加入如上配制的预混液,混匀。置于PCR仪中进行PCR

反应,PCR程序如下:

| | | |
|--------|---------------|-------|
| [0130] | 95°C | 3 min |
| | 95°C | 30 s |
| | 56°C | 30 s |
| | 72°C | 90 s |
| | 步骤 2-4 重复 7 次 | |
| | 68°C | 7 min |

[0131] 反应完成后,使用100ul Ampure XP磁珠进行纯化,溶于62ul TE。

[0132] 14、单链分离与环化

[0133] 提前将链霉亲和素包裹的磁珠 (Dynabeads® MyOne™ Streptavidin, Life technologies) 室温平衡半个小时。

[0134] 吸取30ul上述磁珠加入一新的离心管中,加入120ul 1x磁珠结合缓冲液,混匀,置入磁力架静置5分钟,待上清变澄清后吸去上清。再加入30ul 1x磁珠结合缓冲液重悬磁珠备用。

[0135] 将上一步骤产生的PCR产物用20ul 4x磁珠结合缓冲液稀释,混匀,加入到重悬后的磁珠,混匀,室温结合5分钟,再置入磁力架静置5分钟,待上清变澄清后吸去上清。

[0136] 用1ml 1x磁珠洗涤缓冲液重悬磁珠,再置入磁力架静置5分钟以吸去上清。重复一次。向管中加入78ul 0.1M的氢氧化钠溶液重悬磁珠,静置5分钟后置入磁力架,5分钟后吸取上清加入新的离心管中,再在其中加入37.5ul MOPS缓冲液,混匀。

[0137] 如下表所示提前配制环化反应预混液1 (其中桥序列 (又可称为介导片段) 如SEQ IDNO:9所示,即5' -GTACACTACATGTCCTAAGCACGC-3') :

| | | |
|--------|-----|------|
| [0138] | 无酶水 | 43ul |
| | 桥序列 | 20ul |
| | 总共 | 63ul |

[0139] 将如上配制的预混液加入上述分离出来的DNA单链溶液中,混匀。

[0140] 如下表所示配制环化反应预混液2:

| | | |
|--------|--|----------|
| [0141] | 无酶水 | 135.3 ul |
| | 10× TA 缓冲液 (epicentre 公司) | 35 ul |
| | 100 mM 三磷酸腺苷 | 3.5 ul |
| | T4 DNA 连接酶 (快速) (600U/ul) (enzymatics 公司) | 1.2 ul |
| | 总共 | 175 ul |

[0142] 将反应预混液2加入到DNA单链溶液中,混匀,置于37℃孵育1.5小时。

[0143] 15、单链纯化

[0144] 如下表所示提前配制酶切反应液:

| | | |
|--------|-------------------------------|---------|
| [0145] | 无酶水 | 1.5 ul |
| | 10× TA 缓冲液 (epicentre 公司) | 3.7 ul |
| | 核酸外切酶 1 (20U/ul) (NEB 公司) | 11.1 ul |
| | 核酸外切酶 3 (100U/ul) (NEB 公司) | 3.7 ul |
| | 总共 | 20 ul |

[0146] 向上一步的约350ul的样品反应液中加入20ul的酶切反应液,混匀,继续于37℃孵育30分钟。

[0147] 反应完成后,向反应液中加入15.4ul的500mM的乙二胺四乙酸,混匀。

[0148] 使用800ul Ampure XP磁珠纯化回收,待晾干后加入40ul的TE缓冲液溶解环状DNA文库。

[0149] 在6%的尿素变性PAGE胶检测构建好的文库,结果见附图4。

[0150] 图4电泳结果显示:所得单链环状DNA片段集中,是质量非常高的文库;证明本发明所采用的技术方法是完全可行的。

[0151] 申请人声明,本发明通过上述实施例来说明本发明的详细工艺设备和工艺流程,但本发明并不局限于上述详细工艺设备和工艺流程,即不意味着本发明必须依赖上述详细工艺设备和工艺流程才能实施。所属技术领域的技术人员应该明了,对本发明的任何改进,对本发明产品各原料的等效替换及辅助成分的添加、具体方式的选择等,均落在本发明的保护范围和公开范围之内。

- [0001] SEQUENCE LISTING
- [0002] <110> 深圳华大基因科技有限公司
- [0003] <120> 使用鼓泡状接头元件构建测序文库的方法
- [0004] <130> PIDC3171299PCN
- [0005] <160> 9
- [0006] <170> PatentIn version 3.3
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 57
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> 人工序列
- [0011] <223> /分子类型="DNA"
- [0012] //Phos/"="末端磷酸基团修饰"
- [0013] <400> 1
- [0014] /Phos/actgctgagt cgagatgtca taaatctgac aaggtegcca gcctgagtg cttcgaa 57
- [0015] <210> 2
- [0016] <211> 41
- [0017] <212> DNA
- [0018] <213> 人工序列
- [0019] <400> 2
- [0020] cgaagcactc aaggtegcca gcctcagta cgtcagcagt t 41
- [0021] <210> 3
- [0022] <211> 39
- [0023] <212> DNA
- [0024] <213> 人工序列
- [0025] <223> /分子类型="DNA"
- [0026] //Phos/"="末端磷酸基团修饰"
- [0027] <400> 3
- [0028] /Phos/agtccgagc caagcgtgct taggatgagt gctctcgaa 39
- [0029] <210> 4
- [0030] <211> 33
- [0031] <212> DNA
- [0032] <213> 人工序列
- [0033] <400> 4
- [0034] cgagagcact ccatgtagtg tacgatccga ctt 33
- [0035] <210> 5
- [0036] <211> 20
- [0037] <212> DNA
- [0038] <213> 人工序列
- [0039] <400> 5
- [0040] aggucgccag cccucagtac 20
- [0041] <210> 6

-
- [0042] <211> 20
[0043] <212> DNA
[0044] <213> 人工序列
[0045] <400> 6
[0046] agggcuggcg accutgtcag 20
[0047] <210> 7
[0048] <211> 19
[0049] <212> DNA
[0050] <213> 人工序列
[0051] <400> 7
[0052] tcctaagcac gcttggcct 19
[0053] <210> 8
[0054] <211> 22
[0055] <212> DNA
[0056] <213> 人工序列
[0057] <400> 8
[0058] catgtagtgt acgatccgac tt 22
[0059] <210> 9
[0060] <211> 24
[0061] <212> DNA
[0062] <213> 人工序列
[0063] <400> 9
[0064] gtacactaca tgtcctaagc acgc 24

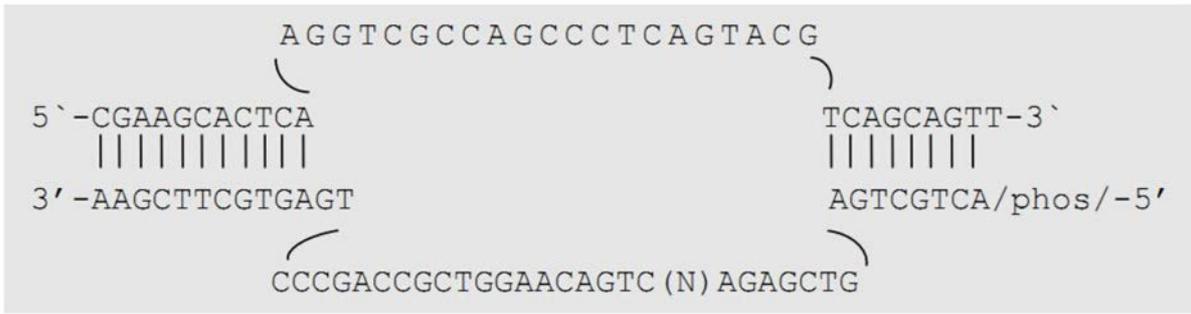


图1

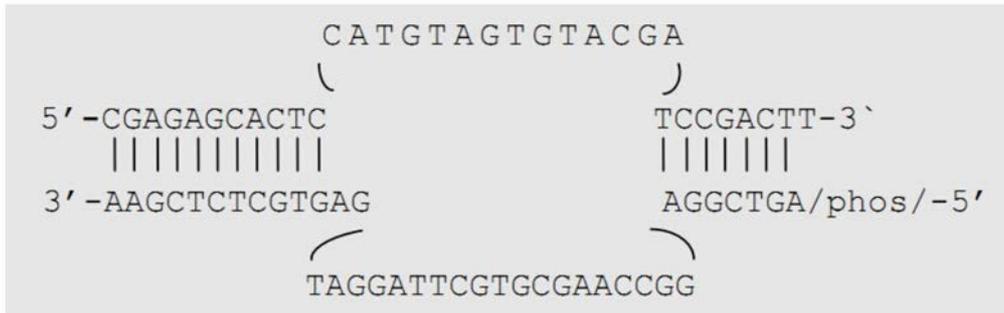


图2

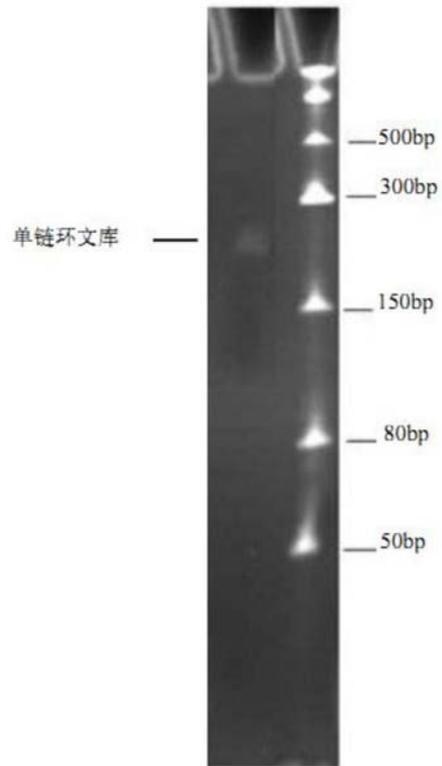


图4