



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103668471 A

(43) 申请公布日 2014. 03. 26

(21) 申请号 201310706375. 5

(22) 申请日 2013. 12. 19

(71) 申请人 上海交通大学

地址 200240 上海市闵行区东川路 800 号

(72) 发明人 李鑫辉 杨文超 邵志峰

(74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司

公司 31266

代理人 祝莲君 刘真真

(51) Int. Cl.

C40B 50/06 (2006. 01)

C40B 40/06 (2006. 01)

C12N 15/10 (2006. 01)

C12Q 1/68 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书7页

序列表2页 附图4页

(54) 发明名称

一种构建 DNA 高通量测序文库的方法及其配套试剂盒

(57) 摘要

本发明提供了一种构建 DNA 高通量测序文库的方法及其配套试剂盒,具体地,本发明提供了一种基于核酸样品构建测序文库的方法,所述方法包括:对用于构建测序文库的核酸样品进行变性处理使其解链为单链核酸,将其与第一衔接子进行退火反应和连接反应,从而形成“第一衔接子-单链核酸”复合物;将所述复合物吸附于磁珠,与第二衔接子进行退火反应和连接反应,从而形成吸附有“第一衔接子-单链核酸-第二衔接子”复合物的磁珠,将经清洗的磁珠进行 PCR 反应,获得扩增产物,用于构建测序文库。

1. 一种基于核酸样品构建测序文库的方法,其特征在于,包括步骤:

(a) 提供一用于构建测序文库的核酸样品;

(b) 对所述核酸样品进行变性处理,使所述核酸解链为单链核酸;

(c) 将所述单链核酸与第一衔接子(adaptor)进行退火反应,从而使得第一衔接子捕获所述单链,并进行连接反应,从而形成“第一衔接子-单链核酸”复合物,其中所述第一衔接子为双链,正链的5'端连接有生物素并且3'端具有呈单链形式的、用于捕获单链核酸的第一捕获序列,而负链为与正链互补的序列;

(d) 将“第一衔接子-单链核酸”复合物与表面包被有亲和素的磁珠进行混合,从而将所述的“第一衔接子-单链核酸”复合物吸附于所述磁珠;

(e) 对上一步骤获得的磁珠进行清洗,获得经清洗的、吸附有“第一衔接子-单链核酸”复合物的磁珠;

(f) 将上一步骤获得的、经清洗的且吸附有“第一衔接子-单链核酸”复合物的磁珠与第二衔接子进行退火反应,从而使得第二衔接子结合于所述单链的游离端,并进行连接反应,从而形成吸附有“第一衔接子-单链核酸-第二衔接子”复合物的磁珠,

其中所述第二衔接子为双链,正链的5'端具有呈单链形式的、用于结合于单链核酸的第二捕获序列,而负链为与正链互补的序列;

(g) 对上一步骤获得的磁珠进行清洗,获得经清洗的、吸附有“第一衔接子-单链核酸-第二衔接子”复合物的磁珠;

(h) 将上一步骤获得的经清洗的磁珠,用特异性结合于第一衔接子的第一引物和特异性结合于第二衔接子的第二引物,进行PCR反应,获得第一扩增产物,用于构建测序文库。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述方法还包括:

(i) 以第一扩增产物为模板,用第三引物和第四引物进行PCR扩增,从而获得第二扩增产物,其中所述的第二扩增产物的两端引入了测序接头序列。

3. 如权利要求2所述的方法,其特征在于,所述的第三引物的5'端含有测序接头序列且3'端含有部分或全部第一引物序列;而所述的第四引物与第二引物相同。

4. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的第一衔接头的结构如下,从5'至3'端:

生物素标记物-双链互补区-单链捕获区

其中,双链互补区的长度为15-100bp;而单链捕获区的长度为5-10bp。

5. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的核酸样品的总量为20-100pg。

6. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的核酸样品包括DNA样品、RNA样品。

7. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的捕获序列为5-8个碱基的随机序列。

8. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,

所述的第一衔接子的正链双链区序列如SEQ ID NO:1所示;

所述的第一衔接子的反链双链区序列如SEQ ID NO:2所示;

所述的第二衔接子的正链双链区序列如SEQ ID NO:3所示;

所述的第二衔接子的反链双链区序列如SEQ ID NO:4所示。

9. 一种基于核酸样品构建测序文库的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括:

一第一衔接子,所述第一衔接子为双链,正链的5'端连接有生物素标记物并且3'端具

有呈单链形式的、用于捕获单链核酸的第一捕获序列,而负链为与正链互补的序列;

一第二衔接子,所述的第二衔接子为双链,正链的5'端具有呈单链形式的、用于结合于单链核酸的第二捕获序列,而负链为与正链互补的序列;

一磁珠,所述磁珠表面包被有亲和素;

和说明书,所述的说明书记载了使用方法。

10. 如权利要求9所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括:特异性结合于第一衔接子的第一引物;和特异性结合于第二衔接子的第二引物。

一种构建 DNA 高通量测序文库的方法及其配套试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,更具体地,涉及一种构建 DNA 高通量测序文库的方法及其配套试剂盒。

背景技术

[0002] 随着高通量测序技术的不断普及,已经出现了针对不同形式核酸样品的各种高通量测序文库构建方法,其中包括双链 DNA (Bentley, D. R., et al., Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. Nature, 2008. 456(7218):p. 53-9)、单链 DNA (Smith, D. J. and I. Whitehouse, Intrinsic coupling of lagging-strand synthesis to chromatin assembly. Nature, 2012. 483(7390):p. 434-8.)、RNA (Mortazavi, A., et al., Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. Nat Methods, 2008. 5(7):p. 621-8) 以及小 RNA (Zhang, H., et al., Genome-wide analysis of small RNA and novel MicroRNA discovery in human acute lymphoblastic leukemia based on extensive sequencing approach. PLoS One, 2009. 4(9):p. e6849) 等。这些方法通常都要求较大的样品起始量,一般是 200ng 以上。然而,当起始样品量较少时(少至 50pg),由于分子碰撞几率降低以及杂质干扰,连接和扩增反应的难度都会大大增加。

[0003] 因此,本领域尚缺乏一种专门针对少量 DNA 样品的高通量测序文库构建方法。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种专门针对少量 DNA 样品的高通量测序文库构建方法。

[0005] 本发明的第一方面,提供了一种基于核酸样品构建测序文库的方法,所述方法包括步骤:

[0006] (a) 提供一用于构建测序文库的核酸样品;

[0007] (b) 对所述核酸样品进行变性处理,使所述核酸解链为单链核酸;

[0008] (c) 将所述单链核酸与第一衔接子(adaptor)进行退火反应,从而使得第一衔接子捕获所述单链,并进行连接反应,从而形成“第一衔接子-单链核酸”复合物,其中所述第一衔接子为双链,正链的 5' 端连接有生物素并且 3' 端具有呈单链形式的、用于捕获单链核酸的第一捕获序列,而负链为与正链互补的序列;

[0009] (d) 将“第一衔接子-单链核酸”复合物与表面包被有亲和素的磁珠进行混合,从而将所述的“第一衔接子-单链核酸”复合物吸附于所述磁珠;

[0010] (e) 对上一步骤获得的磁珠进行清洗,获得经清洗的、吸附有“第一衔接子-单链核酸”复合物的磁珠;

[0011] (f) 将上一步骤获得的、经清洗的且吸附有“第一衔接子-单链核酸”复合物的磁珠与第二衔接子进行退火反应,从而使得第二衔接子结合于所述单链的游离端,并进行连接反应,从而形成吸附有“第一衔接子-单链核酸-第二衔接子”复合物的磁珠,

[0012] 其中所述第二衔接子为双链,正链的 5' 端具有呈单链形式的、用于结合于单链核酸的第二捕获序列,而负链为与正链互补的序列;

[0013] (g) 对上一步骤获得的磁珠进行清洗,获得经清洗的、吸附有“第一衔接子-单链核酸-第二衔接子”复合物的磁珠;

[0014] (h) 将上一步骤获得的经清洗的磁珠,用特异性结合于第一衔接子的第一引物和特异性结合于第二衔接子的第二引物,进行 PCR 反应,获得第一扩增产物,用于构建测序文库。

[0015] 在另一优选例中,所述核酸样品的总量为 10-200pg。

[0016] 在另一优选例中,所述方法还包括:

[0017] (i) 以第一扩增产物为模板,用第三引物和第四引物进行 PCR 扩增,从而获得第二扩增产物,其中所述的第二扩增产物的两端引入了测序接头序列。

[0018] 在另一优选例中,所述的第三引物的 5' 端含有测序接头序列且 3' 端含有部分或全部第一引物序列;而所述的第四引物与第二引物相同。

[0019] 在另一优选例中,所述的第一衔接头的结构如下,从 5' 至 3' 端:

[0020] 生物素标记物-双链互补区-单链捕获区

[0021] 其中,双链互补区的长度为 15-100bp;而单链捕获区的长度为 5-10bp。

[0022] 在另一优选例中,所述的核酸样品的总量为 20-100pg。

[0023] 在另一优选例中,所述的核酸样品包括 DNA 样品、RNA 样品。

[0024] 在另一优选例中,所述的捕获序列为 5-8 个碱基的随机序列。

[0025] 在另一优选例中,

[0026] 所述的第一衔接子的正链双链区序列如 SEQ ID NO:1 所示;

[0027] 所述的第一衔接子的反链双链区序列如 SEQ ID NO:2 所示;

[0028] 所述的第二衔接子的正链双链区序列如 SEQ ID NO:3 所示;

[0029] 所述的第二衔接子的反链双链区序列如 SEQ ID NO:4 所示。

[0030] 在另一优选例中,所述第一引物的序列如 SEQ ID NO:5 所示。

[0031] 在另一优选例中,所述第二引物的序列如 SEQ ID NO:6 所示。

[0032] 在另一优选例中,所述第三引物的序列如 SEQ ID NO:7 所示。

[0033] 在另一优选例中,所述阳性对照序列如 SEQ ID NO:8 所示。

[0034] 在另一优选例中,所述的核酸样品的总量为 20-100pg。

[0035] 在另一优选例中,第一衔接子的负链的 5' 端是磷酸化的。

[0036] 在另一优选例中,第一衔接子的负链的 3' 端是氨基封闭的。

[0037] 在另一优选例中,第一衔接子的负链的 3' 端是氨基封闭的。

[0038] 在另一优选例中,第一衔接子的双链部分的长度为 15-100bp,较佳地为 20-80bp。

[0039] 在另一优选例中,在步骤 (a) 中,额外提供一对对照核酸样品,或者所述核酸样品中含有对照核酸序列。

[0040] 在另一优选例中,所述核酸样品中对照核酸序列的数量为 10-200pg,较佳地 20-100pg。

[0041] 在另一优选例中,所述的测序为 Solexa 高通量测序。

[0042] 本发明的第二方面,提供了一种基于核酸样品构建测序文库的试剂盒,所述试剂

盒包括：

[0043] 一第一衔接子,所述第一衔接子为双链,正链的 5' 端连接有生物素标记物并且 3' 端具有呈单链形式的、用于捕获单链核酸的第一捕获序列,而负链为与正链互补的序列;

[0044] 一第二衔接子,所述的第二衔接子为双链,正链的 5' 端具有呈单链形式的、用于结合于单链核酸的第二捕获序列,而负链为与正链互补的序列;

[0045] 一磁珠,所述磁珠表面包被有亲和素;

[0046] 和说明书,所述的说明书记载了使用方法。

[0047] 在另一优选例中,所述的使用方法包括:用如本发明第一方面所述的方法构建测序文库。

[0048] 在另一优选例中,所述试剂盒还包括:特异性结合于第一衔接子的第一引物;和特异性结合于第二衔接子的第二引物。

[0049] 在另一优选例中,所述的试剂盒还包括一对照核酸样品。

[0050] 在另一优选例中,所述对照核酸序列的数量为 10-200pg,较佳地 20-100pg。

[0051] 应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

附图说明

[0052] 图 1 为用本发明方法基于 50pg 单链 DNA 构建 DNA 测序文库的电泳图;

[0053] 图 2 为用本发明方法基于 500ng 单链 DNA 构建 DNA 测序文库的电泳图;

[0054] 图 3 为用本发明方法基于 11ng 酵母冈崎片段构建 DNA 测序文库的电泳图;

[0055] 图 4 显示了本发明一个优选例中第一衔接子和第二衔接子的结构;

[0056] 图 5 为用本发明的一种优选实施例中,用本发明方法构建 DNA 测序文库的示意图;其中,“primer”为引物,“Adaptor”为衔接子,第四引物与第二引物相同。

具体实施方式

[0057] 本发明人经过长期而深入的研究,意外开发出了一种能够用于构建 DNA 高通量测序文库的方法,使用所述方法,能够基于极少量(200pg 以下)的核酸样本建立测序文库。基于上述发现,发明人完成了本发明。

[0058] 构建 DNA 高通量测序文库的方法

[0059] 本发明提供了一种基于核酸样品构建测序文库的方法,所述方法包括步骤:

[0060] (a) 提供一用于构建测序文库的核酸样品;

[0061] (b) 对所述核酸样品进行变性处理,使所述核酸解链为单链核酸;

[0062] (c) 将所述单链核酸与第一衔接子(adaptor,或译为“接头”)进行退火反应,从而使得第一衔接子捕获所述单链,并进行连接反应,从而形成“第一衔接子-单链核酸”复合物;

[0063] (d) 将“第一衔接子-单链核酸”复合物与表面包被有亲和素的磁珠进行混合,从而将所述的“第一衔接子-单链核酸”复合物吸附于所述磁珠;

[0064] (e) 对上一步骤获得的磁珠进行清洗,获得经清洗的、吸附有“第一衔接子-单链

核酸”复合物的磁珠；

[0065] (f) 将上一步骤获得的、经清洗的且吸附有“第一衔接子-单链核酸”复合物的磁珠与第二衔接子进行退火反应,从而使得第二衔接子结合于所述单链的游离端,并进行连接反应,从而形成吸附有“第一衔接子-单链核酸-第二衔接子”复合物的磁珠；

[0066] (g) 对上一步骤获得的磁珠进行清洗,获得经清洗的、吸附有“第一衔接子-单链核酸-第二衔接子”复合物的磁珠；

[0067] (h) 将上一步骤获得的经清洗的磁珠作为模板,用特异性结合于第一衔接子的第一引物和特异性结合于第二衔接子的第二引物,进行 PCR 反应,获得第一扩增产物,作为测序文库。

[0068] 其中,所述的第一衔接子为双链,正链的 5' 端连接有生物素标记物并且 3' 端具有呈单链形式的、用于捕获单链核酸的第一捕获序列,而负链为与正链互补的序列;所述第二衔接子为双链,正链的 5' 端具有呈单链形式的、用于结合于单链核酸的第二捕获序列,而负链为与正链互补的序列。

[0069] 本发明的方法中,还可以任选地包括以下步骤:以第一扩增产物为模板,用第三引物和第四引物进行 PCR 扩增,从而获得第二扩增产物,其中所述的第二扩增产物的两端引入了测序接头序列。

[0070] 其中,一种优选的所述的第三引物的 5' 端含有测序接头序列且 3' 端含有部分或全部第一引物序列。一种优选的所述的第四引物与第二引物相同。

[0071] 在另一优选例中,所述的第一衔接头的结构如下,从 5' 至 3' 端:

[0072] 生物素标记物-双链互补区-单链捕获区

[0073] 其中,双链互补区的长度为 15-100bp;而单链捕获区的长度为 5-10bp。

[0074] 所述的核酸样品的总量可以为 $\leq 200\text{pg}$, 优选地,所述核酸样品的总量为 10-200pg。在本发明的一个优选例中,所述的核酸样品的总量为 20-100pg。

[0075] 在另一优选例中,所述的核酸样品包括 DNA 样品、RNA 样品。

[0076] 在另一优选例中,所述的捕获序列为 5-8 个碱基的随机序列。

[0077] 在另一优选例中,所述的第一衔接子的正链双链区序列如 SEQ ID NO:1 所示。

[0078] 在另一优选例中,所述的第一衔接子的反链双链区序列如 SEQ ID NO:2 所示。

[0079] 在另一优选例中,所述的第二衔接子的正链双链区序列如 SEQ ID NO:3 所示。

[0080] 在另一优选例中,所述的第二衔接子的反链双链区序列如 SEQ ID NO:4 所示。

[0081] 在另一优选例中,所述第一引物的序列如 SEQ ID NO:5 所示。

[0082] 在另一优选例中,所述第二引物的序列如 SEQ ID NO:6 所示。

[0083] 在另一优选例中,所述第三引物的序列如 SEQ ID NO:7 所示。

[0084] 在另一优选例中,所述阳性对照序列如 SEQ ID NO:8 所示。

[0085] 在另一优选例中,所述的核酸样品的总量为 20-100pg。

[0086] 在另一优选例中,第一衔接子的负链的 5' 端是磷酸化的。

[0087] 在另一优选例中,第一衔接子的负链的 3' 端是氨基封闭的。

[0088] 在另一优选例中,第一衔接子的负链的 3' 端是氨基封闭的。

[0089] 在另一优选例中,第一衔接子的双链部分的长度为 15-100bp, 较佳地为 20-80bp。

[0090] 在另一优选例中,在步骤 (a) 中,额外提供一对照核酸样品,或者所述核酸样品中

含有对照核酸序列。

[0091] 在另一优选例中,所述核酸样品中对照核酸序列的数量为 10-200pg,较佳地 20-100pg。

[0092] 在另一优选例中,所述的测序为 Solexa 高通量测序。

[0093] 基于微量核酸样品构建测序文库的试剂盒

[0094] 本发明还提供了一种用上述方法构建测序文库的试剂盒,所述试剂盒包括:

[0095] 一第一衔接子,所述第一衔接子为双链,正链的 5' 端连接有生物素标记物并且 3' 端具有呈单链形式的、用于捕获单链核酸的第一捕获序列,而负链为与正链互补的序列;

[0096] 一第二衔接子,所述的第二衔接子为双链,正链的 5' 端具有呈单链形式的、用于结合于单链核酸的第二捕获序列,而负链为与正链互补的序列;

[0097] 一磁珠,所述磁珠表面包被有亲和素;

[0098] 和说明书,所述的说明书记载了使用方法。

[0099] 在另一优选例中,所述的使用方法包括:用本发明的方法构建测序文库。

[0100] 所述试剂盒还可以任选地包括其他组件,如 PCR 反应单元、磁珠分离单元等。在一个优选例中,所述的试剂盒还包括:特异性结合于第一衔接子的第一引物;和特异性结合于第二衔接子的第二引物。

[0101] 在另一优选例中,所述的试剂盒还包括一对照核酸样品。

[0102] 在另一优选例中,所述对照核酸序列的数量为 10-200pg,较佳地 20-100pg。

[0103] 一种优选的试剂盒包括:

[0104] 第一衔接子 (5 μ L, 1 μ M), 正链双链区序列如 SEQ ID NO:1 所示,5' 端连接有生物素标记物,3' 端具有 5-10 个随机碱基 (第一捕获序列);反链双链区序列如 SEQ ID NO:2 所示,5' 端磷酸化以便捕获,3' 端为氨基 (NH_2) 封闭。

[0105] 第二衔接子 (5 μ L, 10 μ M), 正链双链区序列如 SEQ ID NO:3 所示,5' 端具有 5-10 个随机碱基 (第二捕获序列),3' 端为氨基 (NH_2) 封闭;反链双链区序列如 SEQ ID NO:4 所示;

[0106] T4 多聚核苷酸激酶 (20 μ L, 10U/ μ L);

[0107] T4DNA 连接酶 (90 μ L, 400U/ μ L)

[0108] 快速连接酶缓冲液 (2 \times , 132mM Tris-HCl, pH7.6, 20mM MgCl_2 , 2mM ATP, 2mM DTT, 15%PEG6000, 400 μ L);

[0109] 第一引物 (5 μ L, 10 μ M), 序列如 SEQ ID NO:5 所示;

[0110] 第二引物 (10 μ L, 10 μ M), 序列如 SEQ ID NO:6 所示;

[0111] 第三引物 (5 μ L, 10 μ M), 序列如 SEQ ID NO:7 所示;

[0112] 阳性对照 DNA (5ng), 序列如 SEQ ID NO:8 所示;

[0113] MyOne 链霉亲和素磁珠 (200 μ L)。

[0114] 本发明的主要优点包括:

[0115] (1) 本方法利用生物素和磁珠的亲合反应,将少量的 DNA 样品连接到磁珠上进行后续的连接和扩增处理,便于去除杂质和多余的接头,得到的产物纯度高,且已包含双向测序接头,可以直接用于高通量测序。

[0116] (2) 与现有技术相比,本发明最大程度去除了杂质,通过反复清洗磁珠,减少了多

余接头对后续扩增的影响,使用 pfu 酶通过两轮放大,引入测序接头的同时能够准确放大目标样品。

[0117] (3) 本发明适合于各种 DNA 构建高通量测序文库,且所需都是常规实验技术以及容易购买到的试剂和药品,条件易得,且操作简便,一般实验技术人员皆可操作完成。

[0118] 下面结合具体实施例,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。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数按重量计算。

[0119] 实施例 1 DNA 高通量测序文库的构建

[0120] 1. 将 DNA 样品溶于 $8\ \mu\text{L}$ 10mM Tris-HCl (pH7.5), 于 95°C 加热 5 分钟后立刻插冰上使之迅速冷却。

[0121] 2. 加入 $2\ \mu\text{L}$ T4 多聚核苷酸激酶、 $10\ \mu\text{L}$ $2\times\text{T4DNA}$ 快速连接酶缓冲液 (132mM Tris-HCl, pH7.6, 20mM MgCl_2 , 2mM ATP, 2mM DTT, 15% PEG6000)。

[0122] 3. 37°C 反应 4 小时后于 70°C 加热 15 分钟使酶失活。

[0123] 4. 加入 $5.1\ \mu\text{L}$ ddH₂O 后于 95°C 加热 5 分钟使之完全变性,然后立刻插于冰上使之冷却。

[0124] 5. 加入 $0.5\ \mu\text{L}$ $1\ \mu\text{M}$ 的第一衔接子 (见图 4。正链双链区序列如 SEQ ID NO:1 所示,5' 端连接有生物素标记物,3' 端具有 5-10 个随机碱基;反链双链区序列如 SEQ ID NO:2 所示,5' 端磷酸化以便捕获,3' 端为氨基封闭。) 后于 37°C 温育 10 分钟。

[0125] 6. 加入 $3\ \mu\text{L}$ T4 连接酶、 $10\ \mu\text{L}$ $2\times$ 快速连接酶缓冲液后混匀。

[0126] 7. 于 16°C 反应 8h。

[0127] 8. 取出 $20\ \mu\text{L}$ MyOne 链霉亲和素磁珠 (Life Technology 公司,美国;货号 65001) 后用 $40\ \mu\text{L}$ $2\times\text{Binding}\&\text{Washing}$ 缓冲液 (10mM Tris-HCl (pH7.5), 1mM EDTA, 2.0M NaCl) 清洗 3 次并最终重悬于 $40\ \mu\text{L}$ $2\times\text{Binding}\ \&\ \text{Washing}$ 缓冲液中。

[0128] 9. 将步骤 8 中的 MyOne 链霉亲和素磁珠加至步骤 7 中得到的连接产物后于室温连接 8 小时,期间置旋转混匀仪。

[0129] 10. 用 $100\ \mu\text{L}$ $1\times\text{Binding}\&\text{Washing}$ 缓冲液清洗 3 次。

[0130] 11. 再用 $20\ \mu\text{L}$ $1\times$ 快速连接酶缓冲液清洗一次后将磁珠重悬于 $20\ \mu\text{L}$ $1\times$ 快速连接酶缓冲液。

[0131] 12. 加入 $0.5\ \mu\text{L}$ $10\ \mu\text{M}$ 的第二衔接子 (正链双链区序列如 SEQ ID NO:3 所示,5' 端具有 5-10 个随机碱基,3' 端为氨基封闭;反链双链区序列如 SEQ ID NO:4 所示) 后于 55°C 孵育 2 分钟,然后立刻插入冰中使之迅速冷却。

[0132] 13. 加入 $2\ \mu\text{L}$ T4 连接酶后于 16°C 连接反应 8 小时,期间置旋转混匀仪。

[0133] 14. 吸去上清后加入 $20\ \mu\text{L}$ $1\times$ 快速连接酶缓冲液与 $0.5\ \mu\text{L}$ $10\ \mu\text{M}$ 的接头 2 后于 55°C 旋转 2 分钟,然后立刻插入冰中使之迅速冷却。

[0134] 15. 加入 $2\ \mu\text{L}$ T4 连接酶后于 16°C 再旋转混匀 5 小时。

[0135] 16. 用 $100\ \mu\text{L}$ $1\times\text{Binding}\&\text{Washing}$ 缓冲液清洗 3 次后再用 $100\ \mu\text{L}$ Washing 缓冲液 (10mM Tris-HCl (pH7.5), 2mM EDTA, 50mM KCl, 0.02% Triton X-100) 清洗 5 次,最后重悬于 $20\ \mu\text{L}$ $1\times\text{Binding}\&\text{Washing}$ 缓冲液中。

[0136] 17. PCR 扩增,反应体系及 PCR 程序如下所示:

[0137]

10×PCR 反应缓冲液	2.5 μL	dNTP	2 μL
步骤 16 的连接产物	2 μL	Pfu DNA 聚合酶	0.25 μL
10μM 第一引物 (SEQ ID NO: 5)	0.5 μL	10μM 第二引物 (SEQ ID NO: 6)	0.5 μL
10mM MgSO ₄	0.2 μL	ddH ₂ O	17.05 μL

[0138] PCR 循环程序 :95℃变性 30 秒,68℃退火 20 秒,72℃延伸 10 秒 ;15 个循环。

[0139] 18. 用 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳进行检测并将目标条带进行回收,并定容至 10 μL 10mM Tris-HCl (pH8.0)。

[0140] 19. 使用 SEQ ID NO:6 与 SEQ ID NO:7 作为引物,重复步骤 17 的 PCR 扩增步骤。

[0141]

10×PCR 反应缓冲液	2.5 μL	dNTP	2 μL
步骤 18 的产物	2 μL	Pfu DNA 聚合酶	0.25 μL
10 μM 第二引物 (SEQ ID NO.: 6)	0.5 μL	10μM 第三引物 (SEQ ID NO.: 7)	0.5 μL
10mM MgSO ₄	0.2 μL	ddH ₂ O	17.05 μL

[0142] PCR 循环程序 :95℃变性 30 秒,68℃退火 20 秒,72℃延伸 10 秒 ;5 ~ 15 个循环。实验过程可参考图 5。

[0143] 用 4% 琼脂糖凝胶电泳检测,现实目标条带长度为 156bp,利用 QIAquick Gel Extraction 试剂盒回收该 PCR 产物。

[0144] 50pgDNA 样品的电泳结果如图 1 所示,图中各列上方的数字为步骤 19 中进行 PCR 反应的循环数。结果显示,15 个循环的 PCR 放大后得到的目标条带清晰,长度为 156bp。

[0145] 500ngDNA 样品的电泳结果如图 2 所示,图中各列上方的数字为步骤 19 中进行 PCR 反应的循环数。结果显示,5 个循环的 PCR 放大后得到的目标条带清晰,长度为 156bp。

[0146] 11ng 芽殖酵母冈崎片段样品的电泳结果如图 3 所示,图中各列上方的数字为步骤 19 中进行 PCR 反应的循环数。结果显示,15 个循环的 PCR 放大后得到弥散状的目标条带符合要求,长度分散在 200 ~ 400bp 的范围。

[0147] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,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。

[0001]

序列表

- <110> 上海交通大学
- <120> 一种构建DNA高通量测序文库的方法及其配套试剂盒
- <130> P2013-1142
- <160> 8
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 64
- <212> DNA
- <213> 寡核苷酸
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (59)..(64)
- <223> n为a, c, g, 或t
- <400> 1
- aatgatacgg cgaccaccca gatctacaact ctctccctac acgacgtctt tccgatctnn 60
- nnnn 64
- <210> 2
- <211> 58
- <212> DNA
- <213> 寡核苷酸
- <400> 2
- agatcggaag agcgtcgtgt agggaaagag tgtagatctc ggtggctgcc gttatcatt 58
- <210> 3
- <211> 40
- <212> DNA
- <213> 寡核苷酸
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (1)..(6)
- <223> n为a, c, g, 或t
- <400> 3
- nnnnnagat cggaagagct cgtatgccgt ctctctcttg 40

[0002]

<210> 4	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> 寡核苷酸	
<400> 4	
caagcagaag acggcatacg agctettccg atct	34
<210> 5	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 寡核苷酸	
<400> 5	
tttccctaca cgacgctett cegatct	27
<210> 6	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> 寡核苷酸	
<400> 6	
caagcagaag acggcatacg agctettccg atct	34
<210> 7	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> 寡核苷酸	
<400> 7	
aatgatacgg cgaccacega gatctaacct etticcctac acgaegctc	49
<210> 8	
<211> 82	
<212> DNA	
<213> 寡核苷酸	
<400> 8	
tgcttgttca cgatgagtgc ggtacttggf ttaatacccg ttcttggaat gataaggaaa	60
gacagccgat tattgattgg tt	82

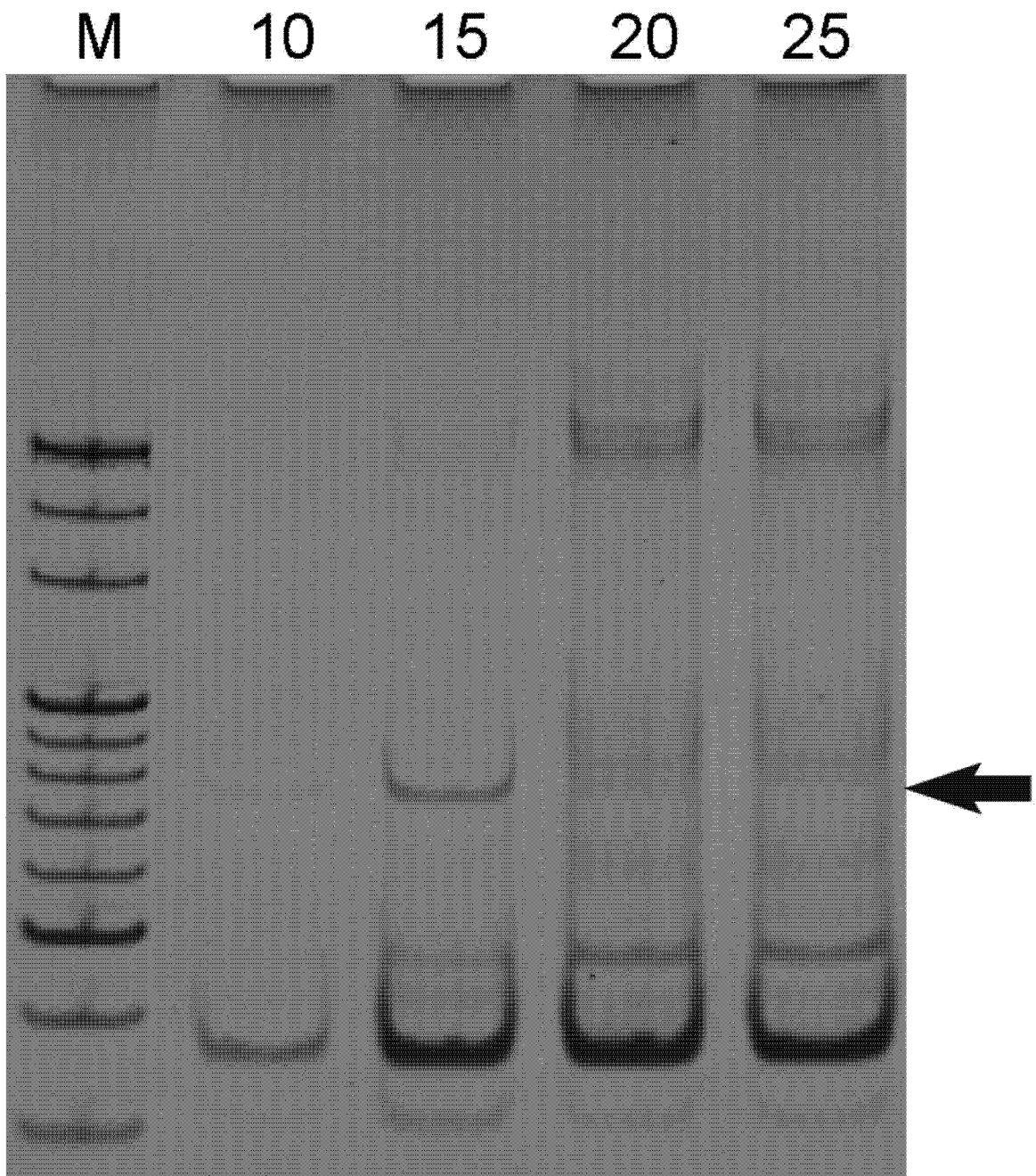


图 1

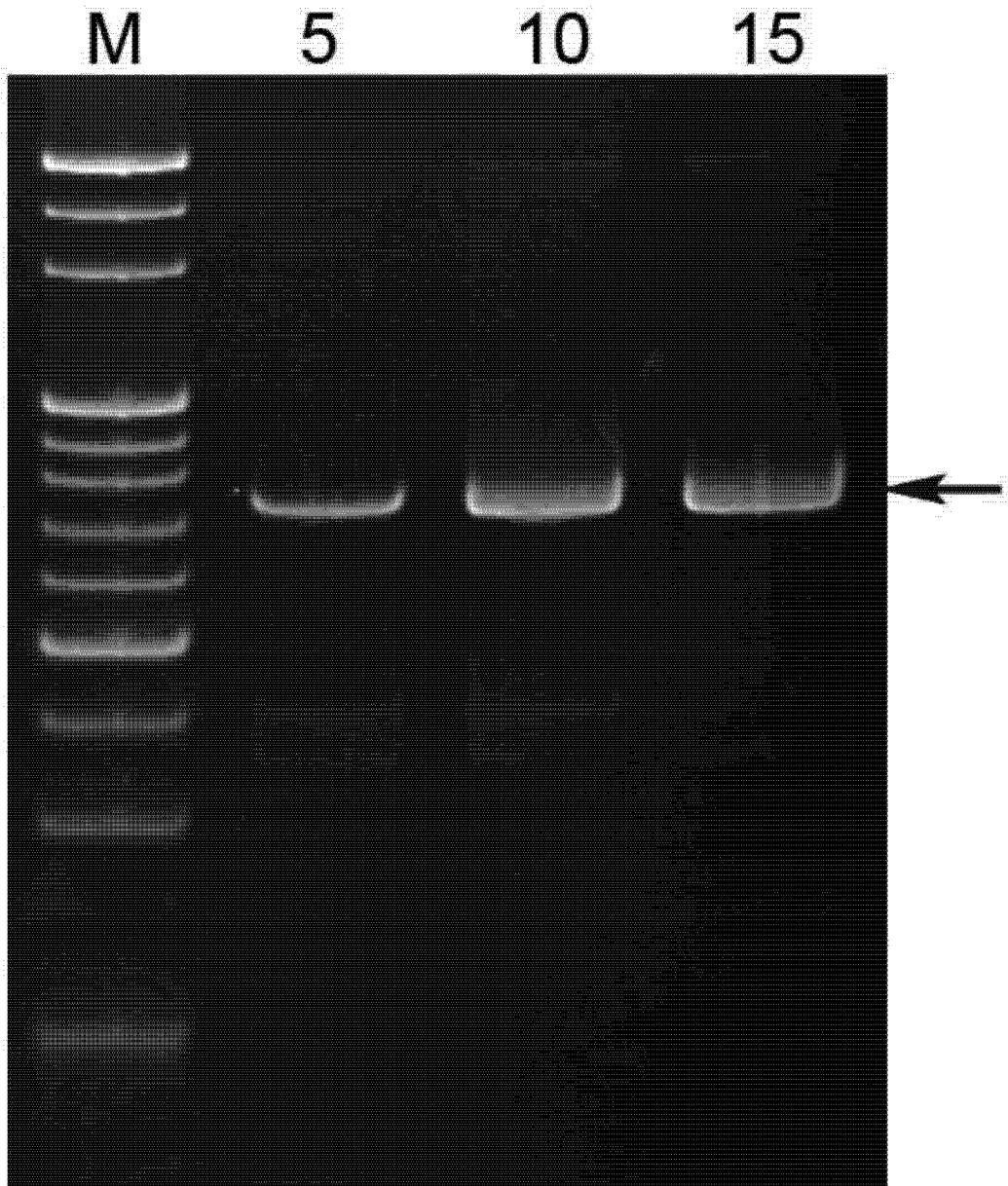


图 2

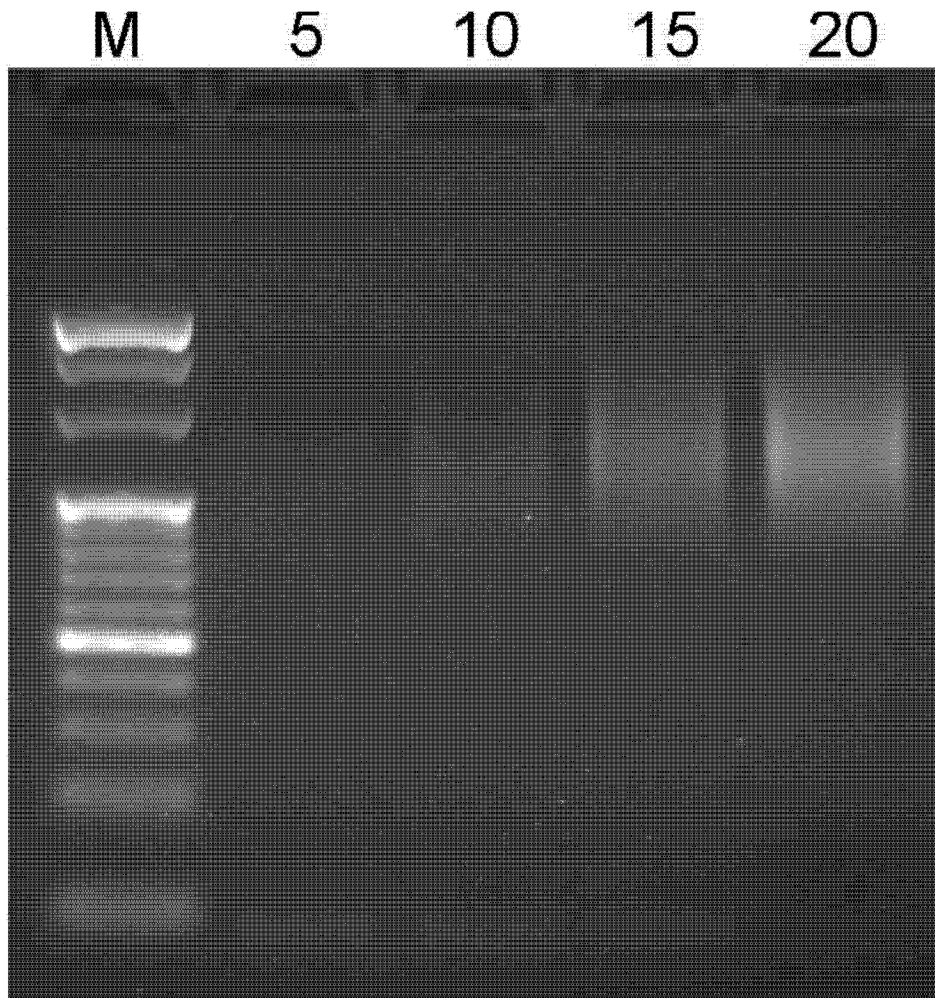


图 3

第一衔接子 (SEQ ID NO. : 1和2)

5'-Biotin-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNNN-NH₂-3'

3'-NH₂-TTACTATGCCGCTGGTGGCTCTAGATGTGAGAAAGGATGTGCTGCGAGAAGGCTAGA-phosphate-5'

第二衔接子 (SEQ ID NO. : 3和4)

5'-NNNNNAGATCGGAAGAGCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-NH₂-3'

3'-TCTAGCCTTCTCGAGCATACGGCAGAAGACGAAC-5'

图 4

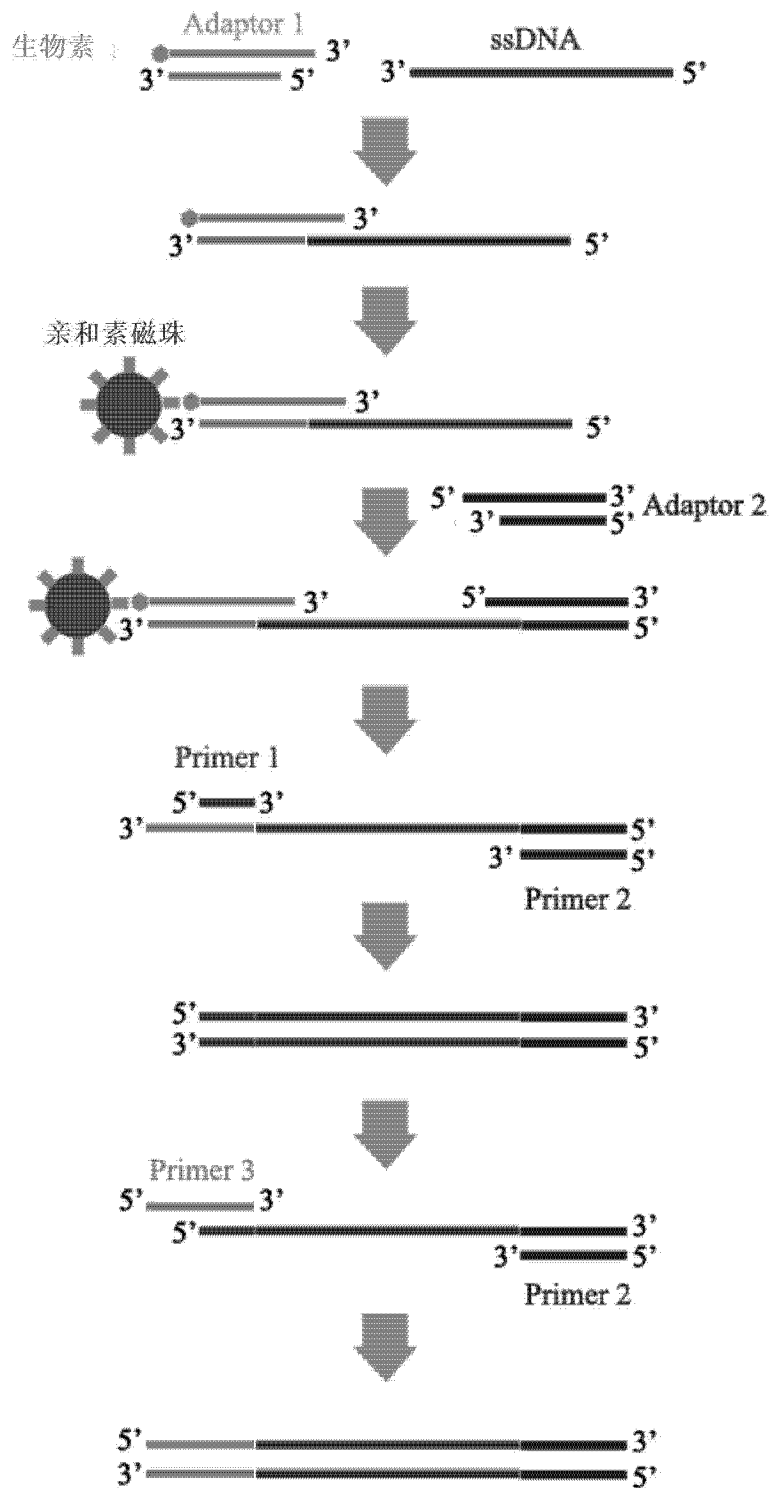


图 5