



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 116536394 B

(45) 授权公告日 2024. 07. 09

(21) 申请号 202310464127.8

C12Q 1/6869 (2018.01)

(22) 申请日 2023.04.26

C12Q 1/6888 (2018.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

C12Q 1/6895 (2018.01)

申请公布号 CN 116536394 A

C40B 50/06 (2006.01)

(43) 申请公布日 2023.08.04

(56) 对比文件

(73) 专利权人 青岛百创智能制造技术有限公司

CN 113584598 A, 2021.11.02

地址 266000 山东省青岛市自由贸易试验

CN 115386622 A, 2022.11.25

区青岛片区前湾保税港区上海路20号

审查员 管冰

三号楼三层306室(B)

(72) 发明人 郑洪坤 刘敏 齐双慧 张坦

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司

11002

专利代理师 覃汉超

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6806 (2018.01)

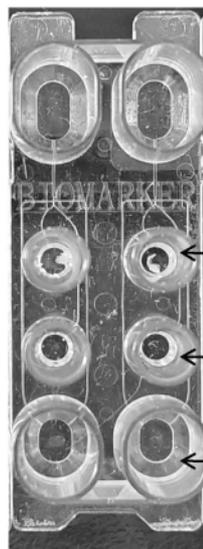
权利要求书1页 说明书8页 附图2页

(54) 发明名称

一种海洋生物单细胞转录组文库的构建方法

(57) 摘要

本发明涉及基因工程技术领域,尤其涉及一种海洋生物单细胞转录组文库的构建方法。所述构建方法包括:获得cDNA、PCR扩增、建库;所述获得cDNA包括制备油包水和反转录;所述制备油包水包括:混合细胞相、beads相和油相;所述细胞相、beads相和油相的体积比为(3~4):(5.5~6.5):(21~23)。本发明优化反转录的油包水体系使得海洋生物单细胞在形成油包水进行反转录时不易破碎,在测序后可以得到质量较优的测序数据,显著提高海洋细胞检测效率和准确率。



60ul DG1000-3'gel beads

35ul 细胞相

220ul Partitioning Oil

一种海洋生物单细胞转录组文库的构建方法

技术领域

[0001] 本发明涉及基因工程技术领域,尤其涉及一种海洋生物单细胞转录组文库的构建方法。

背景技术

[0002] 转录组测序的研究对象为某一物种特定细胞或组织在某一状态下的几乎所有的转录本及基因序列的总和,能够全面快速地获得某一物种特定组织或器官在某一状态下的几乎所有转录本序列信息,可以应用于基础研究、临床诊断和药物研发等领域。

[0003] 而单细胞转录组测序则是在单细胞水平进行测序,可以研究不同单细胞的异质性,但是目前海洋生物细胞在进行单细胞转录组测序时采用和其他类型细胞相同的测序方式时,存在测序质量较低的缺陷,难以实现样本中单个细胞之间的异质性的研究。

发明内容

[0004] 为了解决现有技术存在的问题,本发明提供一种海洋生物单细胞转录组文库的构建方法。通过调整细胞相和beads相的渗透压和体系,使细胞能够保持较完整的形态进入到油包水中,保证较优的测序质量。

[0005] 第一方面,本发明一种海洋生物单细胞转录组文库的构建方法,包括:获得cDNA、PCR扩增、建库;

[0006] 所述获得cDNA包括制备油包水和反转录;所述制备油包水包括:混合细胞相、beads相和油相;

[0007] 所述细胞相、beads相和油相的体积比为(3~4):(5.5~6.5):(21~23)。

[0008] 进一步,所述beads相中的beads为DG1000-3'gel beads;和/或,所述油相中的油为Partitioning Oil。

[0009] 进一步地,所述beads相中的beads连接有barcode序列和反转录引物;

[0010] 所述反转录引物包括如下核苷酸序列:

[0011] 5' - CTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNNNNNNNVTVNNNNNNNTT
TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN-3'。

[0012] 进一步地,所述反转录的流程包括:

[0013] 42~45°C持续85~95分钟和82~88°C持续5~7分钟。

[0014] 进一步地,所述PCR扩增的反应程序如下:

[0015] 95°C,30s;95°C,15s;62°C,15s;65°C,3min,进行12~15次循环;65°C,5min;4°C以下保持。

[0016] 进一步地,所述建库包括:

[0017] 打断、末端修复,加测序接头、连接index及PCR反应,片筛及测序。

[0018] 进一步地,所述海洋生物包括牡蛎、海鞘、扇贝或紫菜中的一种或多种。

[0019] 本发明进一步提供所述的构建方法在筛选抑制海洋生物细胞中的应用。

[0020] 本发明具备如下有益效果:

[0021] 本发明针对海洋生物细胞的特点,提供了一种特定的油包水体系,该油包水体系具有和海洋生物单细胞适宜的渗透压和其他环境体系,能够使得细胞保持较为完整的形态进入到油包水中,从而实现不同海洋单细胞带上不同barcode序列进行测序,而且测序得到的测序数据质量较高,显著提高了测序效率。

附图说明

[0022] 为了更清楚地说明本发明或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作一简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0023] 图1是本发明实施例1提供的加入混合细胞相、DG1000-3' gel beads及 Partitioning Oil的加入量及位置示意图。

[0024] 图2是本发明实施例1提供的对纯化后PCR产物峰型进行测定的结果示意图。

[0025] 图3是本发明实施例1提供的文库峰图的结果示意图。

具体实施方式

[0026] 为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将结合本发明中的附图,对本发明中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0027] 以下实施例中涉及的试剂如下:

[0028] SuperScript III reverse transcriptase、5×RT Buffer、dNTP、RNaseOUT、0.1M DTT、Dynabeads磁珠购自赛默飞;TSO (GGTATCAACGCAGAGTACATrGrGrG)、DG1000-3' gel beads引物序列(CTACACGACGCTCTCCGATCTNNNNNNNNNNNNNTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TVN)、cDNA引物(F:AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT;R:CTACACGACGCTCTCCGAT)由生工生物合成,稀释至10uM使用;DPBS购自Gibco;SPRI磁珠购自贝克曼;High sensitivity Agilent Technologies 2100Bioanalyzerd购自安捷伦;Amp Mix、末端修复试剂、接头连接试剂购自NEB;无核酶水购自天根;80%乙醇溶液现用现配。

[0029] 实施例1

[0030] 1、将单细胞悬液与逆转录试剂混合,制备细胞相

[0031] 1.1按照下表配制RT mix:

[0032] 表1 RT反应体系

[0033]

试剂	用量/ul
5×RT Buffer	7
dNTP	3
RNaseOUT	2
TSO	2
0.1M DTT	1

SuperScript III reverse transcriptase	5
10x DPBS	8.6

[0034] TSO引物序列:GGTATCAACGCAGAGTACATrGrGrG。

[0035] 1.2制备细胞mix

[0036] 根据要检测的细胞量(1-2万个细胞)及细胞浓度配制细胞mix体系:

[0037] 表2细胞mix体系

试剂	用量/ul
细胞	X
3x PBS	6.4-X

[0039] 2、制备油包水,进行反转录

[0040] 2.1加入细胞相mix、DG1000-3' gel beads及Partitioning Oil。加入量及位置,见图1(DG1000-3' gel beads的加入量为60μL,细胞相mix为35μL,Partitioning Oil为220μL)。DG1000-3' gel beads中引物序列:CTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNNNNNNNNNNTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTVN。

[0041] 2.2制备油包水

[0042] 将芯片放入百创DG1000仪器中,等待油包水生成。

[0043] 2.3进行反转录

[0044] 将生成的油包水全部转移到PCR管中,进行反转录。

[0045] 反转录程序如下:

[0046] 表3反转录程序

温度	时间
42°C	90min
85°C	5min
4°C	Hold

[0048] 3、样品破油纯化,进行扩增

[0049] 3.1破油

[0050] 取出PCR管,贴壁缓慢加入100ul破油试剂,静置30s后油包水溶解,上层溶液透明。

[0051] 3.2纯化

[0052] 3.2.1弃去下层溶液,向管中加入194ul纯化试剂及6ul Dynabeads磁珠。

[0053] 3.2.2移液枪混匀,静置5min。

[0054] 3.2.3移液枪再次混匀,静置5min。

[0055] 3.2.4将PCR管置于磁力架上,待液体澄清后洗去上清,加入300ul 80%乙醇溶液,30s洗去上清;再加入200ul 80%乙醇溶液,30s洗去上清。瞬时离心后加PCR管置于磁力架上,吸去残留的乙醇溶液。

[0056] 3.2.5静置1min后,加入23.5ul无核酸酶水,吹匀后室温静置5min。

[0057] 3.2.6将PCR管置于磁力架上静置2min。

[0058] 3.3扩增

[0059] 配制PCR mix:

[0060] 表4 PCR mix体系

[0061]	试剂	用量/u1
	Amp Mix	25
	cDNA Primers	2

[0062] cDNA引物序列:

[0063] F:AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT

[0064] R:CTACACGACGCTCTTCCGAT。

[0065] 从磁力架上的PCR管中取23u1 RT产物加入PCR mix中混匀,瞬时离心后置于PCR仪中,PCR仪中的反应程序如下:

[0066] 表5 PCR反应程序

温度	时间	循环
95°C	30s	—
95°C	15s	12~15 cycles
62°C	15s	
65°C	3min	
65°C	5min	—
4°C	Hold	—

[0068] 4、PCR产物纯化

[0069] 4.1SPRI磁珠涡旋混匀后取30u1加入PCR产物中,吹打混匀,静置5min。

[0070] 4.2将PCR管置于磁力架上,静置至溶液澄清,弃去上清。

[0071] 4.3加入200u1 80%乙醇溶液,静置30s后,弃去上清。

[0072] 4.4重复5.3步骤。

[0073] 4.5瞬时离心后将PCR管置于磁力架上,吸去残留的乙醇溶液。

[0074] 4.6静置至磁珠表明不再光滑时,立即加入25u1无核酸酶水,吹打混匀,室温静置2min。

[0075] 4.7将PCR管重新放置于磁力架上,溶液澄清后吸取上清至新的PCR管中。

[0076] 4.8使用Qubit4.0及High sensitivity Agilent Technologies 2100 Bioanalyzerd对纯化后PCR产物峰型进行测定。质检图如图2所示。

[0077] 5、打断、末端修复加A尾及片筛

[0078] 5.1配制mix

[0079] 表6 mix体系

[0080]	试剂	用量/u1
	Fragmentation buffer	5
	Fragmentation Enzyme	2.5
	Total	7.5

[0081] 混匀后瞬时离心,放在冰上。

[0082] 5.1.2根据cDNA的投入量(一般取cDNA产量的1/4),加入无核酸酶水补齐到22.5u1,吹吸混匀瞬离加到mix体系中,再次吹吸混匀,放入PCR仪进行打断末修,反应程序如下:

[0083] 表7 PCR反应程序

[0084]	温度	时间
	30°C	5min
	65°C	20min
	4°C	hold

[0085] 5.2PCR产物片筛

[0086] 5.2.1涡旋SPRI磁珠,混匀后取16.5u1加入PCR产物中,吹打混匀,静置5min。

[0087] 5.2.2将样品管置于磁力架上,静置至溶液澄清。

[0088] 5.2.3将澄清的43.6u1上清液转移至新的管中。

[0089] 5.2.4涡旋SPRI磁珠,混匀后取4.5u1加入到上清中,吹吸混匀。

[0090] 5.2.5室温静置5min。

[0091] 5.2.6将样品管置于磁力架上,静置至溶液澄清,弃掉上清。

[0092] 5.2.7加入200u1新鲜配置的80%乙醇静置30s后,弃去上清。

[0093] 5.2.8重复步骤5.2.3。

[0094] 5.2.9瞬时离心后将PCR管置于磁力架上,吸去残留的乙醇溶液。

[0095] 5.2.10静置至磁珠表明不再光滑时,加入26u1无核酸酶水,吹打混匀,室温静置2min。

[0096] 5.2.11将PCR管重新放置于磁力架上,溶液澄清后吸取上清25u1至新的PCR管中。

[0097] 6、连接测序接头及纯化

[0098] 6.1接头连接

[0099] 配制接头连接体系:

[0100] 表8配制接头连接体系

[0101]	试剂	用量/u1
	Adaptor Ligation Buffer	10
	Adaptor DNA Ligase	5
	DNA Adaptor	10
	片筛产物	25
	Total	50

[0102] 混匀后瞬时离心,放入PCR仪进行接头连接,反应程序:25°C反应15min。

[0103] 6.2接头连接产物纯化

[0104] 6.2.1涡旋SPRI磁珠,混匀后取40u1加入接头连接产物中,吹打混匀,静置5min。

[0105] 6.2.2将样品管置于磁力架上,静置至溶液澄清,弃去上清。

[0106] 6.2.3加入200u1 80%乙醇,静置30S后,弃去上清。

[0107] 6.2.4重复步骤6.2.3。

[0108] 6.2.5瞬时离心后将PCR管置于磁力架上,吸去残留的溶液。

[0109] 6.2.6静置至磁珠表明不再光滑时,加入16u1 EB缓冲液,吹打混匀,室温静置5min。

[0110] 6.2.7将PCR管重新放置于磁力架上,溶液澄清后吸取15u1至新的PCR管中。

[0111] 7、连接index及PCR扩增

[0112] 7.1配制反应mix

[0113] 表9反应mix体系

试剂	用量/ μ l
接头纯化产物	15
Amplification Mix	25
Index	10
Total	50

[0115] 配制反应体系是,每个样品选择唯一的index,并将记录好。

[0116] 7.2进行PCR反应,具体程序如下:

[0117] 表10 PCR反应程序

步骤	温度	时间
a	98°C	45s
b	98°C	20s
c	54°C	30s
d	72°C	20s
e	循环 2-4 步, 查表设置参数	
f	72°C	5min
g	4°C	Hold

[0119] PCR循环数如下表所示:

[0120] 表11 PCR循环数

cDNA总量	循环数
1-25ng	13 ~ 17
25-150ng	11 ~ 13

[0122] 8. 片段筛选

[0123] 8.1. 涡旋SPRI磁珠,混匀后取27.5 μ l加入PCR产物中,吹打混匀,静置5min。

[0124] 8.2将样品管置于磁力架上,静置至溶液澄清。

[0125] 8.3将澄清的73 μ l上清液转移至新的管中。

[0126] 8.4涡旋SPRI磁珠,混匀后取7.5 μ l加入到上清中,吹吸混匀,室温静置5min。

[0127] 8.5将样品管置于磁力架上,静置至溶液澄清,弃掉上清。

[0128] 8.6加入200 μ l新鲜配置的80%乙醇静置30s后,弃去上清。

[0129] 8.7重复步骤8.6。

[0130] 8.8瞬时离心后将PCR管置于磁力架上,吸去残留的乙醇溶液。

[0131] 8.9静置至磁珠表明不再光滑时,加入31 μ l无核酸酶水,吹打混匀,室温静置2min。

[0132] 8.10将PCR管重新放置于磁力架上,溶液澄清后吸取上清30 μ l至新的PCR管中。

[0133] 9. 文库质控

[0134] 使用Qubit仪器进行文库浓度检测,使用Qsep400及其他仪器进行文库片段的检测,片段范围在300-700bp,珠峰在400-600bp,质检图如图3所示。

[0135] 10. 测序

[0136] 对样品进行测序,分析下机数据进行转录组基因表达量分析。检测结果见下表。

[0137] 表12海洋单细胞转录组基因表达量分析结果

	实验组 1	实验组 2
测序数据量 (G)	103.1	102.1
[0138] Reads Mapped to Genome	88.19%	89.13%
Reads Mapped Confidently to Genome	79.11%	78.54%
Reads Mapped Confidently to Intergenic Regions	17.33%	17.81%
Reads Mapped Confidently to Intronic Regions	4.78%	5.87%

Reads Mapped Confidently to Exonic Regions	56.99%	54.85%
Reads Mapped Confidently to Transcriptome	60.63%	59.67%
Estimated Number of Cells	8842	7285
[0139] Median UMI Counts per Cell	1621	1118
Median Genes per Cell	904	751
Total Genes Detected	28864	28425
Sequencing Saturation	56.60%	53.04%
Fraction Reads in Cells	75.49%	73.04%

[0140] 试验例1

[0141] 本试验例对比了本发明实施例1提供的单细胞转录组建库方法和常规的单细胞转录组建库方法的测序数据质量,具体如下:

[0142] 实验组:本发明实施例1提供的单细胞转录组建库方法。

[0143] 对照组1:和本发明实施例1提供的单细胞转录组建库方法相同,区别在于在反转录的过程中,油包水体系包括:细胞相75 μ L、beads相35 μ L和油相220 μ L。

[0144] 对照组2:和本发明实施例1提供的单细胞转录组建库方法相同,区别在于在反转录的过程中,细胞相中采用1 \times PBS,而非3 \times PBS。

[0145] 具体采用牡蛎细胞进行建库,最终得到如下对比结果:

[0146] 表13实验组和对照组的单细胞转录组建库方法的测序数据分析结果

	实验组	对照组 1	对照组 2
测序数据量 (G)	103.1	100.3	102.1
Reads Mapped to Genome	88.19%	75.91%	84.64%
Reads Mapped Confidently to Genome	79.11%	70.80%	78.97%
[0147] Reads Mapped Confidently to Intergenic Regions	17.33%	10.17%	5.08%
Reads Mapped Confidently to Intronic Regions	4.78%	3.01%	5.99%
Reads Mapped Confidently to Exonic Regions	56.99%	57.61%	67.89%
Reads Mapped Confidently to Transcriptome	60.63%	57%	72.76%
Estimated Number of Cells	8842	3617	6842
Median UMI Counts per Cell	1621	417	1707
[0148] Median Genes per Cell	904	177	918.0
Total Genes Detected	28864	22590	33248
Sequencing Saturation	56.60%	61.25%	54.60%
Fraction Reads in Cells	75.49%	44.12%	41.98%

[0149] 对比结果显示,本发明实施例1提供单细胞转录组建库方法,得到的测序数据质量较高,显著优于未经过体系改进的单细胞转录组建库方法(对照组1和对照组2)。

[0150] 最后应说明的是:以上实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换;而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的精神和范围。

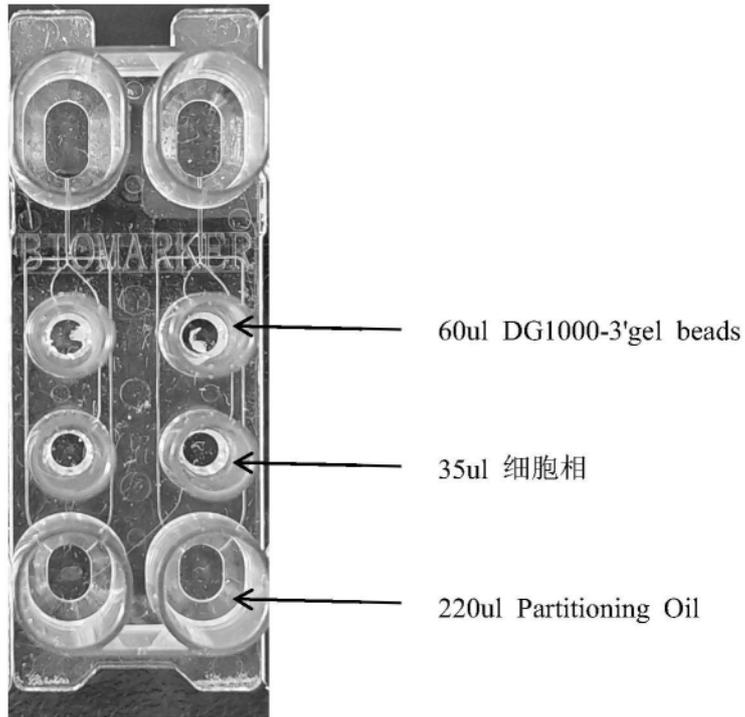


图1

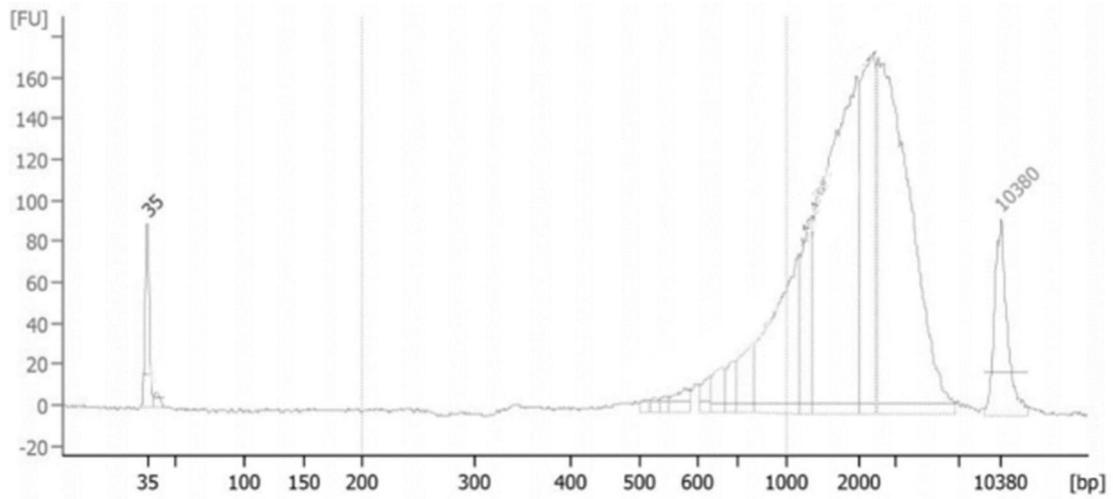


图2

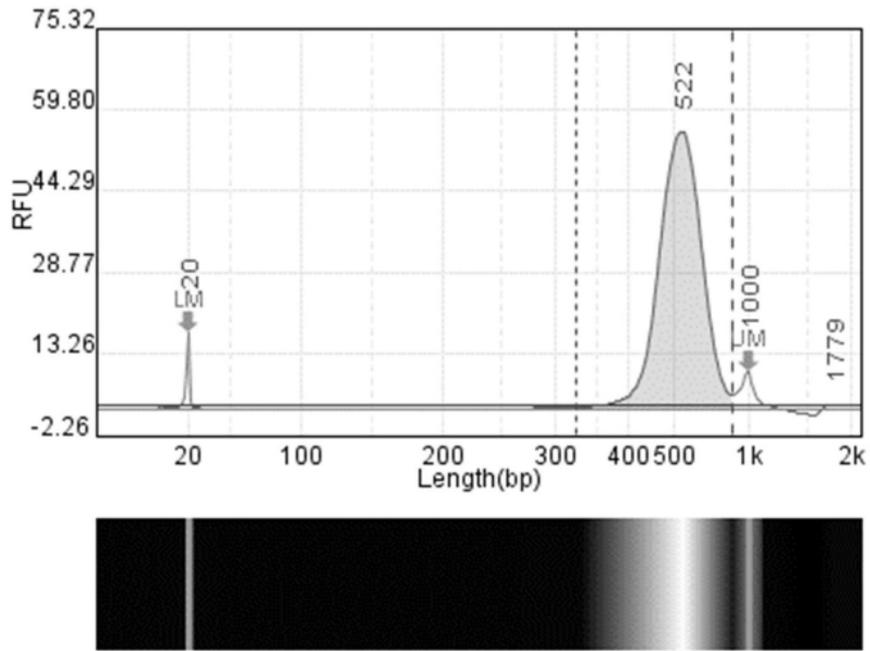


图3