



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105462960 A

(43) 申请公布日 2016. 04. 06

(21) 申请号 201610013476. 8

(22) 申请日 2016. 01. 08

(71) 申请人 杭州千基生物科技有限公司

地址 311200 浙江省杭州市萧山区经济技术
开发区启迪路 198 号

申请人 杭州美联医学检验所有限公司

(72) 发明人 尹华立 郑银娜 裘惠良

(74) 专利代理机构 杭州求是专利事务有限公
司 33200

代理人 韩介梅

(51) Int. Cl.

C12N 15/10(2006. 01)

权利要求书1页 说明书7页 附图1页

(54) 发明名称

一种 DNA 亚硫酸盐转化及纯化的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种 DNA 亚硫酸盐转化及纯化的方法,该方法不需要对核酸进行前期的氢氧化钠变性处理,且不同于市面上商品化试剂采用的变温转化条件,可在恒温条件下进行转化实验;采用磁珠法进行甲基化核酸转化后的核酸纯化,利用高盐低 pH 值进行核酸的分离纯化,再通过低盐高 pH 值进行洗脱,且在纯化过程中不使用目前市场上均采用的氢氧化钠进行去磺化步骤,同时只采用一次洗涤步骤,能够得到高转化率、高质量、高纯度的 DNA。本发明的方法具有操作快速简便、提高转化效率、提取效率和提取纯度的优点。

1. 一种DNA亚硫酸盐转化及纯化的方法,其特征在于,包括如下步骤:

- (1)在离心管中加入20-60ul的待处理DNA;
- (2)加入85-100ul转化溶液,再加入15-35ul保护溶液,混匀;
- (3)将离心管置于70-90°C恒温金属浴中45-90min;
- (4)冷却至室温,向其中加入300-600ul结合液及5-20ul磁珠溶液,混匀,室温放置10-20min;
- (5)将离心管置于磁力架上2-5min,待磁珠分离后,弃去上清液;
- (6)加入0.5-1ml洗涤液,充分混匀磁珠,然后置于磁力架上2-5min,待磁珠分离后,弃去上清液;
- (7)在磁力架上静置1-5min,弃去上清液;
- (8)再加入40-100ul洗脱液,充分混匀后,20-65°C静置5-10min;
- (9)再将离心管置于磁力架上1-2min,待磁珠分离后,转移上清液至一新的无DNase与RNase酶离心管中,-20度保存备用。

2. 根据权利要求1所述的DNA亚硫酸盐转化及纯化的方法,其特征在于,所述的转化溶液为含1-3M A组分和10-800mM B组分的水溶液,pH 5.0-5.5,其中A组分为重亚硫酸钠、亚硫酸氢钠、亚硫酸氢镁、亚硫酸氢铵中至少一种,B组分为尿素、甲酰胺、二甘醇二甲醚、异硫氰酸胍中的至少一种。

3. 根据权利要求1所述的DNA亚硫酸盐转化及纯化的方法,其特征在于,所述的保护溶液为含50-700mM C组分和10-200mM D组分的水溶液,pH 5.0-6.0,其中C组分为氢醌、三烯丙基异氰脲酸酯、水溶性维生素C、四乙烯五胺五盐酸盐中的至少一种,D组分为重亚硫酸钠、亚硫酸氢钠、亚硫酸氢镁、亚硫酸氢铵中的一种。

4. 根据权利要求1所述的DNA亚硫酸盐转化及纯化的方法,其特征在于,所述的结合液为含0.5-6M E组分、10-500mM F组分和体积浓度为10-50%G组分的水溶液,pH5.0-7.0,其中E组分为异硫氰酸胍、盐酸胍、高氯酸钠、碘化钠中至少一种,F组分为Tris-HCl和HEPES中的至少一种,G组分为异丙醇和无水乙醇中至少一种。

5. 根据权利要求1所述的DNA亚硫酸盐转化及纯化的方法,其特征在于,所述的洗涤液为含0.5-3M H组分和体积浓度为10-70%I组分的水溶液,pH 5-7,其中H组分为异硫氰酸胍、盐酸胍、高氯酸钠中至少一种,I组分为异丙醇和无水乙醇中至少一种。

6. 根据权利要求1所述的DNA亚硫酸盐转化及纯化的方法,其特征在于,所述的洗脱液为无DNase与RNase酶无菌水或tris缓冲液或TE缓冲液。

7. 根据权利要求6所述的DNA亚硫酸盐转化及纯化的方法,其特征在于,所述的tris缓冲液为10mM的tris-HCl,pH7.5-8.5。

8. 根据权利要求6所述的DNA亚硫酸盐转化及纯化的方法,其特征在于,所述的TE缓冲液中含10mM的tris-HCl和1mM的EDTA,pH7.5-8.5。

9. 根据权利要求1所述的DNA亚硫酸盐转化及纯化的方法,其特征在于,所述的磁珠溶液为含浓度为50mg/ml纳米磁性颗粒的水溶液,所述的纳米磁性颗粒为超顺四氧化三铁或超顺三氧化二铁颗粒,且颗粒外表由表面修饰有羟基或羧基的二氧化硅包被。

一种DNA亚硫酸盐转化及纯化的方法

技术领域

[0001] 本发明属于核酸甲基化转化及纯化领域,涉及一种DNA在恒温条件、变性剂及DNA保护试剂下,使用亚硫酸盐转化DNA,并使用纯化试剂进行转化DNA纯化,并应用于各类分子生物学研究。

背景技术

[0002] 甲基化是指从活性甲基化合物(如S-腺苷基甲硫氨酸)上将甲基催化转移到其他化合物的过程。最常见的甲基化修饰有DNA甲基化和组蛋白甲基化,本发明所涉及为DNA甲基化。

[0003] DNA甲基化(DNA methylation)是指在DNA甲基化转移酶(DNMT)催化下,以S-腺苷基甲硫氨酸为甲基供体,将活性甲基转移至DNA链中特定碱基上的化学修饰过程。DNA甲基化一般发生在CpG位点(胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤位点,即DNA序列中胞嘧啶后紧连鸟嘌呤的位点)。经DNA甲基转移酶催化胞嘧啶转化为5-甲基胞嘧啶。人类基因中约80%-90%的CpG位点已被甲基化,但是在某些特定区域,如富含胞嘧啶和鸟嘌呤的CpG岛则未被甲基化。这与包含所有广泛表达基因在内的56%的哺乳动物基因中的启动子有关。1%-2%的人类基因组是CpG群,并且CpG甲基化与转录活性成反比。DNA甲基化是一种表观(epigenetic)修饰,它在不改变DNA序列的情况下,对个体的生长、发育、基因表达模式以及基因组的稳定性起到重要的调控作用,并且这种修饰在发育和细胞增殖的过程中是可以稳定传递的。近年来的大量研究表明,DNA异常甲基化与肿瘤的发生、发展、细胞癌变有着密切的联系。

[0004] 目前研究DNA甲基化的方法有很多种,但都需要经过DNA亚硫酸盐转化后,再运用各种检测手段进行相关研究。DNA在亚硫酸盐转化过程中会使未甲基化的胞嘧啶转化为尿嘧啶,而甲基化的胞嘧啶不会被转化。因此,可以结合NGS、MSP、HRM等方法来检测分析DNA序列哪些位点发生甲基化。

[0005] 亚硫酸盐转化的原理非常简单,目前的亚硫酸盐转化基本步骤分为:DNA的分离纯化,氢氧化钠变性、亚硫酸盐变温转化及脱磺酸基和脱盐。但是亚硫酸盐转化的主要问题是需要首先对需要转化的核酸进行氢氧化钠变性,而后进行长时间的转化及变温过程,且需要氢氧化钠溶液进行脱磺酸基。在此过程中,会导致DNA的严重降解及片段化。除了DNA降解问题,亚硫酸盐转化后的DNA纯化方法没有较好的解决,目前商品化的试剂盒基本都是采用离心柱方法进行产物纯化,并且需要carrier RNA,同时需要多步洗涤过程,步骤过多而造成DNA损耗高、提取效率降低,而且此方法需要离心机,难于实现自动化操作且纯化效率低、操作繁琐、产率低。

[0006] 因此,基于目前表观遗传学的快速发展,以及目前的亚硫酸盐转化方法及纯化方法的一些问题,本发明对转化及纯化方法进行了优化改进,使DNA转化能够在70-90度范围进行转化45-90min,并采用磁珠法对转化DNA进行纯化,能够得到高转化率、高质量及高纯度的DNA,并有利于甲基化研究的全自动化及标准化操作,用于后续分子生物学研究,尤其临床分子诊断。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于针对现有技术的不足,提供一种DNA亚硫酸盐转化及纯化的方法,该方法能在恒温条件下(70-90°C)、同时在变性剂及DNA保护剂存在下进行亚硫酸盐转化并对转化DNA进行纯化,并结合简便的磁珠法纯化方法,能够快速得到高转化率、高质量、高纯度的DNA,本发明的方法有利于甲基化研究的全自动化及标准化操作。

[0008] 本发明涉及的DNA亚硫酸盐转化及纯化的方法,包括如下步骤:

[0009] (1)在离心管中加入20-60ul的待处理DNA;

[0010] (2)加入85-100ul转化溶液,再加入15-35ul保护溶液,混匀;

[0011] (3)将离心管置于70-90°C恒温金属浴中45-90min;

[0012] (4)冷却至室温,向其中加入300-600ul结合液及5-20ul磁珠溶液,混匀,室温放置10-20min;

[0013] (5)将离心管置于磁力架上2-5min,待磁珠分离后,弃去上清液;

[0014] (6)加入0.5-1ml洗涤液,充分混匀磁珠,然后置于磁力架上2-5min,待磁珠分离后,弃去上清液;

[0015] (7)在磁力架上静置1-5min,弃去上清液;

[0016] (8)再加入40-100ul洗脱液,充分混匀后,20-65°C静置5-10min;

[0017] (9)再将离心管置于磁力架上1-2min,待磁珠分离后,转移上清液至一新的无DNase与RNase酶离心管中,-20度保存备用。

[0018] 上述技术方案中,所述的转化溶液为:含1-3M A组分和10-800mM B组分的水溶液,pH 5.0-5.5,其中A组分为重亚硫酸钠、亚硫酸氢钠、亚硫酸氢镁、亚硫酸氢铵中至少一种,B组分为尿素、甲酰胺、、二甘醇二甲醚、异硫氰酸胍中的至少一种;

[0019] 所述的保护溶液为:含50-700mM C组分和10-200mM D组分的水溶液,pH 5.0-6.0,其中C组分为氢醌、三烯丙基异氰脲酸酯、水溶性维生素C、四乙烯五胺五盐酸盐中的至少一种,D组分为重亚硫酸钠、亚硫酸氢钠、亚硫酸氢镁、亚硫酸氢铵中的一种;

[0020] 所述的结合液为:含0.5-6M E组分、10-500mM F组分和体积浓度为10-50%G组分的水溶液,pH 5-7,其中E组分为异硫氰酸胍、盐酸胍、高氯酸钠、碘化钠中至少一种,F组分为Tris-HCl和HEPES中的至少一种,G组分为异丙醇、无水乙醇中至少一种;

[0021] 所述的洗涤液为:含0.5-3M H组分和体积浓度为10-70%I组分的水溶液,pH 5-7,其中H组分为异硫氰酸胍、盐酸胍、高氯酸钠中至少一种,I组分为异丙醇和无水乙醇中至少一种;

[0022] 所述的洗脱液为无DNase与RNase酶无菌水或tris缓冲液或TE缓冲液;所述的tris缓冲液为10mM的tris-HCl,pH7.5-8.5,所述的TE缓冲液中含10mM的tris-HCl和1mM的EDTA,pH7.5-8.5。

[0023] 所述的磁珠溶液为含浓度为50mg/ml纳米磁性颗粒的水溶液,具体为超顺四氧化三铁或超顺三氧化二铁颗粒,且外表由表面修饰有羟基或羧基的二氧化硅包被。

[0024] 本发明涉及的亚硫酸盐转化及纯化的方法,其可应用于脱氧核糖核酸转化及后续纯化,所纯化的转化DNA可用于各类分子生物学检测,尤其为临床分子诊断。

[0025] 本发明的方法具有如下优势:

[0026] 1、本发明涉及的甲基化转化试剂,不同于现有的转化方法,不需要对核酸进行前期的氢氧化钠变性处理,而且能在恒温条件下高效进行变性、转化且不降解及片段化DNA,整个转化时间只需要45-90min;同时可以使用恒温金属浴进行相关的转化实验,而不同于市面商品化试剂需要价格昂贵的PCR仪进行变温转化,转化时间短、仪器设备简单,操作更简便。

[0027] 2、本发明涉及的磁珠法纯化试剂,适用于甲基化核酸转化后的核酸纯化,利用高盐低pH值进行核酸的分离纯化,再通过低盐高pH值进行洗脱,具有高纯度、高回收效率的特点,并且在整个纯化过程中不使用目前市场上均采用的氢氧化钠进行去磺化步骤,操作更简便,更能节省整个实验操作时间。而且整个纯化过程也不需要carrier RNA,且能在常温下进行纯化操作,无需任何高温孵育,同时结合一种洗涤液,只进行一次洗涤过程得到高纯度的核酸,最后的洗脱也可以在常温下进行洗脱;具有操作简便、提高提取效率和提取纯度的优点。

[0028] 3、本发明涉及的DNA亚硫酸盐转化及纯化的方法,将核酸上游的恒温转化及其下游的磁珠分离纯化有效结合起来,有利于甲基化研究的全自动化和标准化操作;

附图说明

[0029] 图1为采用本发明方法与Qiagen商品化试剂盒方法来转化及纯化甲基化人基因组DNA的实时荧光PCR检测图;

[0030] 图2为采用本发明方法与Qiagen商品化试剂盒方法来转化及纯化未甲基化基因组DNA的实时荧光PCR检测图。

具体实施方式

[0031] 下面结合附图对本发明做进一步说明,实施例中所涉及的百分含量均指体积浓度。

[0032] 实施例1 不同转化温度的对比

[0033] 甲基化人基因组的获取:采用QIAGEN商品化血液人基因组提取试剂盒提取人基因组DNA,然后使用NEB公司的Sss I甲基化转移酶进行甲基化处理,具体操作按厂家说明书进行,甲基化处理结束后使用天根的PCR产物纯化试剂盒对甲基化处理的DNA进行纯化,纯化后的DNA置于-20度冰箱备用。

[0034] 本发明的亚硫酸盐转化及纯化具体实施步骤:

[0035] 1、在0.2ml离心管中加入20u1的待处理DNA(甲基化DNA或未甲基化DNA),设置3份。

[0036] 2、每份分别加入85u1转化溶液,再加入35u1保护溶液,混匀。

[0037] 3、将3份离心管分别置于70°C、80°C、90°C恒温金属浴中60min。

[0038] 4、冷却至室温;

[0039] 5、将转化后的DNA分别转移至1.5ml离心管中,再分别加入300u1结合液、10u1磁珠溶液,混匀,室温放置10min;

[0040] 6、将离心管置于磁力架上2min,待磁珠分离后,弃去上清液;

[0041] 7、加入1ml洗涤液,充分混匀磁珠,然后置于磁力架上2min,待磁珠分离后,弃去上清液;

- [0042] 8、在磁力架上静置1min,弃去上清液;
- [0043] 9、加入60ul洗脱液,充分混匀后,置于室温5min;
- [0044] 10、再将离心管置于磁力架上1min,待磁珠分离后,转移上清液至一新的无DNase与RNase酶离心管中,-20度保存备用;
- [0045] 所述转化溶液为含1.5M重亚硫酸钠,1.5M亚硫酸氢钠,10mM甲酰胺的水溶液,pH5.0。
- [0046] 所述的保护溶液为含50mM氢醌,100mM三烯丙基异氰脲酸酯和20mM亚硫酸氢钠的水溶液,pH5.0。
- [0047] 所述结合液为含3.5M异硫氰酸胍,0.5M碘化钠,100mM Tris-HCl,30%异丙醇的水溶液,pH5.0。
- [0048] 所述洗涤液为含2.5M盐酸胍,50%无水乙醇的水溶液,pH7.0。
- [0049] 所述洗脱液为含10mMTris-HCl的水溶液,pH8.5。
- [0050] 三种不同温度转化方法得到的DNA(依次记为A、B、C)采用实时荧光PCR进行甲基化检测,检测结果见表1。
- [0051] 表1

转化方法	甲基化 DNA		Mean
	Ct1	Ct2	
70 度(A)	34.29	34.82	34.56
80 度(B)	34.46	34.60	34.53
90 度(C)	34.10	35.32	34.71

- [0052]
- [0053] 可以看出,在不同转化温度方法上,采用实时荧光PCR方法,使用MSP引物检测甲基化情况,各组的ct值基本相当,所以可以验证本转化试剂在70-90度温度下进行转化,且转化效率一致,,相对于传统的变温方法而言,本发明采用恒温的方法更简单,易操作,能使用便宜、简便恒温仪器进行相关实验研究。
- [0054] 实施例2 不同纯化试剂纯化DNA效果对比
- [0055] 甲基化人基因组的获取:同实施例1。
- [0056] 本发明的亚硫酸盐转化具体实施步骤:
- [0057] 1、在1.5ml离心管中加入60ul的待处理DNA(甲基化DNA或未甲基化DNA)。
- [0058] 2、加入85ul转化溶液,再加入15ul保护溶液,混匀。
- [0059] 3、将离心管置于80℃恒温金属浴中60min;
- [0060] 4、冷却至室温;
- [0061] 所述转化溶液为含1.5M重亚硫酸钠,1.0M亚硫酸氢镁,10mM二甘醇二甲醚的水溶液,pH5.5。
- [0062] 所述的保护溶液为含50mM氢醌,100mM水溶性维生素C,10mM重亚硫酸钠的水溶液,pH5.0。
- [0063] 本发明纯化具体实施步骤:
- [0064] 1、在上述含有转化DNA的1.5ml离心管中加入600ul结合液、20ul磁珠溶液,混匀,

室温放置10min;

[0065] 2、将离心管置于磁力架上2min,待磁珠分离后,弃去上清液;

[0066] 3、加入1ml洗涤液,充分混匀磁珠,然后置于磁力架上2min,待磁珠分离后,弃去上清液;

[0067] 4、在磁力架上静置1min,弃去上清液;

[0068] 5、加入60ul洗脱液,充分混匀后,置于室温5min;

[0069] 6、再将离心管置于磁力架上1min,待磁珠分离后,转移上清液至一新的无DNase与RNase酶离心管中,-20度保存备用;

[0070] 分别采用如下纯化试剂进行转化DNA纯化:

[0071] (一)

[0072] 所述结合液为含1.5M异硫氰酸胍,1.5M高氯酸钠,10mM Tris-HCl,50%异丙醇的水溶液,pH5.0。

[0073] 所述洗涤液为含3M盐酸胍,70%无水乙醇的水溶液,pH7.0。

[0074] 所述洗脱液为含10mM Tris-HCl的水溶液,pH8.5。

[0075] (二)

[0076] 所述结合液为含2.5M盐酸胍,2.5M高氯酸钠,50mM HEPES,30%异丙醇的水溶液,pH6.0。

[0077] 所述洗涤液为含2.5M异硫氰酸胍,0.5M高氯酸钠,70%无水乙醇的水溶液,pH5.0。

[0078] 所述洗脱液为含10mM Tris-HCl的水溶液,pH8.5。

[0079] (三)

[0080] 所述结合液为含6M异硫氰酸胍,200mM HEPES,40%异丙醇的水溶液,pH7.0。

[0081] 所述洗涤液为含2M盐酸胍,70%无水乙醇的水溶液,pH7.0。

[0082] 所述洗脱液为含10mM Tris-HCl的水溶液,pH8.5。

[0083] 转化并纯化后的DNA(三组方案依次记为D、E、F)采用实时荧光PCR进行甲基化检测,检测结果见表2。

纯化组别	甲基化 DNA		Mean
	Ct1	Ct2	
[0084] D	35.59	33.62	34.61
E	34.96	34.23	34.60
F	33.75	34.90	34.33

[0085] 从表二可以看出,采用同样的转化方式后使用不同的纯化试剂进行DNA纯化,再采用实时荧光PCR方法,使用MSP引物检测甲基化情况,各组的ct值基本相当。

[0086] 实施例3 本发明方法与Qiagen商品化试剂盒方法对比

[0087] 甲基化人基因组的获取:同实施例1。

[0088] 本发明的亚硫酸盐转化及纯化具体实施步骤:

[0089] 1、在1.5ml离心管中加入20ul的待处理DNA(甲基化DNA或未甲基化DNA)。

[0090] 2、加入85ul转化溶液,再加入35ul保护溶液,混匀。

- [0091] 3、将离心管置于80°C恒温金属浴中60min;
- [0092] 4、冷却至室温;
- [0093] 5、在含有转化DNA的1.5ml离心管中加入300ul结合液、20ul磁珠溶液,混匀,室温放置10min;
- [0094] 6、将离心管置于磁力架上2min,待磁珠分离后,弃去上清液;
- [0095] 7、加入1ml洗涤液,充分混匀磁珠,然后置于磁力架上2min,待磁珠分离后,弃去上清液;
- [0096] 8、在磁力架上静置1min,弃去上清液;
- [0097] 9、加入60ul洗脱液,充分混匀后,置于室温5min;
- [0098] 10、再将离心管置于磁力架上1min,待磁珠分离后,转移上清液至一新的无DNase与RNase酶离心管中,-20度保存备用;
- [0099] 所述转化溶液为含1.5M重亚硫酸钠,1.5M亚硫酸氢铵,10mM甲酰胺的水溶液,pH5.5。
- [0100] 所述的保护溶液为含50mM氢醌,500mM四乙烯五胺五盐酸盐,10mM亚硫酸氢铵的水溶液,pH5.0。
- [0101] 所述结合液为含4M异硫氰酸胍,0.5M高氯酸钠,100mM Tris-HCl,30%异丙醇的水溶液,pH6.0。
- [0102] 所述洗涤液为含4M盐酸胍,40%无水乙醇的水溶液,pH7.0。
- [0103] 所述洗脱液为含10mMTris-HCl的水溶液,pH8.5。
- [0104] Qiagen的亚硫酸盐转化及纯化具体实施步骤:
- [0105] 1、在200ul PCR反应管中加入20ul的待处理DNA(甲基化DNA或未甲基化DNA)。
- [0106] 2、再加入20ul无菌水、85ul亚硫酸盐溶液及15ul DNA保护缓冲液,混匀。
- [0107] 3、然后置于PCR仪上,按照95度5min,60度20min,两个循环。
- [0108] 4、结束后,冷却至室温。
- [0109] 5、加入310ul BL缓冲液(含10ug/ml carrier RNA),振荡混匀;
- [0110] 6、加入250ul无水乙醇,振荡混匀,瞬时离心;
- [0111] 7、将所有溶液转移至离心柱中,10000rpm离心1min,弃废液;
- [0112] 8、加入500ul BD缓冲液,室温孵育15min;
- [0113] 9、10000rpm离心1min,弃废液;
- [0114] 10、加入500ul BW缓冲液,10000rpm离心1min,弃废液,再重复此步骤一次;
- [0115] 11、加入250ul无水乙醇,10000rpm离心1min,弃废液;
- [0116] 12、再10000rpm离心1min,弃废液;
- [0117] 13、换一新离心管,将离心柱置于其中,加入60ul洗脱液,室温放置1min,10000rpm离心1min,将回收液置于-20度备用。
- [0118] 取上述两种试剂转化纯化的甲基化人基因组DNA和未甲基化的人基因组DNA各2ul分别进行甲基化实时荧光PCR检测及管家基因实时荧光PCR检测,分别做2个平行试验。检测结果见图1、图2和表3。
- [0119] 表3
- [0120]

	甲基化 DNA		Mean	未甲基化 DNA		Mean
	Ct1	Ct2		Ct1	Ct2	
本发明	36.96	36.55	36.76	36.31	36.90	36.61
Qiagen	36.52	37.02	36.77	37.99	36.84	37.42

[0121] 从检测结果来看,本发明的转化及纯化试剂与Q公司的亚硫酸盐转化试剂盒检测结果相当,但本发明的试剂能在恒温作用下进行转化,以及结合磁珠法提取,该提取方法操作方便检测,快捷,提取效率高等特点,利用整合自动化操作。

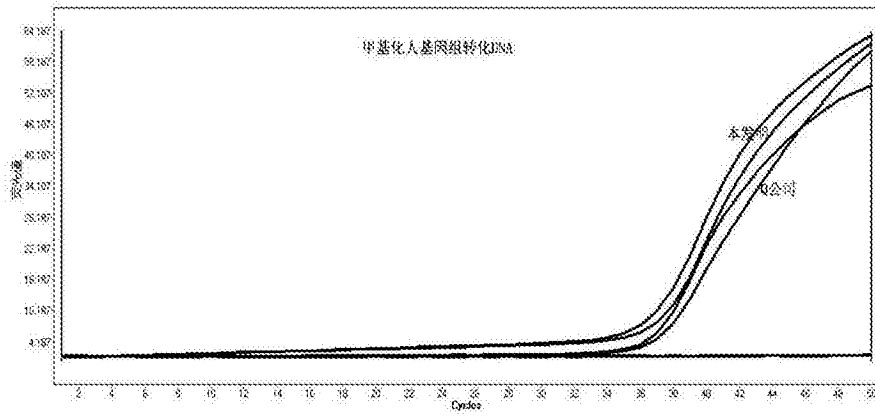


图1

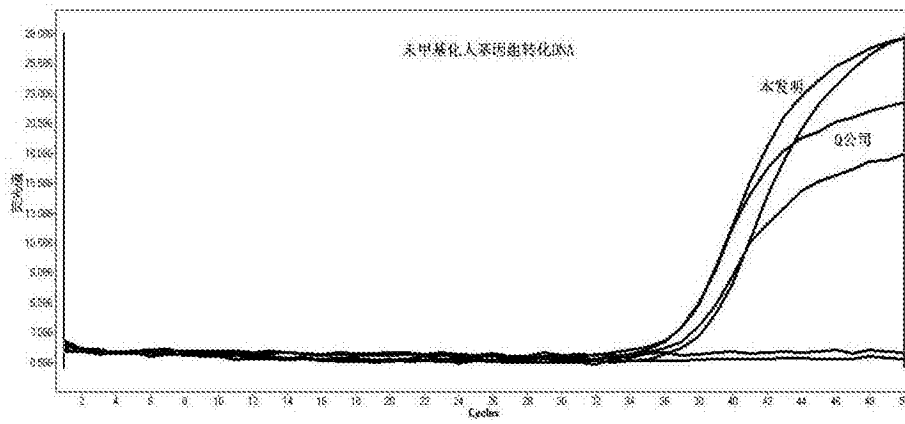


图2