



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102560688 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 11

(21) 申请号 201010588936. 2

(22) 申请日 2010. 12. 15

(71) 申请人 深圳华大基因科技有限公司

地址 518083 广东省深圳市盐田区北山工业
区综合楼

申请人 深圳华大基因研究院

(72) 发明人 栾合密 张俊青 程玲 孔淑娟
张秀清 杨焕明

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038

代理人 罗菊华

(51) Int. Cl.

C40B 50/06 (2006. 01)

C40B 40/08 (2006. 01)

C12Q 1/68 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 10 页

序列表 1 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种新的基于 illumina 测序平台的文库构建方法

(57) 摘要

本发明提供了一种新的基于 illumina 测序平台的文库构建方法,特别是小片段 DNA 文库构建方法,针对现有 illumina 测序平台的小片段 DNA 建库的上述缺陷,能够减少纯化步骤,降低文库的损失和浪费,减低成本,提高劳动效率。

1. 一种基于 illumina 测序平台的文库构建方法,包括以下步骤:

- (1) 将 DNA 打断;
- (2) 将步骤 (1) 所得到的 DNA 片段进行末端修复,得到平末端 DNA 片段;
- (3) 将步骤 (2) 所得到的平末端 DNA 片段与试剂 I 混合,得到 3' 端加“A”的 DNA 片段;
- (4) 将步骤 (3) 所得到的 3' 端加“A”的 DNA 片段与试剂 II 以及接头混合,纯化,从而得到加接头的 DNA 片段;
- (5) 将步骤 (4) 所得到的加接头的 DNA 产物回收;
- (6) 将步骤 (5) 回收的到的片段采用 PCR 方法以扩增 DNA 文库,回收;

其中所述步骤 (3) 中试剂 I 的 pH 为 7.6 ~ 7.9 优选的 7.9,溶剂是水,溶质为如下终浓度物质:10mM ~ 100mM,优选 25mM ~ 75mM,更优选 50mM 的可溶性盐溶液;10 ~ 300mM,优选 50 ~ 200mM,更优选 100mM 的 $MgCl_2$;10mM ~ 1000mM,优选 50mM ~ 500mM,更优选 100mM 的缓冲盐溶液;1mM ~ 50mM,优选 5mM ~ 15mM,更优选 10mM 的二硫苏糖醇;1mM ~ 10mM,优选 2.5mM ~ 7.5mM,更优选 5mM 的 dATP,1U/ml ~ 40U/ml,优选 10U/ml ~ 30U/ml,更优选 20U/ml 的 Klenow(3' -5' exo) 酶;

其中所述步骤 (4) 中试剂 II 的 pH 为 7.6 ~ 7.9 优选的 7.6,溶剂是水,溶质为 10 ~ 200mM,优选 50 ~ 150mM,更优选 100mM 的缓冲盐溶液;1 ~ 100mM,优选 10 ~ 90mM,更优选 50mM 的二硫苏糖醇;1 ~ 40mM,优选 5 ~ 20mM,更优选 10mM 的 ATP;10 ~ 400mM,优选 50 ~ 200mM,更优选 100mM 的 $MgCl_2$;1U/ml ~ 200U/ml,优选 50U/ml ~ 150U/ml,更优选 72U/ml 的 DNA 连接酶。

2. 权利要求 1 所述的方法,其进一步包括步骤 (7):对步骤 (6) 所得到的 PCR 扩增产物检测文库浓度及片段大小,优选地采用 Agilent Bioanalyzer 2100 和 Q-PCR 检测文库浓度及片段大小。

3. 权利要求 1 所述的方法,其进一步还包括步骤 (8):对 PCR 扩增产物进行测序,优选地使用 illumina 测序平台进行测序。

4. 权利要求 1 所述的方法,其中所述步骤 (1) 中打断方式可以是超声波或者酶切的方式。

5. 权利要求 1-3 中任一项所述的方法,其中所述步骤 (1) 中将 DNA 打断至建库所需的 DNA 片段,优选地打断至建库所需的 200bp ~ 800bp DNA 片段。

6. 权利要求 1-3 中任一项所述的方法,其中所述步骤 (3) 中试剂 I 中缓冲盐溶液可以为 Tris-HCl、磷酸盐等缓冲盐溶液,优选是 Tris-HCl。

7. 权利要求 1-3 中任一项所述的方法,其中所述步骤 (3) 中试剂 I 中可溶性盐溶液可以为氯化钠、氯化钾等溶液,优选是氯化钠溶液。

8. 权利要求 1-3 中任一项所述的方法,其中样品与试剂 I 混合在 12°C ~ 40°C 的温度下进行孵育,优选的温度为 37°C。

9. 权利要求 1-3 中任一项所述的方法,其中所述步骤 (4) 中的接头包括为带有 T 碱基末端的任意接头,优选地是由如下正反两个序列组成的 DNA Index adapter:

DNA Index adapter F:

5-Phos/TACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTAACCAA;

DNA Index adapter R:

5-Phos/TTGGTTAGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC。

10. 权利要求 1-3 中任一项所述的方法,其中所述步骤(4)中试剂 II 中缓冲盐溶液可以为 Tris-HCl、磷酸盐等缓冲盐溶液,优选是 Tris-HCl。

11. 权利要求 1-3 中任一项所述的方法,其中样品与试剂 II 混合在 4℃~22℃ 的温度下进行孵育,优选的温度为 16℃。

12. 权利要求 1-3 中任一项所述的方法,其中步骤(5)中通过进行琼脂糖凝胶电泳,切胶回收一定大小的片段;切胶回收的片段大小是 100-1000bp,例如 200、400bp 和 800bp。

13. 权利要求 1-3 中任一项所述的方法,其中步骤(6)中 PCR 方法所使用的引物是 Index Primer X:

5' CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATAAGCAATGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT;

Primer 1.0:

5' AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT。

14. 权利要求 1-13 中任一项所述的方法,其用于小片段 DNA 文库构建。

15. 通过权利要求 1-13 中任一项所述的方法构建的小片段 DNA 文库。

16. 一种试剂,其特征在于 pH 为 7.6~7.9 优选的 7.9,溶剂是水,溶质为如下终浓度物质:10mM~100mM,优选 25mM~75mM,更优选 50mM 的可溶性盐溶液;10~300mM,优选 50~200mM,更优选 100mM 的 MgCl₂;10mM~1000mM,优选 50mM~500mM,更优选 100mM 的缓冲盐溶液;1mM~50mM,优选 5mM~15mM,更优选 10mM 的二硫苏糖醇;1mM~10mM,优选 2.5mM~7.5mM,更优选 5mM 的 dATP,1U/ml~40U/ml,优选 10U/ml~30U/ml,更优选 20U/ml 的 Klenow(3' -5' exo) 酶;所述试剂用作权利要求 1 所述方法中步骤(3)中的试剂 I。

17. 权利要求 16 所述的试剂,其中所述缓冲盐溶液可以为 Tris-HCl、磷酸盐等缓冲盐溶液,优选是 Tris-HCl。

18. 权利要求 16 所述的试剂,其中所述可溶性盐溶液可以为氯化钠、氯化钾等溶液,优选是氯化钠溶液。

19. 一种试剂,其特征在于 pH 为 7.6~7.9 优选的 7.6,溶剂是水,溶质为 10~200mM,优选 50~150mM,更优选 100mM 的缓冲盐溶液;1~100mM,优选 10~90mM,更优选 50mM 的二硫苏糖醇;1~40mM,优选 5~20mM,更优选 10mM 的 ATP;10~400mM,优选 50~200mM,更优选 100mM 的 MgCl₂;1U/ml~200U/ml,优选 50U/ml~150U/ml,更优选 72U/ml 的 DNA 连接酶;所述试剂用作权利要求 1 所述方法中所述步骤(4)中的试剂 II。

20. 权利要求 19 所述的试剂,其中所述缓冲盐溶液可以为 Tris-HCl、磷酸盐等缓冲盐溶液,优选是 Tris-HCl。

一种新的基于 illumina 测序平台的文库构建方法

技术领域

[0001] 本发明涉及基因组测序,特别是高通量基因组测序领域。更特别地本发明的方法涉及基于 illumina 测序平台的文库构建方法,特别是小片段文库的构建方法。

背景技术

[0002] 脱氧核糖核酸 (DNA) 是两条核苷酸链以互补配对原则所构成的双螺旋结构的分子化合物,它是生命遗传信息的载体。对 DNA 核苷酸序列的测序分析不仅为基因表达、基因调控等生物学基础研究提供重要数据,而且在疾病诊断学、基因治疗等应用研究领域起着重要的作用 [Gilbert W. DNA sequencing and gene structure. In: Forsén S. Nobel Lectures in Chemistry 1971-1980. 1980. Singapore: World Scientific Publishing Co, 1993, 408-426. Sanger F, Coulson A R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase [J]. J Mol Biol, 1975, 94: 441-448.]。DNA 测序技术从早期 Frederick Sanger 的手工测序和基于 Sanger 法而开发的第一代自动化测序仪,到目前的广泛应用的第二代高通量测序平台,这一领域已经产生了质的飞跃 [周晓光, 任鲁风, 李云涛等. 下一代测序技术: 技术回顾与展望 [J]. 中国科学. 2010, 40(1), 23-37. Li RQ, Fan w, Tian g, et al, . The sequence and de novo assembly of the giant panda genome [J]. Nature, 2010, 463, 311-317]。以边合成边测序技术和可逆阻断技术为基础的第二代高通量 illumina 测序平台避免了像传统 Sanger 法测序技术那样需要耗费大量的人力和物力,并具有测序通量高、准确度高和成本低的众多优点,该平台广泛应用于: 全基因组测序, 新物种测序, 目标基因组测序, 转录组和表观遗传分析等领域。

[0003] illumina 测序平台的测序流程主要分为以下四个步骤 [Illumina. Indexed paired-end sequencing user guide.]: 1, 文库制备; 2, 用 Cluster Station 对文库进行扩增; 3, 对成簇后的文库进行测序; 4, 数据处理和拼接。从测序的片段大小来分, illumina 测序平台的文库分为小片段 DNA 的文库和大片段 DNA 的文库。本发明涉及内容主要为小片段文库的构建方法。

[0004] 现有技术中小片段 DNA 的文库制备流程主要分为以下几个步骤:

[0005] I 打断 DNA 到一定的片段大小, 纯化;

[0006] II 末端修复, 纯化;

[0007] III 在已修复的 DNA 片段的 3' 端加上一个“A”碱基, 纯化;

[0008] IV 用 DNA 连接酶将特异性接头连接至 DNA 片段的两端, 纯化;

[0009] V 加接头的 DNA 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 切胶回收一定大小的片段, 纯化;

[0010] VI 采用聚合酶链式反应 (PCR) 扩增 DNA 文库, 纯化;

[0011] VII Agilent Bioanalyzer 2100 和 Q-PCR 检测文库浓度及片段大小;

[0012] VIII 使用 illumina 测序平台进行测序。

[0013] 该制备流程图见图 1。

[0014] 随着第二代高通量 illumina 测序平台的广泛应用, 以及多物种基因组测序和全

基因组研究的大规模开展,降低测序成本,减少测序流程,提高劳动效率成为 DNA 测序技术的一个重要研究方向。在现有的 illumina 测序平台的小片段 DNA 建库流程步骤中,各个步骤都是独立制备,所以分别需要进行纯化的过程,以保证各个步骤之间不会互相干扰和污染。但是这也造成了 DNA 文库样品的在纯化过程中的不可避免的损失和浪费,并且存在操作过程繁琐,增加成本等缺点。因此,本领域需要新的小片段 DNA 建库流程以改进上述缺点。

发明内容

[0015] 针对现有 illumina 测序平台的小片段 DNA 建库的上述缺陷,本发明所要解决的技术问题是提供一种新的 illumina 测序平台的文库构建方法和相关的试剂组合溶液,能够减少纯化步骤,降低文库的损失和浪费,减低成本,提高劳动效率。

[0016] 本发明提供的 illumina 测序平台的文库构建新方法,见图 3,包括以下步骤:

[0017] (1) 将 DNA 打断至建库所需的 DNA 片段 (200bp ~ 800bp),纯化,得到 DNA 片段。

[0018] (2) 将 (1) 所得到的 DNA 片段与末端修复试剂混合,形成平末端的 DNA 片段,纯化,得到平末端 DNA 片段。

[0019] (3) 将 (2) 所得到的平末端 DNA 片段与试剂 I 混合,得到 3' 端加“A”的 DNA 片段。

[0020] (4) 将 (3) 所得到的 3' 端加“A”的 DNA 片段与试剂 II 以及接头混合,纯化,从而得到加接头的 DNA 片段。

[0021] (5) 将 (4) 所得到的加接头的 DNA 产物进行琼脂糖凝胶电泳,切胶回收一定大小的片段;

[0022] (6) 将 (5) 回收的到的片段采用 PCR 方法以扩增 DNA 文库,回收;

[0023] (7) 将 (6) 所得到的 PCR 扩增产物采用 Agilent Bioanalyzer 2100 和 Q-PCR 检测文库浓度及片段大小;

[0024] (8) 使用 illumina 测序平台进行测序。

[0025] 所述步骤 (1) 中打断方式可以是超声波或者酶切的方式。

[0026] 所述步骤 (3) 中试剂 I 的 pH 为 7.6 ~ 7.9,溶剂是水,溶质为如下终浓度物质: 10mM ~ 100mM 可溶性盐溶液,100mM ~ 500mM 缓冲盐溶液,10mM ~ 50mM 二硫苏糖醇,50 ~ 200mM $MgCl_2$,5mM dATP, Klenow (3' -5' exo) 酶。

[0027] 所述步骤 (3) 中试剂 I 中缓冲盐溶液可以为 Tris-HCl、磷酸盐等缓冲盐溶液。

[0028] 所述步骤 (3) 中试剂 I 中可溶性盐溶液可以为氯化钠、氯化钾等溶液。DNA 在一定浓度的氯化钠溶液中溶解度很高, Na^+ 与带负电的 DNA 结合成 DNA 钠盐,这样能够使 DNA 溶解并且更加稳定。样品与试剂 I 混合必须在一定的温度下进行孵育,建议最适温度为 12℃ ~ 40℃。

[0029] 所述步骤 (4) 中试剂 II 的 pH 为 7.6 ~ 7.9,溶剂是水,溶质为 100mM ~ 500mM 缓冲盐溶液, $MgCl_2$, 10mM ~ 50mM 二硫苏糖醇, 5 ~ 10mM ATP, T4DNA 连接酶。

[0030] 所述步骤 (4) 中试剂 II 中缓冲盐溶液可以为 Tris-HCl、磷酸盐等缓冲盐溶液。

[0031] 在步骤 (4) 中, ATP 水解时可提供能量以催化 DNA 链的 5' - PO_4 与另一 DNA 链的 3' -OH 生成磷酸二酯键。样品与试剂 II 混合必须在一定的温度下进行孵育,建议最适温度为 4℃ ~ 22℃。

[0032] 除上述具体描述的各个步骤内容外,未提及的其他步骤内容同现有技术中 illumina 测序平台的文库分为小片段 DNA 的文库的制备过程。

[0033] 本发明的方法所制备的小片段 DNA 文库中, DNA 片段大小和浓度与现有技术 illumina 测序平台的方法相当,参见实施例 1。

[0034] 本发明的小片段 DNA 的文库构建方法与现有技术 illumina 测序平台的方法相比较,在步骤 4 中减少了纯化过程,从而缩短实验时间,提高了劳动效率,并且降低成本;操作更加简便,提高了建库的成功率。

附图说明

[0035] 图 1. 为基于 illumina 测序平台的小片段 DNA 建库流程。

[0036] 图 2. 为 Agilent Bioanalyzer 2100 检测结果。

[0037] 图 3. 为本发明的新 illumina 测序平台的文库构建方法的流程图。

具体实施方式

[0038] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述,但是本领域技术人员将会理解,下列实施例仅用于说明本发明,而不应视为限定本发明的范围。

[0039] 本发明一方面提供了一种基于 illumina 测序平台的文库构建方法,包括以下步骤:

[0040] (1) 将 DNA 打断;

[0041] (2) 将步骤 (1) 所得到的 DNA 片段进行末端修复,得到平末端 DNA 片段;

[0042] (3) 将步骤 (2) 所得到的平末端 DNA 片段与试剂 I 混合,得到 3' 端加“A”的 DNA 片段;

[0043] (4) 将步骤 (3) 所得到的 3' 端加“A”的 DNA 片段与试剂 II 以及接头混合,纯化,从而得到加接头的 DNA 片段;

[0044] (5) 将步骤 (4) 所得到的加接头的 DNA 产物回收;

[0045] (6) 将步骤 (5) 回收的到的片段采用 PCR 方法以扩增 DNA 文库,回收;

[0046] 其中所述步骤 (3) 中试剂 I 的 pH 为 7.6 ~ 7.9 优选的 7.9,溶剂是水,溶质为如下终浓度物质:10mM ~ 100mM,优选 25mM ~ 75mM,更优选 50mM 的可溶性盐溶液;10 ~ 300mM,优选 50 ~ 200mM,更优选 100mM 的 $MgCl_2$;10mM ~ 1000mM,优选 50mM ~ 500mM,更优选 100mM 的缓冲盐溶液;1mM ~ 50mM,优选 5mM ~ 15mM,更优选 10mM 的二硫苏糖醇;1mM ~ 10mM,优选 2.5mM ~ 7.5mM,更优选 5mM 的 dATP,1U/ml ~ 40U/ml,优选 10U/ml ~ 30U/ml,更优选 20U/ml 的 Klenow(3' -5' exo) 酶;

[0047] 其中所述步骤 (4) 中试剂 II 的 pH 为 7.6 ~ 7.9 优选的 7.6,溶剂是水,溶质为 10 ~ 200mM,优选 50 ~ 150mM,更优选 100mM 的缓冲盐溶液;1 ~ 100mM,优选 10 ~ 90mM,更优选 50mM 的二硫苏糖醇;1 ~ 40mM,优选 5 ~ 20mM,更优选 10mM 的 ATP;10 ~ 400mM,优选 50 ~ 200mM,更优选 100mM 的 $MgCl_2$;1U/ml ~ 200U/ml,优选 50U/ml ~ 150U/ml,更优选 72U/ml 的 DNA 连接酶。

[0048] 在本发明的一个具体实施方式中,本发明的方法进一步包括步骤 (7):对步骤 (6) 所得到的 PCR 扩增产物检测文库浓度及片段大小;优选地采用 Agilent Bioanalyzer 2100

和 Q-PCR 检测文库浓度及片段大小。

[0049] 在本发明的一个具体实施方式中,本发明的方法进一步还包括步骤(8):对 PCR 扩增产物进行测序,优选地使用 illumina 测序平台进行测序。

[0050] 在本发明的一个具体实施方式中,所述步骤(1)中打断方式可以是超声波或者酶切的方式。

[0051] 在本发明的一个具体实施方式中,所述步骤(1)中将 DNA 打断至建库所需的 DNA 片段,优选地打断至 200bp ~ 800bp 的 DNA 片段。任选地,进一步包括纯化步骤,得到 DNA 片段。

[0052] 在本发明的一个具体实施方式中,在步骤(2)通过如下方法进行末端修复:将步骤(1)所得到的 DNA 片段与末端修复试剂混合,形成平末端的 DNA 片段。任选地,进一步包括纯化步骤,得到平末端 DNA 片段。

[0053] 在本发明的一个具体实施方式中,所述步骤(3)中试剂 I 中缓冲盐溶液可以为 Tris-HCl、磷酸盐等缓冲盐溶液,优选是 Tris-HCl。

[0054] 在本发明的一个具体实施方式中,所述步骤(3)中试剂 I 中可溶性盐溶液可以为氯化钠、氯化钾等溶液,优选是氯化钠溶液。

[0055] 在本发明的一个具体实施方式中,样品与试剂 I 混合在 12℃ ~ 40℃ 的温度下进行孵育,优选的温度为 37℃。

[0056] 在本发明的一个具体实施方式中,所述步骤(4)中的接头包括为带有 T 碱基末端的任意接头,优选地是由如下正反两个序列组成的 DNA Index adapter:

[0057] DNA Index adapter F:

[0058] 5-Phos/TACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTAACCAA;

[0059] DNA Index adapter R:

[0060] 5-Phos/TTGGTTAGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC。

[0061] 在本发明的一个具体实施方式中,所述步骤(4)中试剂 II 中缓冲盐溶液可以为 Tris-HCl、磷酸盐等缓冲盐溶液,优选是 Tris-HCl。

[0062] 在本发明的一个具体实施方式中,样品与试剂 II 混合在 4℃ ~ 22℃ 的温度下进行孵育,优选的温度为 16℃。

[0063] 在本发明的一个具体实施方式中,在步骤(5)中通过如下方法回收所得到的加接头的 DNA 产物:进行琼脂糖凝胶电泳,切胶回收一定大小的片段。

[0064] 在本发明的一个具体实施方式中,步骤(5)中通过进行琼脂糖凝胶电泳,切胶回收一定大小的片段;切胶回收的片段大小是 100-1000bp,例如 200、400bp 和 800bp。

[0065] 在本发明的一个具体实施方式中,步骤(6)中 PCR 方法所使用的引物是

[0066] Index Primer X:

[0067] 5' CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATAAGCAATGGT GACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT;

[0068] Primer 1.0:

[0069] 5' AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT。

[0070] 在本发明另一方面中,本发明所述方法用于小片段 DNA 文库构建。

[0071] 在本发明另一方面中提供了本发明所述方法构建的小片段 DNA 文库。

[0072] 在本发明进一步的方面中,提供了一种试剂,其特征在于 pH 为 7.6 ~ 7.9 优选的 7.9,溶剂是水,溶质为如下终浓度物质:10mM ~ 100mM,优选 25mM ~ 75mM 的,更优选 50mM 的可溶性盐溶液;10 ~ 300mM,优选 50 ~ 200mM,更优选 100mM 的 $MgCl_2$;10mM ~ 1000mM,优选 50mM ~ 500mM 的,更优选 100mM 的缓冲盐溶液;1mM ~ 50mM,优选 5mM ~ 15mM,更优选 10mM 的二硫苏糖醇;1mM ~ 10mM,优选 2.5mM ~ 7.5mM,更优选 5mM 的 dATP,1U/ml ~ 40U/ml,优选 10U/ml ~ 30U/ml,更优选 20U/ml Klenow (3' -5' exo) 酶;所述试剂用作本发明所述方法中步骤 (3) 中的试剂 I。其中所述缓冲盐溶液可以为 Tris-HCl、磷酸盐等缓冲盐溶液,优选是 Tris-HCl;其中所述可溶性盐溶液可以为氯化钠、氯化钾等溶液,优选是氯化钠溶液。

[0073] 在本发明进一步的方面中,提供了一种试剂,其特征在于 pH 为 7.6 ~ 7.9 优选的 7.6,溶剂是水,溶质为 10 ~ 200mM,优选 50 ~ 150mM,更优选 100mM 缓冲盐溶液;1 ~ 100mM,优选 10 ~ 90mM,更优选 50mM 的二硫苏糖醇;1 ~ 40mM,优选 5 ~ 20mM,更优选 10mM 的 ATP;10 ~ 400mM,优选 50 ~ 200mM,更优选 100mM 的 $MgCl_2$;1U/ml ~ 200U/ml,优选 50U/ml ~ 150U/ml,更优选 72U/ml DNA 连接酶;所述试剂用作本发明所述方法中步骤 (4) 中的试剂 II。其中所述缓冲盐溶液可以为 Tris-HCl、磷酸盐等缓冲盐溶液,优选是 Tris-HCl。

[0074] 实施例

[0075] 实施例一

[0076] 1.1 试剂

[0077] 10×T4PNK buffer (Enzymatics), dNTP (Enzymatics), T4 DNA polymerase (Enzymatics), T4PNK (Enzymatics), Klenow Fragment (3' to 5' exo) (Enzymatics), Klenow Fragment (Enzymatics), 10Xblue buffer (Enzymatics), DNA Ligase Buffer 10× (Enzymatics), Phusion DNA polymerase (NEB)。

[0078] 试剂 I pH 为 7.9,溶剂是水,溶质为如下终浓度物质:50mM 氯化钠溶液(国药集团化学试剂有限公司),100mM Tris-HCl 溶液(国药集团化学试剂有限公司),100mM $MgCl_2$ (国药集团化学试剂有限公司),10mM 二硫苏糖醇(Sigma),5mM dATP (Enzymatics), 20U/ml Klenow Fragment (3' -5' exo)。

[0079] 试剂 II pH 为 7.6,溶剂是水,溶质为如下终浓度物质:72U/ml T4DNA polymerase, 10mM ATP, 500mM Tris-HCl 溶液, 100mM $MgCl_2$, 50mM 二硫苏糖醇;

[0080] 1.2 实验步骤

[0081] 1.2.1 吸取两份 50ng/μl Fosmid 样品(深圳华大基因研究院)各 40μl 置于 Covaris 样品管(Covaris 公司)中,分别命名为 X 和 Y,采用 Covaris 公司生产 E210 型号打断仪对样品进行打断,打断参数如下:

[0082]

负载比	强度	循环/脉冲	时间(秒)
20%	5	200	160

[0083] 1.2.2 打断后,用 Agencourt 公司的 Ampure 磁珠根据生产商的说明书回收纯化,最后每个样品分别溶于 45ul 超纯水中,取 42ul 进行后面的反应,将样品分别置于 PCR 管中。

[0084] 1.2.3 末端修复,将两份样品分别按照下面的表格配置反应体系:

[0085]

上一步中得到的DNA	42μl
10× T4 PNK buffer	5μl
dNTP (25mM)	0.4μl
T4 DNA polymerase	1.2μl
T4 PNK	1.2μl
Klenow Fragment	0.2μl
总体积	50μl

[0086] 在PCR仪上, 20℃放置 30min, Ampure 磁珠纯化后, 样品 X, Y 分别溶于 20 μl 和 32 μl 的超纯水中。

[0087] 1. 2. 4 加“A”, 按照下表反应体系处理样品 X 和 Y

[0088]

纯化后DNA样品X	20μl	纯化后DNA样品Y	32μl
试剂 I	3μl	10Xblue buffer	5μl
		Klenow Fragment (3' to 5' exo)	3μl
		1mM dATP	10μl
总体积	23μl	总体积	50μl

[0089] 反应温度: 15℃~ 40℃, 30min, 将样品 Y 经过 Ampure 磁珠纯化后溶于 37 μl 超纯水中。

[0090] 1. 2. 5 加“接头”(也称为“Adaptor”)

[0091]

加完“A”的样品X	23μl	加完“A”纯化后的样品Y	35μl
试剂 II	1μl	DNA Ligase Buffer 10 ×	1.5μl
DNA Index adapter	1μl	DNA Index adapter	3μl
		T4 DNA连接酶	3μl
		ATP(10mM)	3.5μl
		ddH₂O	4μl
总体积	25μl	总体积	50μl

[0092] 反应温度: 16℃, 过夜连接 14-18h, 加完接头后用 Ampure 磁珠进行纯化, 超纯水溶解洗脱。

[0093] 注: DNA Index adapter 由如下正反两个序列组成:

[0094] DNA Index adapter F:

[0095] 5-Phos/TACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTAACCAG ;

[0096] DNA Index adapter R:

[0097] 5-Phos/TTGGTTAGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC。

[0098] 1. 2. 6PCR 反应

[0099]

加完Adaptor并纯化后的样品	23μl
Phusion DNA polymerase	25μl
Index Primer X	1μl
Primer 1.0	1μl
总体积	50μl

[0100] 注:Index Primer X:

[0101] 5' CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATAAGCAATGGTGAAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT;

[0102] Primer 1.0:

[0103] 5' AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT。

[0104] 在PCR仪中运行下列程序:

[0105] 98°C 30s

[0106]

98°C 15s	} 10个循环
65°C 30s	
72°C 50s	

[0107] 72°C 5min

[0108] 4°C ∞

[0109] 然后再将样品分别纯化后,进行琼脂糖凝胶电泳(2%),并切胶回收400bp和800bp的片段,溶于30ul超纯水中。Q-PCR检测结果如下表:

[0110] 样品X和Y的Q-PCR检测结果

[0111]

样品	样品X 400	样品X 800	样品Y 400	样品Y 800
Q-PCR浓度 (ng/μl)	2.3	1.45	2.38	1.5

[0112] 从上表中数据可知,样品X(即本发明方法制备的样品)与样品Y(即现有技术中illumina测序平台的方法制备的样品)所得到的相同DNA片段浓度相对比,二者没有显著差别。

[0113] 实施例二

[0114] 2.1 试剂

[0115] 10×blue buffer(Enzymatics),pUC18DNA(Takara)。

[0116] 试剂I同实施例一的1.1项所述的试剂I。

[0117] 试剂II pH为7.6,溶剂是水,溶质为T4DNA连接酶(Enzymatics),ATP(NEB),100mM缓冲盐溶液,100mM MgCl₂(国药集团化学试剂有限公司),50mM 二硫苏糖醇(Sigma)。

[0118] 2.2 实验步骤

[0119] 2.2.1 加“A”,分别吸取两份以pUC18DNA为模板扩增的PCR产物(200bp)(深圳华大基因研究院)置于EP管中,分别命名为X和Y,按照下列表格配置反应体系。

[0120]

DNA样品X	19.7μl	DNA 样品 Y	19.7μl
试剂 I	3μl	10\timesblue buffer	2.3μl
ddH₂O	0.3μl	dATP (5mM)	0.5μl
		Klenow Fragment (3' to 5' exo)	0.5μl
总体积	23μl	总体积	23μl

[0121] 反应温度 :37℃, 30min, 将样品 Y 经过 DNA 产物纯化试剂盒 (QIAGEN 公司 QIAquick PCR Purification Kit) 纯化后溶于 16.4 μ l EB 洗脱液中 (柱纯化会损失 2 μ l 液体体积)。

[0122] 2.2.5 加 “Adapter”,

[0123]

加完“A”的样品X	23μl	DNA 样品 Y	14.4μl
试剂 II	1μl	DNA Ligase Buffer 10 \times	3μl
DNA Index adapter	1μl	DNA Index adapter	1.4μl
		T4 DNA 连接酶	1.2μl
		ddH₂O	10μl
总体积	25μl	总体积	30μl

[0124] 注 :DNA Index adapter 如实施例一所述

[0125] 反应温度 :16℃, 过夜连接 18h, 加完接头后用 Ampure 磁珠进行纯化, 样品 X 和 Y 均用 30 μ l EB 液溶解洗脱。

[0126] 然后再将两份样品进行 Q-PCR 检测, 结果如下表 :

[0127] 两份样品的 Q-PCR 检测结果

[0128]

样品	样品X	样品Y
Q-PCR CT值	4.61	5.01

[0129] 根据上述两份样品中 Q-PCR 检测结果可以看出, 样品 X (即本发明方法制备的样品) 与样品 Y (即现有技术中 illumina 测序平台的方法制备的样品) 的 CT 值未见明显差异, 说明两种方法浓度相当。

[0130] 实施例三

[0131] 3.1 试剂

[0132] T4DNA 连接酶 (Rapid, L603-HC-L) (Enzymatics)。

[0133] 试剂 I 同实施例一的 1.1 项所述的试剂 I。

[0134] 试剂 II pH 为 7.6, 溶剂是水, 溶质为 T4DNA 连接酶 (Takara), 10mM ATP (NEB), 500mM Tris-HCl 溶液, 100mM MgCl₂ (国药集团化学试剂有限公司), 50mM 二硫苏糖醇 (Sigma)。

[0135] 3.2 实验步骤 [Agilent Technologies. Sureselect target enrichment system for illumina paired-end sequencing library. G3360-90020]

[0136] 3.2.1 吸取两份 50ng/ μ l Fosmid 样品 (深圳华大基因研究院) 各 40 μ l 置于 Covaris 样品管中, 分别命名为 X 和 Y, 采用 Covaris 公司生产 E210 型号打断仪对样品进行

打断,打断参数如下:

[0137]

负载比	强度	循环/脉冲	时间(秒)
10%	5	200	360

[0138] 3.2.2 末端修复操作详见安捷伦 SureSelect platform 操作手册 G3360-90020。

[0139] 3.2.2 加“A”,按照下表反应体系处理样品 X 和 Y。

[0140]

DNA样品X	19.7μl	DNA样品Y	28.1μl
试剂 I	3μl	10× blue buffer	5μl
ddH ₂ O	0.3μl	dNTP (25mM)	3.5μl
		dATP(稀释至5 mM, GE公司)	1.4μl
		Klenow Fragment (3'-5' exo-)	2.0μl
总体积	23μl	总体积	35μl

[0141] 反应温度:37℃,30min,将样品 Y 经过柱纯化后溶于 37 μl EB 洗脱液中(柱纯化会损失 2 μl 液体体积)。

[0142] 3.2.3 加“Adaptor”。

[0143]

加完“A”的样品X	23μl	加完“A”纯化后的样品Y	35μl
试剂 II	12μl	DNA Ligase Buffer 10 ×	1.5μl
DNA Index adapter	3μl	DNA Index adapter	3μl
		T4 DNA连接酶(Rapid, L603-HC-L)	3μl
		ATP(10mM)	3.5μl
		ddH ₂ O	4μl
总体积	25μl	总体积	50μl

[0144] 注:DNA Index adapter 如实施例一所述

[0145] 反应温度:16℃,过夜连接 18h。

[0146] 3.2.4PCR 反应,操作步骤同 1.2.6 项。

[0147] 然后再将两份样品的分别纯化后,进行琼脂糖凝胶电泳(2%),并切胶回收 200bp 的片段,溶于 30ul 超纯水中。Q-PCR 检测结果如下表:

[0148] 样品 X 和 Y 的 Q-PCR 检测结果

[0149]

样品	样品X	样品Y
Q-PCR CT值	14.86	14.75

[0150] 从上表中数据可知,样品 X(即本发明方法制备的样品)与样品 Y(即现有技术中 illumina 测序平台的方法制备的样品)所得到的 200bpDNA 片段 CT 值相对比,二者没有显著差别,提示二者浓度相当。

[0151] 将实施案例一、二中的样品均匀混合,使用 Agilent Bioanalyzer 2100 检测片

段大小,结果见图2。从Agilent Bioanalyzer 2100结果显示本发明的方法片段与现有技术中illumina测序平台的方法片段大小均符合要求。可以看出,通过本发明的方法所构建的文库合格,并且实施例一和实施例二以及实施例三中,本发明的方法与现有技术中illumina测序平台的方法所分别构建的文库浓度没有显著差异说明两种建库方法没有显著差异,且后续测序数据结果都属正常,而本发明则具有较少的操作步骤和较低的成本。

[0152] 尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述,本领域技术人员将会理解。根据已经公开的所有教导,可以对那些细节进行各种修改和替换,这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

[0001]

序列表

<110>	深圳华大基因科技有线公司 深圳华大基因研究院	
<120>	一种新的基于illumina测序平台的文库构建方法	
<130>	IDC100233	
<160>	4	
<170>	PatentIn version 3.4	
<210>	1	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	1 tacactcttt ccctacacga cgctcttccg atctaacc	40
<210>	2	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	2 ttggttagat cggaagagca cacgtctgaa ctccagtcac	40
<210>	3	
<211>	66	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	3 caagcagaag acggcatacg agataagcaa tgggtgactgg agttcagacg tgtgctcttc cgatct	60 66
<210>	4	
<211>	58	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	4 aatgatacgg cgaccaccga gatctacact ctttcctac acgacgtct tccgatct	58

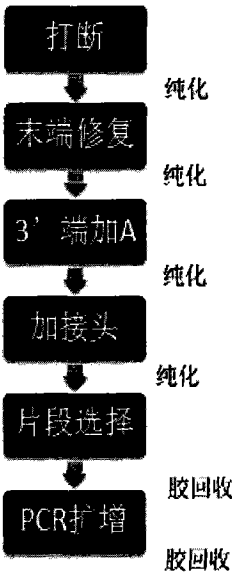


图 1

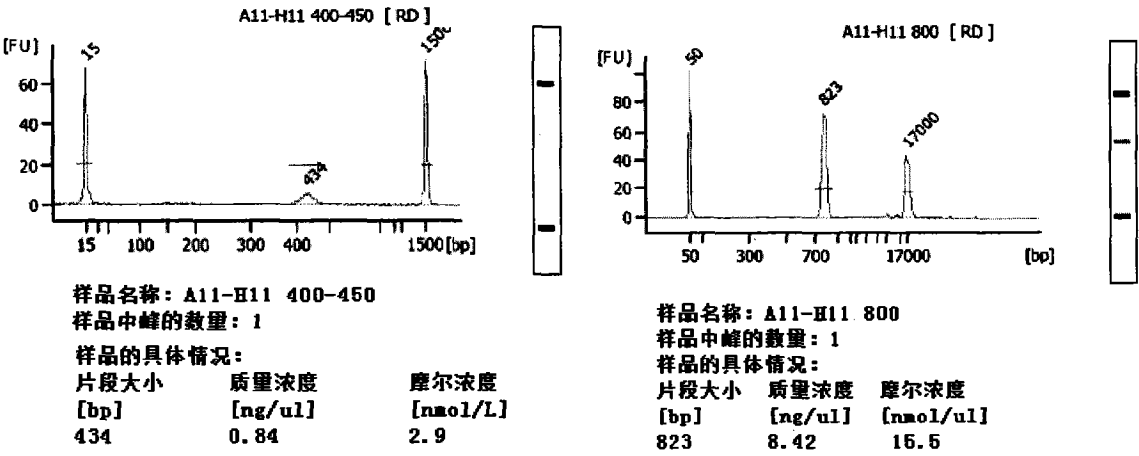


图 2

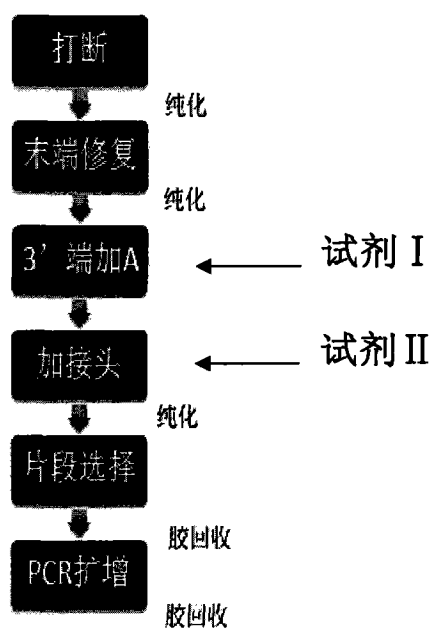


图 3