



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110724728 A

(43)申请公布日 2020.01.24

(21)申请号 201910968892.7

(22)申请日 2019.10.12

(71)申请人 深圳清华大学研究院

地址 518000 广东省深圳市南山区科技园
高新南七道19号清华研究院

申请人 安序源生物科技(深圳)有限公司

(72)发明人 高亚平 田晖 何筠 邓素华
伊戈尔·伊万诺夫

(74)专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有
限公司 44205

代理人 朱继超

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6806(2018.01)

C12P 19/34(2006.01)

C12Q 1/6844(2018.01)

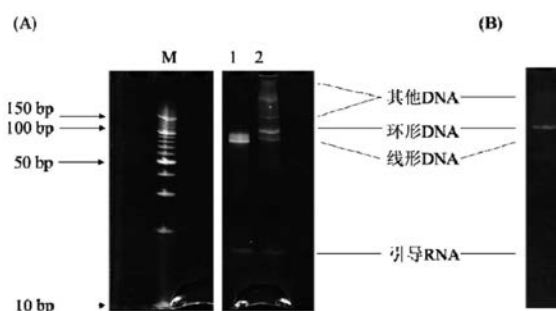
权利要求书1页 说明书5页
序列表1页 附图2页

(54)发明名称

一种环状DNA的制备方法

(57)摘要

本公开提供了一种环状DNA的制备方法,所述环状DNA的制备方法的具体步骤为:(1)首先合成需要成环的单链DNA分子,然后在合成的单链DNA分子的5'端做磷酸化修饰;(2)然后设计合成引导RNA分子,所述引导RNA分子的核苷酸序列与合成的单链DNA分子两端的核苷酸互补配对;(3)将合成的单链DNA分子和引导RNA分子进行退火,获得退火产物;(4)利用连接酶对得到的退火产物进行连接反应,得到连接反应产物;(5)利用核酸外切酶消化连接产物中未成环的线性核苷酸;(6)最后回收合成的单链环状DNA分子。所述制备方法简单易操作,且在方法中所使用的材料成本低,降低了制备环状DNA的成本。



1. 一种环状DNA的制备方法,其特征在于,所述环状DNA的制备方法的具体步骤为:

(1) 首先合成需要成环的单链DNA分子,然后在合成的单链DNA分子的5'端做磷酸化修饰;

(2) 然后设计合成引导RNA分子,所述引导RNA分子的核苷酸序列与合成的单链DNA分子两端的核苷酸互补配对;

(3) 将合成的单链DNA分子和引导RNA分子进行退火,获得退火产物;

(4) 利用连接酶对得到的退火产物进行连接反应,得到连接产物;

(5) 利用核酸外切酶消化连接产物中未成环的线性核苷酸;

(6) 最后回收合成的单链环状DNA分子。

2. 根据权利要求书1中所述的环状DNA的制备方法,其特征在于,所述步骤(3)中退火的反应条件为:首先85℃反应5min,然后25℃反应3h。

3. 根据权利要求书1中所述的环状DNA的制备方法,其特征在于,所述步骤(3)中退火的反应体系为合成的单链DNA分子:引导RNA分子:退火缓冲液:去RNA酶水的体积比为1:2:1:7。

4. 根据权利要求书3中所述的环状DNA的制备方法,其特征在于,所述退火缓冲液包括:100mM Tris-HCl、10mM EDTA、和1M NaCl,所述Tris-HCl的PH值为7.5。

5. 根据权利要求书1中所述的环状DNA的制备方法,其特征在于,所述步骤(4)连接反应的条件为:首先16℃反应16h,然后65℃反应20min。

6. 根据权利要求书1中所述的环状DNA的制备方法,其特征在于,所述步骤(4)中连接反应的体系为连接缓冲液:退火产物:连接酶:H₂O的体积比为3:1:2.5:30。

7. 根据权利要求书1中所述的环状DNA的制备方法,其特征在于,所述连接酶为SplintR连接酶或T4 DNA连接酶。

8. 根据权利要求书1中所述的环状DNA的制备方法,其特征在于,所述步骤(5)中核酸外切酶为Exonuclease I外切酶和T7 Exonuclease外切酶的混合物。

9. 根据权利要求书8中所述的环状DNA的制备方法,其特征在于,核酸外切酶消化的反应体系为连接产物:Exonuclease I外切酶:T7 Exonuclease外切酶的体积比为7:1:2。

10. 根据权利要求书1中所述的环状DNA的制备方法,其特征在于,所述步骤(5)中核酸外切酶消化的条件为:25℃反应16h。

一种环状DNA的制备方法

技术领域

[0001] 本公开涉及核苷酸技术领域,具体涉及一种环状DNA的制备方法。

背景技术

[0002] 滚环复制(环-介导的等温扩增,Loop-mediated isothermal amplification-LAMP)是具有链置换能力的等温扩增酶利用环状DNA分子做模板,进行核酸扩增的方法。该方法与PCR(聚合酶链式反应)都能对微量的核酸模板进行序列特异的扩增,不同之处在于,滚环复制过程能够在恒定温度下完成扩增反应,因此不需要温控精确的PCR仪,是一种既简便又经济的核酸扩增方法,且不同序列的单链环状DNA分子通过滚环复制,能够生成不同长度的串联重复序列。天然的基因和蛋白中存在大量的随机重复序列,这些重复序列组成特异的模序,能够急剧增加候选基因的生物大分子的生理特异性和活性。这种模序广泛分布于启动子/增强子等核酸序列,促进反式作用因子对靶序列的识别,产生叠加和/或者协同效用。通过构建大的随机重复序列库,是研究体内或者体外研究结构-功能之间关系的重要策略之一。通过制备单链环状DNA分子进行滚环复制,可以制备不同长度和重复次数的随机重复序列。

[0003] 目前常用的单链环状DNA模板主要来源是病毒的单链环状DNA M13mp18(7249bp)以及酶连反应产生的单链环状DNA分子(sscDNA,single strand circular DNA),sscDNA分子长度一般为34-120bp,但是使用单链环状病毒DNA M13mp18,这种病毒培养的过程慢,成本高,从而导致M13mp18的价格较高,且单链M13mp18 DNA分子量(Molecular weight)大,若底物浓度过高,会抑制滚环复制反应的进行。在现有的酶连反应产生单链环状DNA分子的制备方法中,多倚赖DNA(guide DNA)做引导分子,完成目标序列的连接,这种方法会导致终产物中残留微量引导DNA分子,使得后续DNA聚合酶利用其作引物进行滚环复制,从而对结果分析造成干扰。

发明内容

[0004] 本公开的目的是提供一种环状DNA的制备方法,以达到降低成本的目的。

[0005] 为实现上述目的,技术方案如下:

[0006] 一种环状DNA的制备方法,所述环状DNA的制备方法的具体步骤为:

[0007] (1) 首先合成需要成环的单链DNA分子,然后在合成的单链DNA分子的5'端做磷酸化修饰;

[0008] (2) 然后设计合成引导RNA分子,所述引导RNA分子的核苷酸序列与合成的单链DNA分子两端的核苷酸互补配对;

[0009] (3) 将合成的单链DNA分子和引导RNA分子进行退火,获得退火产物;

[0010] (4) 利用连接酶对得到的退火产物进行连接反应,得到连接反应产物;

[0011] (5) 利用核酸外切酶消化连接产物中未成环的线性核苷酸;

[0012] (6) 最后回收合成的单链环状DNA分子。

- [0013] 所述步骤(3)中退火的反应条件为:首先85℃反应5min,然后25℃反应3h。
- [0014] 所述步骤(3)中退火的反应体系为合成的单链DNA分子:引导RNA分子:退火缓冲液:去RNA酶水的体积比为1:2:1:7。
- [0015] 所述退火缓冲液包括:100mM Tris-HCl、10mM EDTA、和1M NaCl,所述Tris-HCl的PH值为7.5。
- [0016] 所述步骤(4)连接反应的条件为:首先16℃反应16h,然后65℃反应20min。
- [0017] 所述步骤(4)中连接反应的体系为连接缓冲液:退火产物:连接酶:H₂O的体积比为3:1:2.5:30。
- [0018] 所述连接酶为SplintR连接酶或T4 DNA连接酶。
- [0019] 所述步骤(5)中核酸外切酶为Exonuclease I外切酶和T7 Exonuclease外切酶的混合物。
- [0020] 核酸外切酶消化的反应体系为连接产物:Exonuclease I外切酶:T7Exonuclease外切酶的体积比为7:1:2。
- [0021] 所述步骤(5)中核酸外切酶消化的条件为:25℃反应16h。
- [0022] 本公开的有益效果是:提供了一种环状DNA的制备方法,所述制备方法简单易操作,且在方法中不需要实用单链环状病毒DNA M13mp18,其余材料成本低,从而降低了制备环状DNA的成本。同时本公开所述的环状DNA的制备方法突破了模板序列的限制,而且在制备过程中无需添加外源DNA,而是添加了根据需要成环的单链DNA分子末端所合成的RNA分子,减少了干扰,且还利用了核酸外切酶消化了未成环的线性核苷酸,进一步的减少了副产物的产生,大大增加了单链环状DNA的产率,而且本公开所述的环状DNA的制备方法所制备的单链环状DNA还可用于检测DNA聚合酶是否具备链置换能力。

附图说明

- [0023] 图1为实施例1中退火产物、连接产物和核酸外切酶消化产物的凝胶电泳图。
- [0024] 图2为实施例2滚环复制产物的凝胶电泳图。
- [0025] 图3为实施例3不同的延伸反应时间下产物的凝胶电泳图。
- [0026] 图4为实施例4DNA聚合酶链置换能力检测图。

具体实施方式

[0027] 以下各步骤仅用以说明本公开的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述各步骤对本公开进行了详细的说明,但本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对前述各步骤所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分或者全部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公开各步骤技术方案的范围。

[0028] 实施例1

[0029] 一种环状DNA的制备方法,具体操作步骤为:

[0030] (1) 首先合成需要成环的单链DNA分子,然后在合成的单链DNA分子的5'端做磷酸化修饰,其中单链DNA分子的核苷酸序列为SEQ ID NO.1:5'-pATTGGTCTACATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCCTACGGATTGC;

[0031] (2) 然后设计合成引导RNA分子,所述引导RNA分子的核苷酸序列与合成的单链DNA

分子的两端互补配对,其中引导RNA分子的核苷酸序列为SEQ ID NO.2:5'-UAGACCAU GCAAUCCGUA-3' ;

[0032] (3) 将合成的单链DNA分子和引导RNA分子进行退火,获得退火产物,其中退火反应的体系如表1所示,

[0033] 表1退火反应体系

[0034]	试剂	体系
	DNA (100uM)	1uL
	RNA (100uM)	2uL
	10×buffer	1uL
	Rnase-free H ₂ O	加至总体积10uL

[0035] 其中10x退火缓冲液包括:100mM Tris-HCl (pH 7.5)、10mM EDTA和1M NaCl,退火反应的条件为:首先85℃反应5min,然后25℃反应3h,反应结束后,进行15%聚丙烯酰胺凝胶电泳,结果如图1A泳道1所示;

[0036] (4) 利用SplintR连接酶对得到的退火产物进行连接反应,得到连接反应产物,其中连接反应的体系如表2所示,

[0037] 表2连接反应体系

[0038]	试剂	体积
	10xSplintR连接酶缓冲液	3
	退火产物 (10μM)	1
	Ligase (10.5μM)	2.5
	H ₂ O	30uL

[0039] 其中连接反应的条件为:16℃,16h;65℃,20min终止反应,反应结束后,进行15%聚丙烯酰胺凝胶电泳,结果如图1A泳道2所示;

[0040] (5) 利用核酸外切酶消化连接产物中未成环的线性核苷酸,其中核酸外切酶消化的反应体系如表3所示,

[0041] 表3核酸外切酶消化的反应体系

[0042]	试剂	体积
	连接反应产物	7uL
	Exonuclease I	1uL
	T7 gene 6exonuclease	2uL

[0043] 其中反应条件为:25℃反应16h,反应结束后,进行15%聚丙烯酰胺凝胶电泳,以检测目标产物以及线形分子是否消化完全,结果如图1B所示,可以看出线性分子已被消化完全;

[0044] (6) 最后利用NEB Monarch™PCR&DNA Cleanup Kit回收试剂盒回收合成的单链环状DNA分子。

[0045] 实施例2

[0046] 利用实施例1所制备的单链环状DNA分子(sscDNA)进行滚环复制实验,其具体操作步骤为:首先设计引物序列,其引物DNA序列为SEQ ID NO.3:5'-aTAGACCAAT GCAATCCGTAc-

3' ; 然后进行退火反应, 最后选用Phi29 DNA聚合酶进行延伸反应。

[0047] 其中退火反应的体系如表4所示:

[0048] 表4滚环复制退火反应体系

[0049]	试剂	体系
	sscDNA (2.5uM)	1uL
	引物DNA (2.5uM)	2uL
	10×buffer	1uL
	Rnase-free H ₂ O	加至总体积10uL

[0050] 其中10x退火缓冲液包括: 100mM Tris-HCl (pH 7.5)、10mM EDTA和1M NaCl, 退火反应条件为: 85℃, 5min; 25℃, 3h。

[0051] 其中利用Phi29 DNA聚合酶 (Phi29 DNAP) 进行延伸反应的体系, 然后设置对照组, 体系如表5所示:

[0052] 表5滚环复制延伸反应的体系

[0053]	试剂	对照组体系	实验组体系
	10xPhi29 Buffer	2uL	2uL
[0054]	BSA (20mg/ml)	0.2uL	0.2uL
	dNTPs (1mM)	4uL	4uL
	退火产物	2uL	2uL
	Phi29 DNAP (10U)	0uL	1uL
	dd H ₂ O	加至总体积 20uL	加至总体积 20uL

[0055] 其中Phi29DNA聚合酶, 购自NEB, 货号为M0269S; 延伸反应条件是30℃, 30min。

[0056] 反应结束后, 采用碱性琼脂糖凝胶电泳检测延伸产物, 其中, 碱性琼脂糖凝胶电泳条件为3V/CM, 3h。碱性琼脂糖凝胶电泳的缓冲液为: 10×碱性琼脂糖电泳缓冲液或6×碱性凝胶载样缓冲液, 其中10×碱性琼脂糖电泳缓冲液包括: 500mM NaOH及10mM EDTA; 6×碱性凝胶载样缓冲液包括: 300mM NaOH, 6mM EDTA, 18% (m/V) Ficoll-400 (Pharmacia公司), 0.15% (m/V) 溴甲酚绿及0.25% (m/V) 二甲苯氰。电泳结束后, 将琼脂糖胶浸泡在SYBR Gold染液中, 缓慢水平震荡约20min; 然后利用Azure Biosystems成像仪检测。结果如图2所示, 对照组 (泳道1) 没有延伸产物, 而实验组 (泳道2) 生成大于48.5kbp的延伸产物, 证明实施例1中制备所得DNA为环形DNA。

[0057] 实施例3

[0058] 利用实施例1中制备的单链环状DNA分子做模板, 生成不同大小的串联重读序列, 按照实施例2的滚环复制的方法设定不同的延伸反应时间 (0、5、10、20、30min), 可以生成不同长度和浓度的串联重复序列, 其中退火反应的体系为实施例2表1所示, 退火反应的条件为: 85℃, 5min; 25℃, 3h; 其中延伸反应的体系为实施例2中表5所示的实验组体系, 结果如

图3所示,其中2-6泳道中反应时间分别为0、5、10、20、30min,可以看出延伸产物的长度和浓度,均随着延伸时间的延长不断增加。

[0059] 实施例4

[0060] 利用实施例1中制备的单链环状DNA分子做模板,通过实施例2中的滚环复制方法,根据DNA聚合酶的聚合能力,可以检测DNA聚合酶是否具有链置换能力,其中退火反应的体系为实施例2表1所示,退火反应的条件为:85℃,5min;25℃,3h;其中延伸反应体系如表6:

[0061] 表6检测DNA聚合酶链置换能力的延伸反应体系

试剂	对照组体系	Phi29 体系	Klenow Fragment 体系
10x Phi29/ NEBuffer™ 2 Buffer	2uL	2uL	2uL
BSA(20mg/ml)	0.2uL	0.2uL	0.2uL
dNTPs(1mM)	4uL	4uL	4uL
退火产物	2uL	2uL	2uL
DNAP(10U)	0uL	1uL	2uL
dd H ₂ O	加至总体积 20uL	加至总体积 20uL	加至总体积 20uL

[0063] 其中Phi29DNA聚合酶,购自NEB,货号为M0269S;延伸反应条件是30℃,30min。

[0064] 将上述反应体系所产生的产物进行凝胶电泳,结果如图4所示,其中图中泳道1为不添加DNA聚合酶的空白对照组,泳道2为Phi29 DNA聚合酶延伸产物,泳道3为大肠杆菌DNA Pol I, Large (Klenow) fragment,根据图4可以看出具有链置换能力的DNA聚合酶能够利用环形DNA分子进行滚环复制,生成大片段单链DNA产物;而不具有链置换能力的DNA聚合酶,不能生成相应的产物,因此利用单链环状DNA分子做模板,通过DNA聚合酶的聚合能力这种方法,可以用来迅速、简便鉴定未知DNA聚合酶是否具有链置换能力。

SEQUENCE LISTING

<110> 深圳清华大学研究院;安序源生物科技(深圳)有限公司

<120> 一种环状DNA的制备方法

<130> 2019.10.12

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 69

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 1

attggtctac atgcatgcat gcatgcatgc atgcatgcat gcatgcatgc atgcatgcct 60
acggattgc 69

<210> 2

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工合成

<400> 2

uagaccaaug caauccgua 19

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 3

atagaccaat gcaatccgta c 21

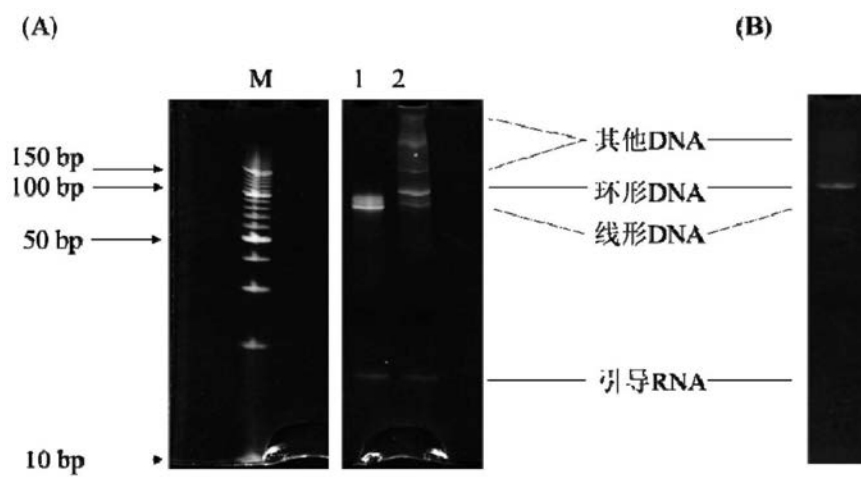


图1

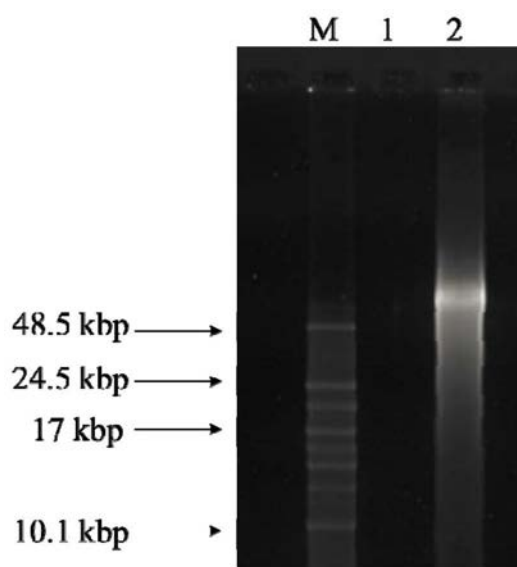


图2

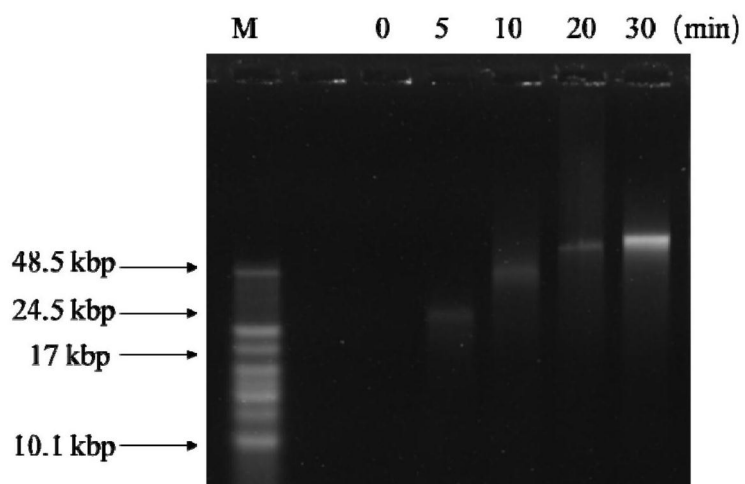


图3

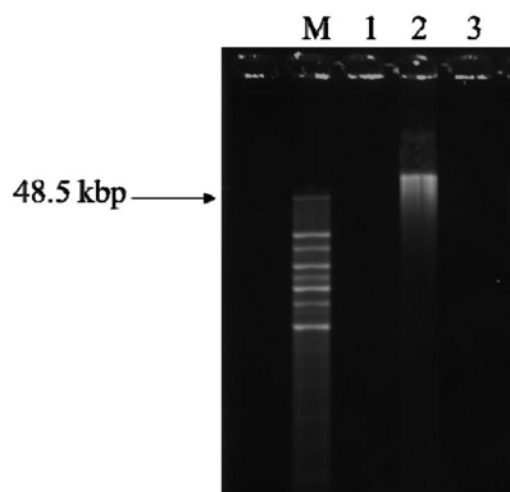


图4