

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2012 年 6 月 21 日 (21.06.2012)



(10) 国际公布号
WO 2012/079490 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2011/083786
- (22) 国际申请日: 2011 年 12 月 9 日 (09.12.2011)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201010588936.2 2010 年 12 月 15 日 (15.12.2010) CN
- (71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): **深圳华大基因科技有限公司 (BGI SHENZHEN CO., LIMITED)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山路 146 号北山工业区综合楼 11F-3, Guangdong 518083 (CN)。
深圳华大基因研究院 (BGI SHENZHEN) [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。
- (72) 发明人; 及
- (75) 发明人/申请人 (仅对美国): **栾合密 (LUAN, Hemi)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。
张俊青 (ZHANG, Junqing) [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。
程玲 (CHENG, Ling) [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。
孔淑娟 (KONG, Shujuan) [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。
张秀清 (ZHANG, Xiuqing) [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong

518083 (CN)。
杨焕明 (YANG, Huanming) [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。

- (74) 代理人: **北京清亦华知识产权代理事务所 (普通合伙) (TSINGYIHUA INTELLECTUAL PROPERTY LLC)**; 中国北京市海淀区清华园清华大学照澜院商业楼 301 室, Beijing 100084 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第 21 条(3))。

(54) Title: METHOD FOR CONSTRUCTING DNA SEQUENCING LIBRARY AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 构建 DNA 测序文库的方法及其用途

(57) Abstract: Provided are two reagents, a method for constructing a DNA sequencing library, a DNA sequencing library, a method for determining the sequence information in a DNA sample and a kit for constructing a DNA sequencing library, wherein one reagent comprises 10 mM to 1000 mM of a buffer salt, 10 mM to 100 mM of a soluble salt, 10 mM to 300 mM of $MgCl_2$, 1 mM to 50 mM of dithiothreitol, 1 mM to 10 mM of dATP and 1 U/ml to 40 U/ml of klenow fragment, with the pH of the reagent being 7.6 to 7.9, and the other reagent comprises 10 mM to 200 mM of a buffer salt, 1 mM to 100 mM of dithiothreitol, 10 mM to 400 mM of $MgCl_2$, 1 mM to 40 mM of ATP and 1 U/ml to 200 U/ml of DNA ligase, with the pH of the reagent being 7.6 to 7.9.

(57) 摘要:

本发明提供了两种试剂、构建 DNA 测序文库的方法、DNA 测序文库、确定 DNA 样品的序列信息的方法以及用于构建 DNA 测序文库的试剂盒。其中, 一种试剂包含: 10mM-1000mM 的缓冲盐、10mM-100mM 的可溶性盐、10mM-300mM 的 $MgCl_2$ 、1mM-50mM 的二硫苏糖醇、1mM-10mM 的 dATP 以及 1U/ml-40U/ml 的 klenow 片段, 所述试剂的 pH 为 7.6-7.9。另一种试剂包含: 10mM-200mM 的缓冲盐、1mM-100mM 的二硫苏糖醇、10mM-400mM 的 $MgCl_2$ 、1mM-40mM 的 ATP 以及 1U/ml-200U/ml 的 DNA 连接酶, 所述试剂的 pH 为 7.6-7.9。

构建 DNA 测序文库的方法及其用途

优先权信息

本申请请求 2010 年 12 月 15 日向中国国家知识产权局提交的、专利申请号为 201010588936.2 的专利申请的优先权和权益，并且通过参照将其全文并入此处。

技术领域

本发明涉及生物技术领域，具体地，涉及 DNA 测序技术领域，特别是构建 DNA 测序文库的方法及其用途。更具体地，本发明提供了两种试剂、一种构建 DNA 测序文库的方法、一种 DNA 测序文库、一种确定 DNA 样品的序列信息的方法、一种用于构建 DNA 测序文库的试剂盒。

背景技术

DNA（脱氧核糖核酸），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，其是生命遗传信息的载体。对 DNA 核苷酸序列进行测序分析，不仅能够为基因表达和调控等生物学基础研究提供重要数据，而且对疾病诊断学和基因治疗等应用研究意义重大（可参见 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., 通过参照将其全文并入本文）。

然而，目前常用的 DNA 测序平台，例如 Illumina 第二代高通量测序平台，各个步骤均独立进行，且每步之后都需要进行纯化，因而过程繁琐、产物损失多、成本高，仍需改进。

发明内容

本发明旨在至少解决现有技术中存在的技术问题之一。为此，本发明提供了构建 DNA 测序文库的方法及其用途。

根据本发明的一个方面，本发明提出了一种试剂，该试剂包含缓冲盐、二硫苏糖醇、 $MgCl_2$ 。发明人发现，通过采用该试剂作为缓冲体系，可以有效地配置构建测序文库中所需要的能够有效地将 DNA 片段的 3'端添加碱基 A 的反应体系，以及能够有效地将接头与 3'

端添加碱基 A 的 DNA 片段相连的反应体系。由此, 可以节省回收的步骤。从而能够提高构建测序文库的效率。

在上述试剂作为缓冲体系的基础上, 根据本发明的又一个方面, 本发明提供了一种试剂。根据本发明的实施例, 该试剂包含: 10mM~1000mM 的缓冲盐; 10mM~100mM 的可溶性盐; 10mM~300mM 的 $MgCl_2$; 1mM~50mM 的二硫苏糖醇; 1mM~10mM 的 dATP; 以及 1U/ml~40U/ml 的 Klenow 片段 ($3' \rightarrow 5'$ exo), 其中, 该试剂的 pH 为 7.6~7.9。发明人惊奇地发现, 利用该试剂, 能够有效地将 DNA 片段的 3'端添加碱基 A, 所得产物质量好、纯度高, 无需经过纯化即可用于后续处理例如与接头相连。需要说明的是, 在本文中, 有时也将该试剂称为第一试剂, 其在本发明的构建 DNA 测序文库的方法中, 被用于对经过末端修复的 DNA 片段进行处理, 以便获得 3'端添加碱基 A 的 DNA 片段。根据本发明的另一方面, 本发明还提供了一种试剂。根据本发明的实施例, 该试剂包含: 10mM~200mM 的缓冲盐; 1mM~100mM 的二硫苏糖醇; 10mM~400mM 的 $MgCl_2$; 1mM~40mM 的 ATP; 以及 1U/ml~200U/ml 的 DNA 连接酶, 其中, 该试剂的 pH 为 7.6~7.9。发明人惊奇地发现, 利用该试剂, 能够有效地将接头与 3'端添加碱基 A 的 DNA 片段相连, 所得产物质量好、纯度高, 能够有效地应用于后续处理。需要说明的是, 在本文中, 有时也将该试剂称为第二试剂, 其在本发明的构建 DNA 测序文库的方法中, 被用于将所述 3'端添加碱基 A 的 DNA 片段与接头进行连接, 以便获得连接产物。

根据本发明的再一方面, 本发明提供了一种构建 DNA 测序文库的方法。根据本发明的实施例, 该方法包含以下步骤: 将 DNA 片段化, 以便获得 DNA 片段; 将 DNA 片段进行末端修复, 以便获得经过末端修复的 DNA 片段; 使用根据本发明实施例的第一试剂, 对经过末端修复的 DNA 片段进行处理, 以便获得 3'端添加碱基 A 的 DNA 片段; 使用根据本发明实施例的第二试剂, 将 3'端添加碱基 A 的 DNA 片段与接头进行连接, 以便获得连接产物; 将连接产物进行片段选择, 以便获得目的片段; 将目的片段进行 PCR 扩增, 以便获得扩增产物; 以及分离纯化扩增产物, 该扩增产物构成 DNA 测序文库。

发明人发现, 根据本发明实施例的构建 DNA 测序文库的方法, 步骤简便、易于操作、需时少、可重复性好, 且该方法能够减少文库损失、降低建库成本、提高文库构建效率, 获得的文库质量非常好。根据本发明的实施例, 利用该方法能够方便高效地构建样品的 DNA 测序文库, 并且该 DNA 测序文库能够有效地应用于高通量测序平台例如 Illumina 测序平台, 所得测序结果准确、可重复性好。

根据本发明的另一方面, 本发明提供了一种 DNA 测序文库, 其是通过根据本发明实施例的构建 DNA 测序文库的方法构建的。根据本发明的实施例, 该 DNA 测序文库能够有

效地应用于高通量测序平台，并且测序结果准确、可重复性好。

根据本发明的又一方面，本发明提供了一种确定 DNA 样品的序列信息的方法。根据本发明的实施例，该方法包括下列步骤：根据本发明实施例的构建 DNA 测序文库的方法，构建 DNA 样品的 DNA 测序文库；以及对该 DNA 测序文库进行测序，以便确定 DNA 样品的序列信息。利用该方法能够方便有效地确定 DNA 样品的序列信息，并且效率高、结果准确、可重复性好。

根据本发明的再一方面，本发明还提供了一种用于构建 DNA 测序文库的试剂盒。根据本发明的实施例，该试剂盒包含：第一试剂；以及第二试剂。其中第一试剂和第二试剂均为前面所述的根据本发明实施例的第一试剂和第二试剂。利用该试剂盒能够方便有效地构建 DNA 测序文库，并且可重复性好，获得的文库质量好，从而能够有效地应用于高通量测序平台例如 Illumina 测序平台。

本发明的附加方面和优点将在下面的描述中部分给出，部分将从下面的描述中变得明显，或通过本发明的实践了解到。

附图说明

本发明的上述和/或附加的方面和优点从结合下面附图对实施例的描述中将变得明显和容易理解，其中：

图 1：显示了基于 Illumina 测序平台的小片段 DNA 的文库构建方法的流程示意图。

图 2：显示了根据本发明一个实施例的构建的 DNA 测序文库经 Agilent Bioanalyzer 2100 检测结果。

图 3：显示了根据本发明一个实施例的构建 DNA 测序文库的方法的流程示意图。

发明详细描述

下面详细描述本发明的实施例，所述实施例的示例在附图中示出，其中自始至终相同或类似的标号表示相同或类似的元件或具有相同或类似功能的元件。下面通过参考附图描述的实施例是示例性的，仅用于解释本发明，而不能理解为对本发明的限制。

需要说明的是，术语“第一”、“第二”仅用于描述目的，而不能理解为指示或暗示相对重要性或者隐含指明所指示的技术特征的数量。由此，限定有“第一”、“第二”的特征可以明示或者隐含地包括一个或者更多个该特征。进一步地，在本发明的描述中，除非另有说明，“多个”的含义是两个或两个以上。

试剂

根据本发明的一个方面,本发明提出了一种试剂,该试剂包含缓冲盐、二硫苏糖醇、 MgCl_2 。发明人发现,通过采用该试剂作为缓冲体系,可以有效地配置构建测序文库中所需要的能够有效地将 DNA 片段的 3'端添加碱基 A 的反应体系,以及能够有效地将接头与 3'端添加碱基 A 的 DNA 片段相连的反应体系。由此,可以省去在将 DNA 片段的 3'端添加碱基 A 之后,在将接头与 3'端添加碱基 A 的 DNA 片段相连之前的回收步骤。从而能够提高构建测序文库的效率。

在该缓冲体系的基础上,根据本发明的另一个方面,本发明提供了一种试剂。根据本发明的实施例,该试剂可以包含: 10mM~1000mM 的缓冲盐; 10mM~100mM 的可溶性盐; 10mM~300mM 的 MgCl_2 ; 1mM~50mM 的二硫苏糖醇; 1mM~10mM 的 dATP; 以及 1U/ml~40U/ml 的 Klenow 片段 (3'→5' exo), 其中,该试剂的 pH 为 7.6~7.9。利用该试剂,能够有效地将 DNA 片段的 3'端添加碱基 A,所得产物质量好、纯度高,能够有效地用于后续处理例如连接接头。

根据本发明的实施例,该试剂中所包含的缓冲盐的类型不受特别限制,根据本发明的一些具体示例,缓冲盐可以为选自 Tris-HCl 和磷酸盐的至少一种,优选为 Tris-HCl。根据本发明的一些实施例,该试剂中缓冲盐的浓度可以为 10mM~1000mM,根据本发明的具体示例,优选为 50mM~500mM,更优选为 100mM。

根据本发明的实施例,该试剂中所包含的可溶性盐的类型不受特别限制,根据本发明的一些具体示例,可溶性盐可以为选自氯化钠和氯化钾的至少一种,优选为氯化钠。根据本发明的一些实施例,该试剂中包含的可溶性盐的浓度可以为 10mM~100mM,根据本发明的具体示例,优选为 25mM~75mM,更优选为 50mM。

根据本发明的一些实施例,该试剂中可以包含 50mM~200mM 的 MgCl_2 ,根据具体示例,优选包含 100mM 的 MgCl_2 。根据本发明的一些实施例,该试剂中可以包含 2.5mM~7.5mM 的 dATP,根据具体示例,优选包含 5mM 的 dATP。根据本发明的一些实施例,该试剂中可以包含 10U/ml~30U/ml 的 Klenow 片段 (3'→5' exo),根据具体示例,优选包含 20U/ml 的 Klenow 片段 (3'→5' exo)。

根据本发明的具体示例,优选地,该试剂的 pH 为 7.9。

具体地,根据本发明的实施例,本发明的第一试剂,其 pH 可以为 7.6~7.9,优选 7.9,溶剂是水,溶质可以为如下终浓度物质的混合物: 10 mM~100mM,优选 25mM~75mM,更优选 50mM 的可溶性盐; 10~300mM,优选 50~200mM,更优选 100mM 的 MgCl_2 ; 10mM~1000mM,优选 50 mM~500mM,更优选 100mM 的缓冲盐; 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, 1 U/ml ~40 U/ml, 优选 10 U/ml ~30 U/ml, 更优选 20 U/ml 的 Klenow(3' -5' exo)酶。其中所述缓冲盐可以为 Tris-HCl 或磷酸盐, 优选是 Tris-HCl; 其中所述可溶性盐可以为氯化钠或氯化钾, 优选是氯化钠。

发明人惊奇地发现, 利用本发明的第一试剂, 能够有效地将 DNA 片段的 3'端添加碱基 A, 且所得产物质量好、纯度高, 无需纯化即可有效地用于后续处理例如连接接头。从而, 该第一试剂能够用于本发明的构建 DNA 测序文库的方法中, 以对经过末端修复的 DNA 片段进行处理, 以便获得 3'端添加碱基 A 的 DNA 片段, 其还可以包含在本发明的试剂盒中, 以备发挥同样的作用, 用于构建 DNA 测序文库。

根据本发明的又一方面, 本发明还提供了一种试剂。根据本发明的实施例, 该试剂可以包含: 10mM~200mM 的缓冲盐; 1mM~100mM 的二硫苏糖醇; 10mM~400mM 的 $MgCl_2$; 1mM~40mM 的 ATP; 以及 1U/ml~200U/ml 的 DNA 连接酶, 其中, 该试剂的 pH 为 7.6~7.9。利用该试剂, 能够有效地将接头与 3'端添加碱基 A 的 DNA 片段相连, 所得产物质量好、纯度高, 能够有效地用于后续处理。

根据本发明的实施例, 该试剂中所包含的缓冲盐的类型不受特别限制, 根据本发明的一些具体示例, 缓冲盐可以为选自 Tris-HCl 和磷酸盐的至少一种, 优选为 Tris-HCl。根据本发明的一些实施例, 该试剂中缓冲盐的浓度可以为 10mM~200mM, 根据本发明的具体示例, 优选为 50mM~150mM, 更优选为 100mM。

根据本发明的一些实施例, 该试剂中可以包含 10mM~90mM 的二硫苏糖醇, 根据具体示例, 优选包含 50mM 的二硫苏糖醇。

根据本发明的一些实施例, 该试剂中可以包含 50mM~200mM 的 $MgCl_2$, 根据具体示例, 优选包含 100mM 的 $MgCl_2$ 。

根据本发明的一些实施例, 该试剂中可以包含 5mM~20mM 的 ATP, 根据具体示例, 优选包含 10mM 的 ATP。

根据本发明的一些实施例, 该试剂中可以包含 50U/ml~150U/ml 的 DNA 连接酶, 根据具体示例, 优选包含 72U/ml 的 DNA 连接酶。

根据本发明的一个实施例, 该试剂的 pH 为 7.6。

具体地, 根据本发明的实施例, 本发明的第二试剂, 其 pH 可以为 7.6~7.9, 优选 7.6, 溶剂是水, 溶质可以为如下终浓度物质的混合物: 10~200mM, 优选 50~150mM, 更优选 100 mM 的缓冲盐; 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 ; 1 U/ml ~200 U/ml, 优选 50 U/ml ~150 U/ml, 更优选 72 U/ml 的 DNA 连接酶。其中缓冲盐可以为 Tris-HCl 或磷酸盐, 优选是 Tris-HCl。

发明人惊奇地发现, 利用本发明的第二试剂, 能够有效地将接头与 3'端添加碱基 A 的 DNA 片段相连, 且所得产物质量好、纯度高, 能够有效地用于后续处理。从而, 该第二试剂能够用于本发明的构建 DNA 测序文库的方法中, 以将 3'端添加碱基 A 的 DNA 片段与接头进行连接, 以便获得连接产物, 其还可以包含在本发明的试剂盒中, 以备发挥同样的作用, 用于构建 DNA 测序文库。

DNA 测序文库及其构建方法、试剂盒

根据本发明的再一方面, 本发明提供了一种构建 DNA 测序文库的方法。根据本发明的实施例, 参照图 3, 该方法可以包含以下步骤:

首先, 将 DNA 片段化, 以便获得 DNA 片段。根据本发明的实施例, 将 DNA 片段化的方法不受特别限制。根据本发明的具体示例, 可以通过选自超声打断法和酶切处理的至少一种进行, 其中, 超声打断法可以利用 Covaris 超声打断仪进行。根据本发明的具体示例, DNA 片段的长度可以为 200-800bp。

其次, 将 DNA 片段进行末端修复, 以便获得经过末端修复的 DNA 片段。根据本发明的实施例, 将 DNA 片段进行末端修复的方法不受特别限制。根据本发明的具体示例, 可以利用 Klenow 片段、T4 DNA 聚合酶和 T4 多聚核苷酸激酶进行末端修复, 其中, Klenow 片段具有 5'→3'聚合酶活性和 3'→5'聚合酶活性, 但缺少 5'→3'外切酶活性。

接着, 使用根据本发明实施例的第一试剂, 对经过末端修复的 DNA 片段进行处理, 以便获得 3'端添加碱基 A 的 DNA 片段。根据本发明的具体示例, 使用根据本发明实施例的第一试剂, 对经过末端修复的 DNA 片段进行处理可以在 12℃~40℃下进行。根据本发明的一些实施例, 优选在 37℃下进行该处理。

接下来, 使用根据本发明实施例的第二试剂, 将 3'端添加碱基 A 的 DNA 片段与接头进行连接, 以便获得连接产物。根据本发明的一些具体示例, 该接头包含第一链和第二链, 其中, 第一链为: 5-Phos/TACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTAACCAG; 第二链为: 5-Phos/TTGGTTAGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC。根据本发明的具体示例, 使用根据本发明实施例的第二试剂, 将所述 3'端添加碱基 A 的 DNA 片段与接头进行连接可以在 4℃~22℃下进行。根据本发明的一些实施例, 优选在 16℃下进行该处理。发明人惊奇地发现, 通过利用第一试剂和第二试剂, 可以在完成 3'端添加碱基 A 后, 不需要进行纯化回收, 就能够直接进行连接反应。由此, 可以显著提高制备测序文库的效率, 进而提高后续测序以及分析的效率, 避免核酸样本的损失。

然后，将连接产物进行片段选择，以便获得目的片段。根据本发明的实施例，将连接产物进行片段选择的方法不受特别限制。根据本发明的具体示例，可以利用琼脂糖凝胶电泳对连接产物进行片段选择。根据本发明的实施例，目的片段的长度可以为 100-1000bp。根据本发明的具体示例，优选目的片段的长度为 200-800bp。

接着，将目的片段进行 PCR 扩增，以便获得扩增产物。根据本发明的实施例，使用第一 PCR 引物和第二 PCR 引物，将目的片段进行 PCR 扩增，其中，第一 PCR 引物的序列为：5'CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATAAGCAATGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT，第二 PCR 引物的序列为：5'AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT。

最后，分离纯化扩增产物，该扩增产物构成所述 DNA 测序文库。根据本发明的实施例，分离纯化扩增产物的方法不受特别限制。根据本发明的具体示例，利用 2%琼脂糖凝胶电泳进行。

利用根据本发明的实施例的构建 DNA 测序文库的方法，能够方便高效地构建样品的 DNA 测序文库，所得文库质量好，能够有效地应用于高通量测序平台例如 Illumina 测序平台，且测序结果准确、可重复性好。

具体地，本发明的构建 DNA 测序文库的方法可以包括以下步骤：

- (1) 将 DNA 片段化，以便获得 DNA 片段；
- (2) 将 DNA 片段进行末端修复，得到平末端 DNA 片段；
- (3) 将平末端 DNA 片段与第一试剂混合，得到 3'端添加碱基 A 的 DNA 片段；
- (4) 将 3'端添加碱基 A 的 DNA 片段与第二试剂以及接头混合，进行反应，然后纯化，得到加接头的 DNA 片段；
- (5) 将加接头的 DNA 片段进行片段选择，以便获得目的片段；
- (6) 将目的片段进行 PCR 扩增，并分离纯化扩增产物，该扩增产物构成 DNA 测序文库。

其中步骤(3)中的第一试剂，其 pH 可以为 7.6~7.9，优选 7.9，溶剂是水，溶质可以为如下终浓度物质：10 mM~100mM，优选 25mM~75mM，更优选 50mM 的可溶性盐；10~300mM，优选 50~200mM，更优选 100mM 的 $MgCl_2$ ；10mM~1000mM，优选 50 mM~500mM，更优选 100mM 的缓冲盐；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，1 U/ml~40 U/ml，优选 10 U/ml~30 U/ml，更优选 20 U/ml 的 Klenow(3'-5' exo)酶。

其中步骤(4)中的第二试剂，其 pH 可以为 7.6~7.9，优选 7.6，溶剂是水，溶质可以

为如下终浓度物质: 10~200mM, 优选 50~150mM, 更优选 100 mM 的缓冲盐; 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 $MgCl_2$; 1 U/ml ~200 U/ml, 优选 50 U/ml ~150 U/ml, 更优选 72 U/ml 的 DNA 连接酶。

根据本发明的实施例, 该方法可以进一步包括步骤(7): 对步骤(6)所得到的 DNA 测序文库的文库浓度及片段大小进行检测, 优选地, 利用 Agilent Bioanalyzer 2100 和 Q-PCR DNA 对 DNA 测序文库进行检测。

根据本发明的实施例, 该方法还可以进一步包括步骤(8): 对 DNA 测序文库进行测序, 优选地, 利用 Illumina 测序平台进行测序。

根据本发明的实施例, 在步骤(1)中, 可以利用超声波或者酶切的方式将 DNA 片段化。根据本发明的一些实施例, 步骤(1)中的 DNA 片段的长度可以为 200 bp~800 bp。根据本发明的具体示例, 任选地, 在进行步骤(2)之前可以进一步包括对 DNA 片段进行纯化的步骤。

根据本发明的实施例, 在步骤(2)中, 可以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进行反应, 以形成平末端的 DNA 片段。根据本发明的一些实施例, 任选地, 在进行步骤(3)之前可以进一步包括将平末端 DNA 片段进行纯化的步骤。

根据本发明的实施例, 在步骤(3)中, 第一试剂中的缓冲盐可以为 Tris-HCl 或磷酸盐, 优选是 Tris-HCl。根据本发明的一些实施例, 在步骤(3)中, 第一试剂中的可溶性盐可以为氯化钠或氯化钾, 优选是氯化钠。根据本发明的具体示例, 在步骤(3)中, 将平末端 DNA 片段与第一试剂混合后, 可以在 12℃~40℃ 的温度下进行孵育, 优选的温度为 37℃。

根据本发明的实施例, 在步骤(4)中, 接头可以为带有 T 碱基末端的任意接头, 优选地, 接头包含如下的第一链和第二链:

第一链为:

5-Phos/TACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTAACCAA;

第二链为:

5-Phos/TTGGTTAGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC。

根据本发明的实施例, 在步骤(4)中, 第二试剂中的缓冲盐可以为 Tris-HCl 或磷酸盐, 优选是 Tris-HCl。根据本发明的一些实施例, 在步骤(4)中, 将 3'端添加碱基 A 的 DNA 片段与第二试剂混合后, 可以在 4℃~22℃ 的温度下进行孵育, 优选的温度为 16

℃。

根据本发明的实施例，在步骤(5)中，可以通过如下方法将加接头的 DNA 片段进行片段选择：将加接头的 DNA 片段进行琼脂糖凝胶电泳，然后切胶回收目的片段。根据本发明的一些实施例，目的片段的长度可以为 100 - 1000bp，例如可以为 200、400bp 和 800bp。

根据本发明的实施例，在步骤(6)中，PCR 扩增所使用的引物为：

第一 PCR 引物：

5'CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATAAGCAATGGTGACTGGAGTTCAGACGT
GTGCTCTTCCGATCT；

第二 PCR 引物：

5'AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCC
GATCT。

根据本发明的另一方面，本发明提供了一种 DNA 测序文库，其是通过上述根据本发明实施例的构建 DNA 测序文库的方法构建的。发明人发现，该 DNA 测序文库纯度高、质量好，并且能够有效地应用于高通量测序平台，且测序结果准确、可重复性好。而针对小片段 DNA 构建的 DNA 测序文库，同样能够有效地应用于后续的测序等处理。

根据本发明的再一方面，本发明还提供了一种用于构建 DNA 测序文库的试剂盒。根据本发明的实施例，该试剂盒可以包含：第一试剂；以及第二试剂。其中，第一试剂和第二试剂均为前面所述的根据本发明实施例的第一试剂和第二试剂。简言之，第一试剂可以包含：10mM~1000mM 的缓冲盐；10mM~100mM 的可溶性盐；10mM~300mM 的 $MgCl_2$ ；1mM~50mM 的二硫苏糖醇；1mM~10mM 的 dATP；以及 1U/ml~40U/ml 的 Klenow 片段 (3' → 5' exo)，其中，该试剂的 pH 为 7.6~7.9。第二试剂可以包含：10mM~200mM 的缓冲盐；1mM~100mM 的二硫苏糖醇；10mM~400mM 的 $MgCl_2$ ；1mM~40mM 的 ATP；以及 1U/ml~200U/ml 的 DNA 连接酶，其中，该试剂的 pH 为 7.6~7.9。关于该第一试剂和第二试剂的其他特征和优点在前面已经进行了详细描述，不再赘述。

根据本发明的实施例，第一试剂和第二试剂可以分别设置在不同的容器中。由此，利用该试剂盒，能够方便有效地构建 DNA 测序文库，并且可重复性好，获得的文库质量好，从而能够有效地应用于高通量测序平台例如 Illumina 测序平台。当然，本领域技术人员能够理解，试剂盒中还可以包含其他用于构建 DNA 测序文库的常规组件，在此不再赘述。

确定 DNA 样品的序列信息的方法

根据本发明的又一方面，本发明提供了一种确定 DNA 样品的序列信息的方法。根据本

发明的实施例,该方法可以包括下列步骤:根据本发明实施例的构建 DNA 测序文库的方法,构建 DNA 样品的 DNA 测序文库;以及对该 DNA 测序文库进行测序,以便确定 DNA 样品的序列信息。根据本发明的一些实施例,对 DNA 测序文库进行测序前,可以进一步包括利用 Agilent Bioanalyzer 2100 和 Q-PCR 的至少一种对 DNA 测序文库进行检测。根据本发明的具体示例,可以利用 Illumina 测序平台进行测序。利用该方法能够方便有效地确定 DNA 样品的序列信息,并且操作简便、需时少、效率高、结果准确、可重复性好。

需要说明的是,根据本发明实施例的确定 DNA 样品的序列信息的方法是本发明的发明人经过艰苦的创造性劳动和优化工作才完成的。

下面将结合实施例对本发明的方案进行解释。本领域技术人员将会理解,下面的实施例仅用于说明本发明,而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件的,按照本领域内的文献所描述的技术或条件(例如参考 J.萨姆布鲁克等著,黄培堂等译的《分子克隆实验指南》,第三版,科学出版社)或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购获得的常规产品,例如可以采购自 Illumina 公司。

实施例 1:

1.1 试剂

10×T4 多聚核苷酸激酶缓冲液 (Enzymatics), dNTP (Enzymatics), T4 DNA 聚合酶 (Enzymatics), T4 多聚核苷酸激酶 (Enzymatics), Klenow 片段 (3'-5'exo) (Enzymatics), Klenow 片段 (Enzymatics), 10×blue 缓冲液 (Enzymatics), 10×DNA 连接酶缓冲液 (Enzymatics), Phusion DNA 聚合酶 (NEB)。

第一试剂: pH 为 7.9, 溶剂是水, 溶质为如下终浓度物质: 50mM 氯化钠 (国药集团化学试剂有限公司), 100 mM Tris-HCl (国药集团化学试剂有限公司), 100 mM MgCl₂ (国药集团化学试剂有限公司), 10mM 二硫苏糖醇(Sigma), 5mM dATP (Enzymatics), 20 U/ml Klenow 片段 (3'-5'exo)。

第二试剂: pH 为 7.6, 溶剂是水, 溶质为如下终浓度物质: 72 U/ml T4 DNA 聚合酶, 10 mM ATP, 500 mM Tris-HCl, 100mM MgCl₂, 50 mM 二硫苏糖醇。

1.2 实验步骤

将两份 50 ng/μl 的 Fosmid 样品 (深圳华大基因研究院) 各吸取 40 μl 分别置于 Covaris 样品管 (Covaris 公司) 中, 分别命名为样品 X 和样品 Y, 然后按下列步骤进行实验。

1.2.1 片段化

利用 Covaris 公司生产 E210 型号打断仪, 将样品 X 和样品 Y 的 DNA 进行片段化, 以

便获得 DNA 片段，其中打断仪的参数设置如下：

负载比	强度	循环/脉冲	时间(秒)
20%	5	200	160

1.2.2 纯化 DNA 片段

根据生产商的说明书，利用 Agencourt 公司的 Ampure 磁珠分别对样品 X 和样品 Y 的 DNA 片段进行纯化、回收，以便获得纯化产物，然后将 2 种样品的纯化产物分别溶于 45 μ l 超纯水中，各取 42 μ l 分别置于 2 个 PCR 管中，备用。

1.2.3 末端修复

按照下表中的配比分别准备样品 X 和样品 Y 的末端修复反应体系：

纯化产物	42 μ l
10 $\times$ T4 多聚核苷酸激酶缓冲液	5 μ l
dNTP (25mM)	0.4 μ l
T4 DNA 聚合酶	1.2 μ l
T4 多聚核苷酸激酶	1.2 μ l
Klenow 片段	0.2 μ l
总体积	50 μ l

将准备好的样品 X 和样品 Y 的末端修复反应体系分别置于 PCR 仪上，在 20 $^{\circ}$ C 下放置 30min，以便获得末端修复产物，然后利用 Ampure 磁珠将其纯化并分别溶于 20 μ l 和 32 μ l 的超纯水中，备用。

1.2.4 3'端添加碱基 A

按照下表中的配比分别准备样品 X 和样品 Y 的 3'端添加碱基 A 反应体系：

样品 X 的反应体系

样品 X 的末端修复产物	20 μ l
第一试剂	3 μ l
总体积	23 μ l

样品 Y 的反应体系

样品 Y 的末端修复产物	32 μ l
10 $\times$ blue 缓冲液	5 μ l
Klenow 片段 (3'-5'exo)	3 μ l

1mM dATP	10 μ l
总体积	50 μ l

将准备好的样品 X 和样品 Y 的 3'端添加碱基 A 反应体系，分别置于 15℃~40℃下反应 30min，以便获得 3'端添加碱基 A 的产物，然后，样品 X 的 3'端添加碱基 A 的产物不经纯化，而利用 Ampure 磁珠将样品 Y 的 3'端添加碱基 A 的产物进行纯化并溶于 37 μ l 的超纯水中，备用。

1.2.5 添加接头

按照下表中的配比分别准备样品 X 和样品 Y 的添加接头反应体系：

样品 X 的反应体系

样品 X 的 3'端添加碱基 A 的产物	23 μ l
第二试剂	1 μ l
接头	1 μ l
总体积	25 μ l

样品 Y 的反应体系

样品 Y 的 3'端添加碱基 A 的产物	35 μ l
10 $\times$ DNA 连接酶缓冲液	1.5 μ l
接头	3 μ l
T4 DNA 连接酶	3 μ l
ATP(10mM)	3.5 μ l
ddH ₂ O	4 μ l
总体积	50 μ l

其中，样品 X 和样品 Y 的反应体系中所采用的接头均为包含如下第一链和第二链的双链寡核苷酸：

第一链为：5-Phos/TACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTAACCAA；

第二链为：5-Phos/TTGGTTAGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC。

将准备好的样品 X 和样品 Y 的添加接头反应体系，分别置于 16℃下过夜进行反应 14-18h，以便获得连接产物，然后利用 Ampure 磁珠将其纯化，并利用超纯水溶解洗脱，备用。

1.2.6 PCR 扩增

按照下表中的配比分别准备样品 X 和样品 Y 的 PCR 扩增反应体系：

连接产物	23 μ l
Phusion DNA 聚合酶	25 μ l
第一 PCR 引物	1 μ l
第二 PCR 引物	1 μ l
总体积	50 μ l

其中，第一 PCR 引物：

5'CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAAGCAATGGTGACTGGAGTTCAGACGTGT
GCTCTTCCGATCT;

第二 PCR 引物：

5'AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGA
TCT。

利用准备好的 2 种样品的 PCR 扩增反应体系，于 PCR 仪中进行 PCR 扩增反应，以便获得扩增产物，然后利用 2% 琼脂糖凝胶电泳分别将 2 种样品的扩增产物进行分离，分别切胶回收 400bp 和 800bp 的扩增产物，并分别溶于 30 μ l 的超纯水中，样品 X 的 400bp 和 800bp 扩增产物构成其 DNA 测序文库，样品 Y 的 400bp 和 800bp 扩增产物构成其 DNA 测序文库。

其中，PCR 扩增反应的条件为：

98 $^{\circ}$ C 30s

98 $^{\circ}$ C 15s

65 $^{\circ}$ C 30s

72 $^{\circ}$ C 50s

72 $^{\circ}$ C 5min

4 $^{\circ}$ C ∞

} 10 个循环

由此，本实施例利用根据本发明实施例的构建 DNA 测序文库的方法制备了样品 X 的 DNA 测序文库，利用 Illumina 测序平台提供的构建 DNA 测序文库的方法，构建了样品 Y 的 DNA 测序文库。

1.2.7 Q-PCR 检测

分别将获得的样品 X 和样品 Y 的 DNA 测序文库中 400bp 和 800bp 的扩增产物进行 Q-PCR 检测，结果如下表：

WO 2012/079490	PCT/CN2011/083786			
样品	样品 X 400bp	样品 X 800bp	样品 Y 400bp	样品 Y 800bp
Q-PCR 浓度 (ng/μl)	2.3	1.45	2.38	1.5

由上表可知，相比之下，样品 X 和样品 Y 的 DNA 测序文库中相同长度的扩增产物的浓度没有显著差别，表明利用根据本发明实施例的构建 DNA 测序文库的方法和 Illumina 测序平台提供的构建 DNA 测序文库的方法，构建的样品 DNA 的测序文库没有显著的质量差异。

实施例 2:

2.1 试剂

10×blue 缓冲液 (Enzymatics), pUC18DNA (Takara)。

第一试剂: 同实施例 1 的“第一试剂”。

第二试剂: pH 为 7.6, 溶剂是水, 溶质为如下终浓度物质: T4 DNA 连接酶(Enzymatics), ATP (NEB), 100 mM 缓冲盐, 100 mM MgCl₂ (国药集团化学试剂有限公司), 50 mM 二硫苏糖醇 (Sigma)。

2.2 实验步骤

分别吸取两份以 pUC18DNA (深圳华大基因研究院提供) 为模板扩增的 PCR 产物 (200bp) 各 19.7μl, 置于 2 个 EP 管中, 分别命名为样品 X 和样品 Y, 然后按下列步骤进行实验。

2.2.1 3'端添加碱基 A

按照下表中的配比分别准备样品 X 和样品 Y 的 3'端添加碱基 A 反应体系:

样品 X	19.7μl
第一试剂	3μl
ddH ₂ O	0.3μl
总体积	23μl

将准备好的样品 X 和样品 Y 的 3'端添加碱基 A 反应体系, 分别置于 37℃ 下反应 30min, 以便获得 3'端添加碱基 A 的产物, 然后, 样品 X 的 3'端添加碱基 A 的产物不经纯化, 而利用 QIAquick PCR 纯化试剂盒 (QIAGEN 公司) 将样品 Y 的 3'端添加碱基 A 的产物进行纯化并溶于 16.4μl 的 EB 洗脱液中, 备用。

2.2.2 添加接头

按照下表中的配比分别准备样品 X 和样品 Y 的添加接头反应体系:

样品 X 的反应体系

样品 X 的 3'端添加碱基 A 的产物	23 μ l
第二试剂	1 μ l
接头	1 μ l
总体积	25 μ l

样品 Y 的反应体系

样品 Y 的 3'端添加碱基 A 的产物	14.4 μ l
10 $\times$ DNA 连接酶缓冲液	3 μ l
接头	1.4 μ l
T4 DNA 连接酶	1.2 μ l
ddH ₂ O	10 μ l
总体积	30 μ l

其中，接头的序列同实施例 1。

将准备好的样品 X 和样品 Y 的添加接头反应体系，分别置于 16℃ 下过夜进行反应 18h，以便获得连接产物，然后利用 Ampure 磁珠将其纯化，并利用 30 μ l EB 液溶解洗脱，由此，获得样品 X 和样品 Y 的 DNA 测序文库，即本实施例利用根据本发明实施例的构建 DNA 测序文库的方法制备了样品 X 的 DNA 测序文库，利用 Illumina 测序平台提供的构建 DNA 测序文库的方法，构建了样品 Y 的 DNA 测序文库。

2.2.3 Q-PCR 检测

分别将获得的样品 X 和样品 Y 的 DNA 测序文库进行 Q-PCR 检测，结果如下表：

样品	样品 X	样品 Y
Q-PCR CT 值	4.61	5.01

由上表可知，样品 X 和样品 Y 的 DNA 测序文库的 CT 值没有明显差异，表明利用根据本发明实施例的构建 DNA 测序文库的方法和 Illumina 测序平台提供的构建 DNA 测序文库的方法，构建的样品 DNA 的测序文库的浓度相当。

实施例 3:

3.1 试剂

T4 DNA 连接酶(Rapid, L603-HC-L) (Enzymatics)。

第一试剂：同实施例 1 的“第一试剂”。

第二试剂：pH 为 7.6，溶剂是水，溶质为如下终浓度物质：T4 DNA 连接酶（Takara），10 mM ATP（NEB），500 mM Tris-HCl，100mM MgCl₂（国药集团化学试剂有限公司），50 mM 二硫苏糖醇（Sigma）。

3.2 实验步骤

具体实验方法可参见 Agilent Technologies. Sureselect target enrichment system for illumina paired-end sequencing library. G3360-90020，通过参照将其全文并入本文。

分别吸取两份 50 ng/μl Fosmid 样品（深圳华大基因研究院提供）各 40 μl 置于 2 个 Covaris 样品管中，分别命名为样品 X 和样品 Y，然后按下列步骤进行实验。

3.2.1 片段化

利用 Covaris 公司生产 E210 型号打断仪，将样品 X 和样品 Y 的 DNA 进行片段化，以便获得 DNA 片段，其中打断仪的参数设置如下：

负载比	强度	循环/脉冲	时间(秒)
10%	5	200	360

3.2.2 末端修复

根据安捷伦 SureSelect platform 的操作手册 G3360-90020 中的说明，分别将样品 X 和样品 Y 的 DNA 片段进行末端修复，以便获得末端修复产物。

3.2.2 3'端添加碱基 A

按照下表中的配比分别准备样品 X 和样品 Y 的 3'端添加碱基 A 反应体系：

样品 X 的反应体系

样品 X 的末端修复产物	19.7μl
第一试剂	3μl
ddH ₂ O	0.3μl
总体积	23μl

样品 Y 的反应体系

样品 Y 的末端修复产物	28.1μl
10× blue 缓冲液	5μl
dNTP (25mM)	3.5μl
dATP(稀释至 5 mM, GE 公司)	1.4μl
Klenow 片段 (3'-5'exo)	2.0μl

总体积	35 μ l
-----	------------

将准备好的样品 X 和样品 Y 的 3'端添加碱基 A 反应体系,分别置于 37℃ 下反应 30min,以便获得 3'端添加碱基 A 的产物,然后,样品 X 的 3'端添加碱基 A 的产物不经纯化,而将样品 Y 的 3'端添加碱基 A 的产物经过柱纯化后溶于 37 μ l EB 洗脱液中,备用。

3.2.3 添加接头

样品 X 的反应体系

样品 X 的 3'端添加碱基 A 的产物	23 μ l
第二试剂	12 μ l
接头	3 μ l
总体积	25 μ l

样品 Y 的反应体系

样品 Y 的 3'端添加碱基 A 的产物	35 μ l
10 $\times$ DNA 连接酶缓冲液	1.5 μ l
接头	3 μ l
T4 DNA 连接酶(Rapid, L603-HC-L)	3 μ l
ATP(10mM)	3.5 μ l
ddH ₂ O	4 μ l
总体积	50 μ l

其中,接头的序列同实施例 1。

按照上表中的配比分别准备样品 X 和样品 Y 的添加接头反应体系,然后将准备好的样品 X 和样品 Y 的添加接头反应体系,分别置于 16℃ 下过夜进行反应 18h,以便获得连接产物,备用。

3.2.4 PCR 扩增,

按照实施例 1 中 1.2.6 项所示的方法,分别将样品 X 和样品 Y 的连接产物配制成 PCR 扩增反应体系,然后分别将样品 X 和样品 Y 的 PCR 扩增反应体系于 PCR 仪中进行 PCR 扩增反应,以便获得扩增产物,然后利用 2% 琼脂糖凝胶电泳分别将 2 种样品的扩增产物进行分离,切胶回收 200bp 的扩增产物,分别溶于 30 μ l 的超纯水中,由此,获得样品 X 的 DNA 测序文库和样品 Y 的 DNA 测序文库。

3.2.5 Q-PCR 检测

分别将获得的样品 X 和样品 Y 的 DNA 测序文库进行 Q-PCR 检测，结果如下表：

样品	样品 X	样品 Y
Q-PCR CT 值	14.86	14.75

由上表可知，样品 X 和样品 Y 的 DNA 测序文库的 CT 值没有显著差别，表明利用根据本发明实施例的构建 DNA 测序文库的方法和 Illumina 测序平台提供的构建 DNA 测序文库的方法，构建的样品 DNA 的测序文库的浓度相当。

工业实用性

本发明的两种试剂、构建 DNA 测序文库的方法、DNA 测序文库、确定 DNA 样品的序列信息的方法以及用于构建 DNA 测序文库的试剂盒，能够有效地应用于样品 DNA 的 DNA 测序文库的构建以及测序，并且获得的文库质量好，测序结果准确。

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。

在本说明书的描述中，参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示意性实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中，对上述术语的示意性表述不一定指的是相同的实施例或示例。而且，描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任何的一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。

权利要求书

1、一种试剂，其特征在于，包含：缓冲盐、二硫苏糖醇、 MgCl_2 。

2、根据权利要求1所述的试剂，其特征在于，包含：

10mM~1000mM 的缓冲盐；

10mM~100mM 的可溶性盐；

10mM~300mM 的 MgCl_2 ；

1mM~50mM 的二硫苏糖醇；

1mM~10mM 的 dATP；以及

1U/ml~40U/ml 的 Klenow 片段 (3'→5' exo)，

其中，

所述试剂的 pH 为 7.6~7.9。

3、根据权利要求2所述的试剂，其特征在于，包含 50mM~500mM 的缓冲盐。

4、根据权利要求2所述的试剂，其特征在于，包含 100mM 的缓冲盐。

5、根据权利要求2所述的试剂，其特征在于，包含 25mM~75mM 的可溶性盐。

6、根据权利要求2所述的试剂，其特征在于，包含 50mM 的可溶性盐。

7、根据权利要求2所述的试剂，其特征在于，包含 50mM~200mM 的 MgCl_2 。

8、根据权利要求2所述的试剂，其特征在于，包含 100mM 的 MgCl_2 。

9、根据权利要求2所述的试剂，其特征在于，包含 2.5mM~7.5mM 的 dATP。

10、根据权利要求2所述的试剂，其特征在于，包含 5mM 的 dATP。

11、根据权利要求2所述的试剂，其特征在于，包含 10U/ml~30U/ml 的 Klenow 片段 (3'→5' exo)。

12、根据权利要求2所述的试剂，其特征在于，包含 20U/ml 的 Klenow 片段 (3'→5' exo)。

13、根据权利要求2所述的试剂，其特征在于，所述试剂的 pH 为 7.9。

14、根据权利要求2所述的试剂，其特征在于，所述缓冲盐为选自 Tris-HCl 和磷酸盐的至少一种。

15、根据权利要求2所述的试剂，其特征在于，所述缓冲盐为 Tris-HCl。

16、根据权利要求2所述的试剂，其特征在于，所述可溶性盐为选自氯化钠和氯化钾的至少一种。

17、根据权利要求2所述的试剂，其特征在于，所述可溶性盐为氯化钠。

18、根据权利要求1所述的试剂，其特征在于，包含：

10mM~200mM 的缓冲盐;

1mM~100mM 的二硫苏糖醇;

10mM~400mM 的 $MgCl_2$;

1mM~40mM 的 ATP; 以及

1U/ml~200U/ml 的 DNA 连接酶,

其中,

所述试剂的 pH 为 7.6~7.9。

19、根据权利要求 18 所述的试剂, 其特征在于, 包含 50mM~150mM 的缓冲盐。

20、根据权利要求 18 所述的试剂, 其特征在于, 包含 100mM 的缓冲盐。

21、根据权利要求 18 所述的试剂, 其特征在于, 包含 10mM~90mM 的二硫苏糖醇。

22、根据权利要求 18 所述的试剂, 其特征在于, 包含 50mM 的二硫苏糖醇。

23、根据权利要求 18 所述的试剂, 其特征在于, 包含 50mM~200mM 的 $MgCl_2$ 。

24、根据权利要求 18 所述的试剂, 其特征在于, 包含 100mM 的 $MgCl_2$ 。

25、根据权利要求 18 所述的试剂, 其特征在于, 包含 5mM~20mM 的 ATP。

26、根据权利要求 18 所述的试剂, 其特征在于, 包含 10mM 的 ATP。

27、根据权利要求 18 所述的试剂, 其特征在于, 包含 50U/ml~150U/ml 的 DNA 连接酶。

28、根据权利要求 18 所述的试剂, 其特征在于, 包含 72U/ml 的 DNA 连接酶。

29、根据权利要求 18 所述的试剂, 其特征在于, 所述试剂的 pH 为 7.6。

30、根据权利要求 18 所述的试剂, 其特征在于, 所述缓冲盐为选自 Tris-HCl 和磷酸盐的至少一种。

31、根据权利要求 18 所述的试剂, 其特征在于, 所述缓冲盐为 Tris-HCl。

32、一种构建 DNA 测序文库的方法, 其特征在于, 包含以下步骤:

将 DNA 片段化, 以便获得 DNA 片段;

将所述 DNA 片段进行末端修复, 以便获得经过末端修复的 DNA 片段;

使用权利要求 1-17 任一项所述的试剂, 对所述经过末端修复的 DNA 片段进行处理, 以便获得 3'端添加碱基 A 的 DNA 片段;

使用权利要求 18-31 任一项所述的试剂, 将所述 3'端添加碱基 A 的 DNA 片段与接头进行连接, 以便获得连接产物;

将所述连接产物进行片段选择, 以便获得目的片段;

将所述目的片段进行 PCR 扩增, 以便获得扩增产物; 以及

分离纯化所述扩增产物，所述扩增产物构成所述 DNA 测序文库。

33、根据权利要求 32 所述的方法，其特征在于，所述片段化是通过选自超声打断法和酶切处理的至少一种进行的。

34、根据权利要求 33 所述的方法，其特征在于，所述超声打断法是利用 Covaris 超声打断仪进行的。

35、根据权利要求 32 所述的方法，其特征在于，所述 DNA 片段的长度为 200-800bp。

36、根据权利要求 32 所述的方法，其特征在于，使用权利要求 1-16 任一项所述的试剂，对所述经过末端修复的 DNA 片段进行处理是在 12℃~40℃下进行的。

37、根据权利要求 32 所述的方法，其特征在于，使用权利要求 1-16 任一项所述的试剂，对所述经过末端修复的 DNA 片段进行处理是在 37℃下进行的。

38、根据权利要求 32 所述的方法，其特征在于，所述接头包含第一链和第二链，其中，所述第一链为：

5-Phos/TACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTAACCAA;

所述第二链为：

5-Phos/TTGGTTAGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC。

39、根据权利要求 32 所述的方法，其特征在于，使用权利要求 17-30 任一项所述的试剂，将所述 3'端添加碱基 A 的 DNA 片段与接头进行连接是在 4℃~22℃下进行的。

40、根据权利要求 32 所述的方法，其特征在于，使用权利要求 17-30 任一项所述的试剂，将所述 3'端添加碱基 A 的 DNA 片段与接头进行连接是在 16℃下进行的。

41、根据权利要求 32 所述的方法，其特征在于，利用琼脂糖凝胶电泳对所述连接产物进行片段选择。

42、根据权利要求 32 所述的方法，其特征在于，所述目的片段的长度为 100-1000bp。

43、根据权利要求 32 所述的方法，其特征在于，所述目的片段的长度为 200-800bp。

44、根据权利要求 32 所述的方法，其特征在于，使用第一 PCR 引物和第二 PCR 引物，将所述目的片段进行 PCR 扩增，

其中，所述第一 PCR 引物的序列为：

5'CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATAAGCAATGGTGACTGGAGTTCAGACGT
GTGCTCTTCCGATCT

所述第二 PCR 引物的序列为：

5'AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCC
GATCT

45、一种 DNA 测序文库，其是通过根据权利要求 32-44 中任一项所述的方法构建的。

46、一种确定 DNA 样品的序列信息的方法，其特征在于，包括下列步骤：

根据权利要求 32-44 任一项所述的方法，构建所述 DNA 样品的 DNA 测序文库；以及对所述 DNA 测序文库进行测序，以便确定所述 DNA 样品的序列信息。

47、根据权利要求 46 所述的方法，其特征在于，对所述 DNA 测序文库进行测序前，进一步包括利用 Agilent Bioanalyzer 2100 和 Q-PCR 的至少一种对所述 DNA 测序文库进行检测。

48、根据权利要求 46 所述的方法，其特征在于，所述测序是利用 Illumina 测序平台进行的。

49、一种用于构建 DNA 测序文库的试剂盒，其特征在于，包含：

第一试剂，所述第一试剂为权利要求 1-17 任一项所述的试剂；以及

第二试剂，所述第二试剂为权利要求 18-31 任一项所述的试剂。

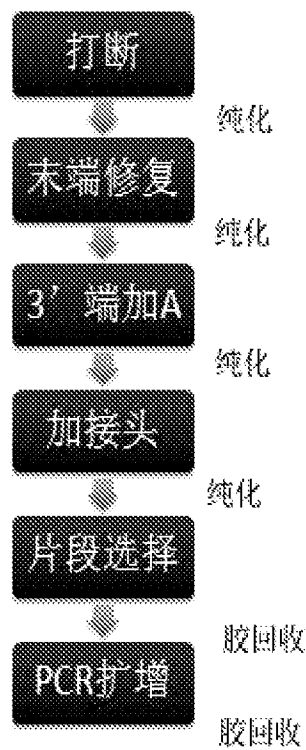


图 1

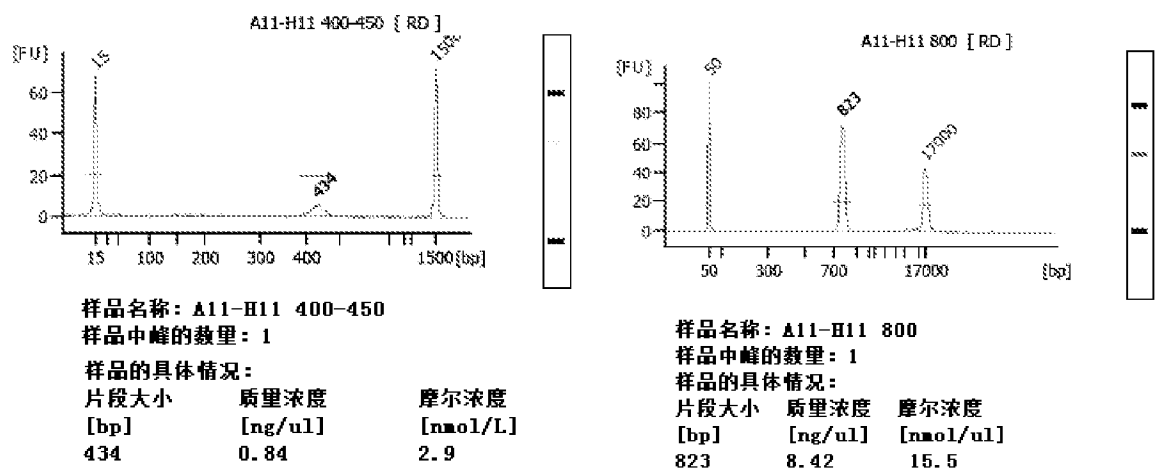


图 2

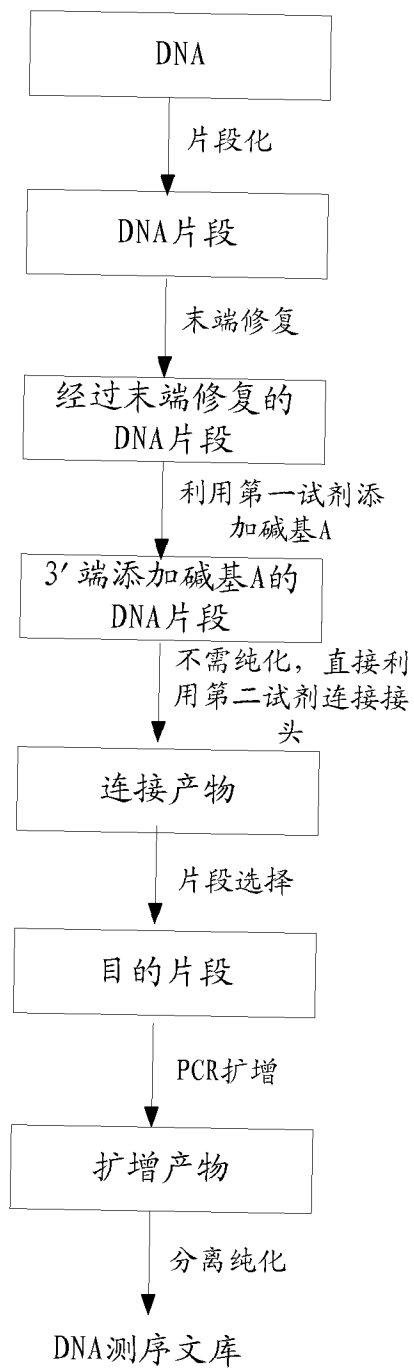


图 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2011/083786

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/68 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC:C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

VEN;CNABS;NCBI;CNKI;ISI-WEB OF KNOWLEDGE;;GOOGLE SCHOLAR: sequencing, linker, adapter, A overhang, A tail, dithiothreitol, DTT, MgCl₂, library, fragment, Tris-HCl, phosphate, buffer, agent, ATP, dATP, klenow

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Salem M et al. Characterization of the rainbow trout transcriptome using Sanger and 454-pyrosequencing approaches. BMC Genomics.Oct.2010,11:564, page 1-10 See the whole document, especially page 8-9	1-37,39-43,45-49
X	WO2010/085774A1 (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 29.Jul.2010 (29.07.2010) See the whole document, especially the embodiment II	1-17

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&”document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
08.Mar.2012 (08.03.2012)

Date of mailing of the international search report
22.Mar.2012 (22.03.2012)

Name and mailing address of the ISA
State Intellectual Property Office of the P. R. China
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao
Haidian District, Beijing 100088, China
Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer
TIAN, Yuan
Telephone No. (86-10)62411047

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2011/083786

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN101845500A(SUZHOU ZHONGXIN BIOTECHNOLOGY CO.,LTD) 29.Sep.2010 (29.09.2010) See the embodiments	1-49
A	Rosalind Williams-Carrier et al. Use of Illumina sequencing to identify transposon insertions underlying mutant phenotypes in high-copy mutator lines of maize. Plant J. May 2010, vol.63, no.1, page 167-177 See the whole document	1-49

International application No.
PCT/CN2011/083786

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2009)

A. 主题的分类

C12Q1/68 (2006.01) i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: C12Q

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

VEN; CNABS; NCBI; CNKI; ISI-WEB OF KNOWLEDGE; GOOGLE SCHOLAR; 测序, 接头, 衔接子, 加 A, 二硫苏糖醇, 氯化镁, 文库, 片段, Tris-Hcl, 磷酸盐, 缓冲液, 试剂, MgCl₂, ATP, dATP, klenow, fragment, sequencing, adapter, A overhang, A tail, DTT, library, dithiothreitol, phosphate, buffer, agent

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	Salem M 等. Characterization of the rainbow trout transcriptome using Sanger and 454-pyrosequencing approaches. BMC Genomics.10 月 2010, 11: 564, 第 1-10 页 参见全文, 特别是第 8-9 页	1-37, 39-43, 45-49
X	WO2010/085774 A1(BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 29.7 月 2010(29.07.2010) 参见全文, 特别是实施例 II	1-17

☒ 其余文件在 C 栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期
08.3 月 2012 (08.03.2012)

国际检索报告邮寄日期
22.3 月 2012 (22.03.2012)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:
中华人民共和国国家知识产权局
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088
传真号: (86-10)62019451

受权官员

田园

电话号码: (86-10) 62411047

C(续). 相关文件		
类 型	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN101845500A(苏州众信生物技术有限公司) 29.9 月 2010 (29.09.2010) 参见具体实施方式	1-49
A	Rosalind Williams-Carrier等.Use of Illumina sequencing to identify transposon insertions underlying mutant phenotypes in high-copy Mutator lines of maize. Plant J. 5月2010, 第63卷, 第1 期, 第167-177页 参见全文	1-49

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2011/083786

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
WO2010/085774 A1	29.07.2010	无	
CN101845500A	29.09.2010	无	