



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107488656 A

(43)申请公布日 2017. 12. 19

(21)申请号 201610420179.5

(22)申请日 2016.06.13

(71)申请人 陆欣华

地址 200438 上海市杨浦区政悦路500弄56号101室

(72)发明人 陆欣华

(74)专利代理机构 南京苏科专利代理有限责任公司 32102

代理人 姚姣阳

(51) Int. Cl.

C12N 15/10(2006.01)

G40B 50/06(2006.01)

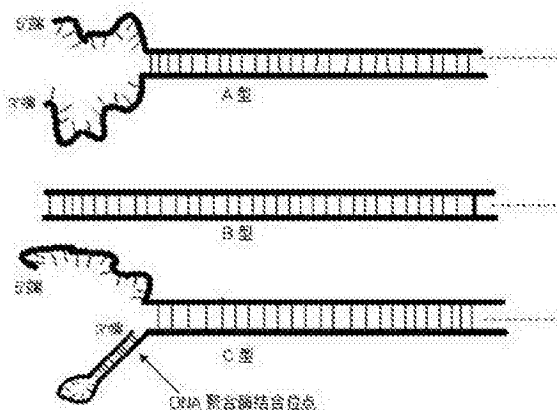
权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54)发明名称

一种核酸等温自扩增方法

(57)摘要

本发明提供了一种核酸等温自扩增方法,所述方法通过在目标模板两端添加合适的回文互补序列,自身自发形成茎环结构;及提供反应所需的试剂和条件进行自扩增,所述自扩增方法中不需要添加额外扩增引物;所述试剂包括具有链置换活性的DNA聚合酶。通过PCR或者连接酶等方法,在DNA末端引入合适的回文互补序列后,可以不依赖于外源扩增引物进行扩增;扩增温度恒定,不需要复杂的温控设备,扩增快速;扩增产物是连续互补序列的长单链DNA,可以应用于特殊场合;扩增没有GC偏好性。



1. 一种核酸等温自扩增方法,其特征在于:包括如下步骤,

a、在目标模板两端添加所需序列的DNA接头;

c、提供反应所需的试剂和条件;

所述所需序列的DNA接头为具有自发形成自身茎环结构的线性核酸片段,所述自扩增方法中不需要添加额外扩增引物;

所述试剂包括具有链置换活性的DNA聚合酶。

2. 根据权利要求1所述的一种核酸等温自扩增方法,其特征在于:所述DNA聚合酶为Bst酶,或者其他DNA聚合酶。

3. 根据权利要求1所述的一种核酸等温自扩增方法,其特征在于:所述目标模板两端添加的DNA接头为具有回文互补序列的线性核酸片段,能够自发形成自身茎环结构,从而触发DNA聚合酶进行延伸扩增。

4. 根据权利要求1所述的一种核酸等温自扩增方法,其特征在于:所述扩增方法的产物为折叠互补单链DNA。

5. 一种核酸等温自扩增方法的应用,其特征在于:所述方法可用于二代测序文库的建立,所述文库建立方法通过将基因组DNA长链打断成小片段,在片段两端连接上含有适合序列的接头,进行循环扩增;或者通过转座子,crispr/cas9系统等选择性的插入接头片段,进行选择性的扩增。

一种核酸等温自扩增方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种核酸等温自扩增方法,属于核酸扩增技术领域。

背景技术

[0002] 近几十年来,核酸扩增技术为分子生物研究和病原微生物检测做出了革命性的贡献。

[0003] 等温扩增技术(Isothermal Amplification Technology)是核酸体外扩增技术,其反应过程始终维持在恒定的温度下,通过添加不同活性的酶和各自特异性引物来达到快速核酸扩增的目的。常见的等温扩增技术有以下几种:环介导核酸等温扩增技术(LAMP);滚环扩增技术RCA;单引物等温扩增SPIA;依赖解旋酶的等温扩增技术HAD;链替代扩增SDA;但现有的方法由于链置换活性的DNA聚合酶在引物存在的情况下,普遍容易产生非特异性扩增。

[0004] 而在二代测序领域中,例如二代测序文库建库过程中,经常需要通过PCR扩增来富集样本,但现有的方法中,由于PCR扩增效率受模版GC含量影响,容易导致扩增产物均一性不好,在影响覆盖度的同时也会产生非特异性扩增产物。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于解决上述问题,提出一种核酸等温自扩增的方法。

[0006] 本发明的目的通过以下技术方案来实现:

[0007] 一种核酸等温自扩增方法,包括如下步骤,

[0008] a、在目标模板两端添加所需序列的DNA接头;

[0009] c、提供反应所需的试剂和条件;

[0010] 所述所需序列的DNA接头为具有自发形成自身茎环结构的线性核酸片段,所述自扩增方法中不需要添加额外扩增引物;

[0011] 所述试剂包括具有链置换活性的DNA聚合酶。

[0012] 优选地,所述DNA聚合酶为Bst酶,或者其他DNA聚合酶。

[0013] 优选地,所述目标模板两端添加的DNA接头为具有回文互补序列的线性核酸片段,能够自发形成自身茎环结构,从而触发DNA聚合酶进行延伸扩增。

[0014] 优选地,所述扩增方法的产物为折叠互补单链DNA。

[0015] 一种核酸等温自扩增方法的应用,所述方法可用于二代测序文库的建立,所述文库建立方法通过将基因组DNA长链打断成小片段,在片段两端连接上含有适合序列的接头,进行循环扩增;或者通过转座子,crispr/cas9系统等选择性的插入接头片段,进行选择性扩增。

[0016] 本发明的有益效果主要体现在:

[0017] 在等温情况下,可以对目的片段快速有效扩增;

[0018] 在DNA末端引入合适的回文互补序列后,可以不依赖于引物进行扩增;

[0019] 扩增产物是连续互补序列的长单链DNA,可以应用于特殊场合。

[0020] 扩增没有GC偏好性。

附图说明

[0021] 下面结合附图对本发明技术方案作进一步说明:

[0022] 图1:DNA双链末端的呼吸机制和构象转换过程示意图。

[0023] 图2:DNA双链末端(3'和5'端)均有适合自扩增序列的情况下,自扩增的过程示意图。

[0024] 图3:在目的基因末端添加合适序列的过程示意图。

[0025] 图4:采用非特异性扩增法在目的基因末端添加合适序列的过程示意图。

[0026] 图5:二代测序文库构建过程中的序列结构变化示意图。

具体实施方式

[0027] 本发明揭示了一种核酸等温自扩增方法,所述扩增方法的产物为折叠互补单链DNA。

[0028] 包括如下步骤,

[0029] 一种核酸等温自扩增方法,包括如下步骤,

[0030] a、在目标模板两端添加所需序列的DNA接头;

[0031] c、提供反应所需的试剂和条件;

[0032] 所述所需序列的DNA接头为具有自发形成自身茎环结构的线性核酸片段,所述自扩增方法中不需要添加额外扩增引物;

[0033] 具体的,所述目标模板两端添加的DNA接头为具有回文互补序列的线性核酸片段,能够自发形成自身茎环结构,从而触发DNA聚合酶进行延伸扩增。

[0034] 所述目标模板通过PCR,连接酶,体外转座子系统,在DNA线性末端添加合适的回文互补序列,从而能够形成自身茎环结构。

[0035] 本发明中所述自扩增方法中不需要添加额外扩增引物;所述扩增方法的产物为折叠互补单链DNA。

[0036] 所述试剂包括具有链置换活性的DNA聚合酶,或者其他DNA聚合酶。

[0037] 所述DNA聚合酶为以Bst酶。Bst酶对扩增没有GC偏好,使得扩增产物具有更好的均一性。

[0038] 一种核酸等温自扩增方法的应用,所述方法可用于二代测序文库的建立,包括如下步骤,将DNA片段化后,通过连接酶反应,在DNA两端添加适合自扩增的序列;或者通过转座子,crispr/cas9系统等选择性的插入片段,最终在DNA片段末端连接有适合自扩增的序列,进行等温自扩增。

[0039] 以下具体阐述下本发明的自扩增原理:

[0040] 根据DNA呼吸机制,双链DNA末端处在解链成游离单链和配对互补成双链的动态平衡中,温度升高,呼吸作用加剧,末端双链解开越显著。此时外源的匹配引物可以直接入侵和DNA其中的一条链结合,在具有链置换活性的DNA聚合酶作用下,延伸扩增(Isothermal amplification method for next-generation sequencing 14320-14323|PNAS|August

27, 2013 | vol. 110 | no. 35)

[0041] 本发明首先通过PCR或者接头连接, DNA定向重组等技术, 在目的基因片段末端引入特殊的DNA序列。这段序列是一段回文序列, 可以自身配对, 形成茎环结构, 从而利用DNA呼吸现象, 不需要再添加外源引物, 3'端在具有链置换活性的DNA聚合酶作用下, 可以直接以自身为模版进行延伸扩增, 第一轮扩增完成后, 新的3'端和原5'端序列互补, 同样可以形成回文序列, 自身互补配对, 进行新一轮延伸扩增, 新的3'端仍然和原5'端序列互补, 循环扩增。DNA双链的每条单链同时进行类似反应, 最后产物是两条多重复的互补DNA单链。

[0042] DNA双链中的互补碱基是通过氢键连接的, 由于A(腺嘌呤)与T(胸腺嘧啶)中有两个氢键, G(鸟嘌呤)与C(胞嘧啶)中有三个氢键, 所以GC对比AT更不易打开。在DNA呼吸现象中, 要形成3'端的发夹结构构象, 和DNA完全互补的构象相比, 不仅末端配对碱基更少, 还有环状部分由于空间结构的原因不能配对结合。所以为了增加3'端成功形成发夹结构的概率, 可以在末端序列中增加AT含量, 使游离出来的单链长度增加, 同时采用短重复序列, 比如, TA重复或者TAA, TTAA等重复序列, 使配对结合更容易发生。

[0043] 等温自扩增过程中, 一旦在目的片段末端引入合适的序列, 即使移除引物后, 仍然可以进行自我扩增, 而且在扩增的过程中, 扩增产物是连续互补的序列, 由于空间上的近距离效应, 可以迅速配对形成双链结构, 几乎没有裸露的单链DNA暴露在外, 基本消除非特异性扩增。在高通量测序中, 比如单细胞测序, 利用等温自扩增, 和PCR方法相比, 不仅可以消除GC偏好, 而且可以有更好的均一性。

[0044] 等温自扩增的终产物是连续互补序列的单链DNA, 一方面可以通过酶切等手段, 转换成短片段, 另外一方面这种长重复片段, 可以应用在特殊场合, 比如测序等。如图5所示, 二代测序文库构建。基因组DNA是长序列的, 通过机械剪切(比如添加磁珠震荡), 或者酶切等技术, 打断成小片段, 约几百bp长度, 然后连接酶作用, 在末端添加接头序列, 其中包含适合自扩增的序列, 然后等温自扩增。扩增过程没有使用扩增引物, 也没有双链完全打开的步骤, 所以和PCR方法相比, 产物具有更好的均一性和没有GC偏好性。

[0045] 以下结合附图具体阐述本发明通过不同的方法产生茎环结构以适用自扩增反应。

[0046] 如图1所示, DNA双链末端的呼吸机制和构象转换。线性完全互补的DNA双链(B型), 生理条件下, 末端双链打开成游离状态(A型), 两种状态互相转换动态平衡。在高温或其他条件下, 呼吸强烈, 当末端序列自身互补的时候, 会产生茎环结构(C型), 出现DNA聚合酶的结合位点, 触发扩增反应

[0047] 如图2所示, DNA双链末端(3'和5'端)均有适合自扩增序列的情况下, 自扩增的过程。第一步, 双链线性DNA; 第二步, 3'端呈现发夹结构, 具有链置换活性的DNA聚合酶结合, 发生链置换反应; 第三步, 完成对自身的扩增, 反义链被置换下来(反义链也同步反应), 拷贝数增加一倍, 新产生的3'端都是以5'端为模版, 仍然可以呈现发夹结构; 第四步, 循环扩增N轮。第五步, 循环扩增后产物是一条长单链DNA, 拷贝数为2的N次方。

[0048] 如图3所示, 采用PCR方法在目的基因末端添加合适序列的方法。第一步, 引物A的3'端为目的基因互补序列, 5'端为添加序列, 高温解链后引物结合, PCR扩增形成反义链; 第二步, 引物B的3'端为目的基因互补序列, 5'端为添加序列, 高温解链后引物结合, PCR扩增; 第三步, 高温解链后扩增产物自身成环, 成为可以进行等温自扩增的起始物。

[0049] 如图4所示, 采用非特异性扩增法进行在目的基因末端添加合适序列的方法。第一

步,高温解链后引物A结合;第二步,DNA聚合酶扩增形成反义链;第三步,有些具有链置换活性的DNA聚合酶,比如Bst酶,在引物序列和模版不完全匹配的情况下,仍然可以结合并进行扩增,通常这是对反应不利的一面,利用这一特性,如果DNA足够长,3'端弯曲后能够在自身上非特异性结合进行扩增,从而得到5'端的互补序列;第四步:成为可以进行等温自扩增的起始物。

[0050] 扩增效率检测:

[0051] 为了排除过量引物,模版核酸等干扰,更好的验证DNA等温自扩增效率,人工合成一段末端具有等温自扩增序列的单链DNA,命名Hind标准品1,序列为SEQ ID NO.1(以下所有DNA均从生工生物工程(上海)股份有限公司合成)。

[0052] TATATATATATATATATATATATATATATATAAGCTTGCAGGGTCCGAGGTAACAGAGCCAACCTATTTACGTGCTGCAAGCTTGCAGCACGTAATAGG

[0053] 同时人工合成了一段末端不具备等温自扩增序列的单链DNA(去掉了末端互补序列)命名Hind标准品2:序列为:SEQ ID NO.2

[0054] GCAGGGTCCGAGGTAACAGAGCCAACCTATTTACGTGCTGCAAGCTTGCAGTAAATAGG

[0055] 恒温扩增反应体系25 μ l,其中dNTP 0.2mM each、Bst DNA Polymerase Buffer1 \times 、4mM MgSO₄、warm strat Bst DNA Polymerase 8U(购自NEB公司),Hind标准品约100pM,60 $^{\circ}$ C反应1小时。

[0056] 反应产物用限制性内切酶Hind III(购自NEB公司)酶切后,qPCR检测。

[0057] qPCR前引物序列:CGCGCGTAGCAGCAGTAAATA

[0058] qPCR后引物序列:GTGCAGGGTCCGAGGT

[0059] qPCR反应体系20 μ l,含引物终浓度200nM,Fast sybgreen Mix 1 \times ,酶切产物3 μ l。反应程序,95 $^{\circ}$ C 30秒,然后45个循环60 $^{\circ}$ C 20秒,95 $^{\circ}$ C 5秒。

[0060] 检测数据如表1所示。

[0061] 表1

	Ct 值		
	直接 qPCR	等温扩增酶切后 qPCR	delt Ct 值
[0062] Hind 标准品 1	21	12	-9
Hind 标准品 2	20	23	3

[0063] 结果显示:Hind标准品1扩增了约1000倍,Hind标准品2几乎没有扩增,说明具有特定结构的核酸片段能够进行恒温自扩增。

[0064] 扩增效率和起始浓度关系检测:

[0065] 同样为了排除过量引物,模版核酸等的干扰,更好的验证DNA等温自扩增,选择人工合成片段Hind标准品1,采用不同的起始浓度。

[0066] 等温扩增和qPCR实验步骤同实施例1中描述,60 $^{\circ}$ C下反应2小时。

[0067] 数据如表2所示

[0068] 表2

[0069]

	Ct 值			delt Ct 值
	Hind 标准品 1 起始浓度	直接 qPCR	等温扩增酶切后 qPCR	
1	500pM	19	7	-12
2	50pM	23	9	-14
3	5pM	26	12	-14
4	500fM	29	16	-13
5	50fM	31	19	-12
6	5fM	31	24	-7
7	0.5fM	31	27	-4
8	0.05fM	31	30	-1
9	0.005fM	31	31	0
10	0	31	31	0

[0070] 结果显示:即使在溶液中核酸片段接近单拷贝的时候,仍然能够进行扩增,效率约1000倍,进一步说明,等温自扩增是自发进行的,不需要添加扩增引物。

[0071] 扩增效率和末端序列关系:

[0072] 同样为了排除过量引物,模版核酸等的干扰,更好的验证DNA等温自扩增,选择人工合成片段,采用不同长度的末端序列:

[0073] Hind标准品1:

[0074] TATATATATATATATATATATATATATATAAGCTTGCAGGGTCCGAGGTAACAGAGCCAACCTATTTACGTGCTGCAAGCTTGCAGCACGTAATAGG

[0075] Hind标准品21:

[0076] TATATATATATATATATATAAGCTTGCAGGGTCCGAGGTAACAGAGCCAACCTATTTACGTGCTGCAAGCTTGCAGCACGTAATAGG

[0077] Hind标准品15:

[0078] TATATATATATATAAGCTTGCAGGGTCCGAGGTAACAGAGCCAACCTATTTACGTGCTGCAAGCTTGCAGCACGTAATAGG

[0079] Hind标准品9:

[0080] TATATATAAGCTTGCAGGGTCCGAGGTAACAGAGCCAACCTATTTACGTGCTGCAAGCTTGCAGCACGTAATAGG

[0081] Hind标准品0:

[0082] AAGCTTGCAGGGTCCGAGGTAACAGAGCCAACCTATTTACGTGCTGCAAGCTTGCAGCACGTAATAGG

[0083] 等温扩增和qPCR实验步骤同实施例1中描述,60℃反应2小时

[0084] 数据如表3所示，

[0085] 表3：

[0086]

		Ct 值		delt Ct 值
		直接 qPCR	等温扩增酶切后 qPCR	
1	Hind 标准品 1	27	13	-14
2	Hind 标准品 21	27	15	-12
3	Hind 标准品 15	29	15	-14

[0087]

4	Hind 标准品 9	29	22	-7
5	Hind 标准品 0	27	24	-3

[0088] 结果显示：末端TA重复序列长度分别为30,21,15的时候，扩增效率约1000倍，长度为9的时候，扩增效率约100倍，长度为0的时候，几乎没有扩增。说明等温自扩增是末端TA重复序列依赖性的。

[0089] 扩增倍数和时间关系

[0090] 为了排除过量引物，模版核酸等干扰，更好的验证DNA等温自扩增效率，人工合成一段末端具有等温自扩增序列的单链DNA，Hind标准品1。

[0091] 等温扩增和qPCR实验步骤同实施例1中描述，60℃反应不同时间。

[0092] 数据如表4所示，

[0093] 表4：

[0094]

	时间(分钟)	Ct值(等温扩增酶切后qPCR)
1	0	28
2	1	26
3	5	23
4	20	20
5	60	17

[0095] 结果显示：等温自扩增时间越长，扩增倍数越高，起始阶段，扩增效率略高。

[0096] 本发明尚有多种具体的实施方式，凡采用等同替换或者等效变换而形成的所有技术方案，均落在本发明要求保护的范围之内。

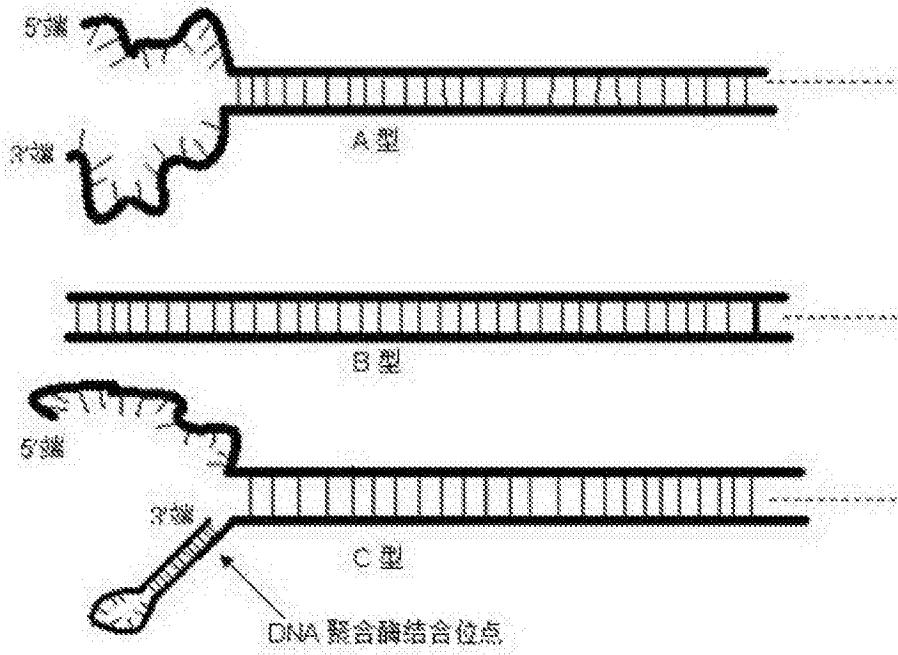


图1

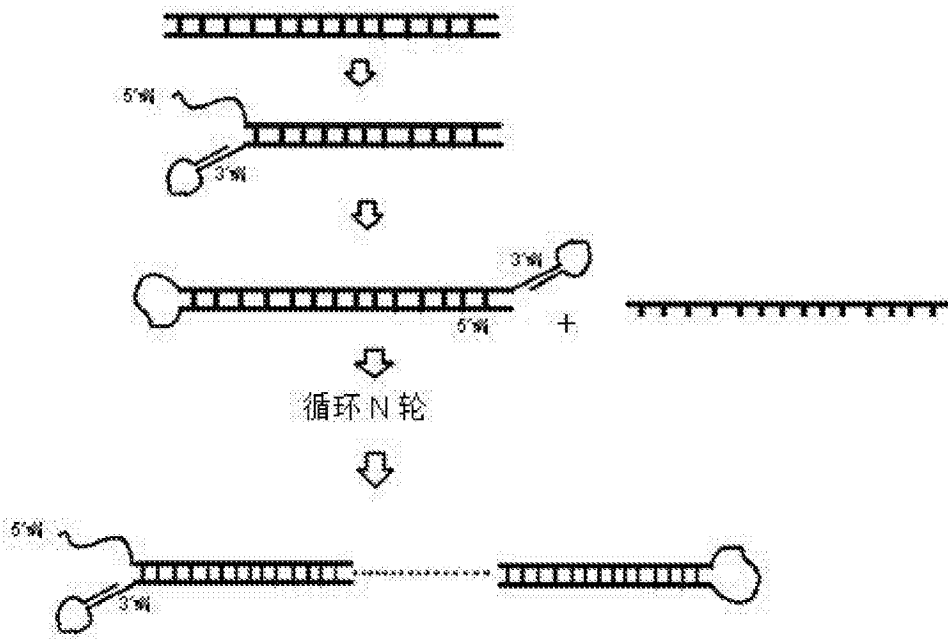


图2

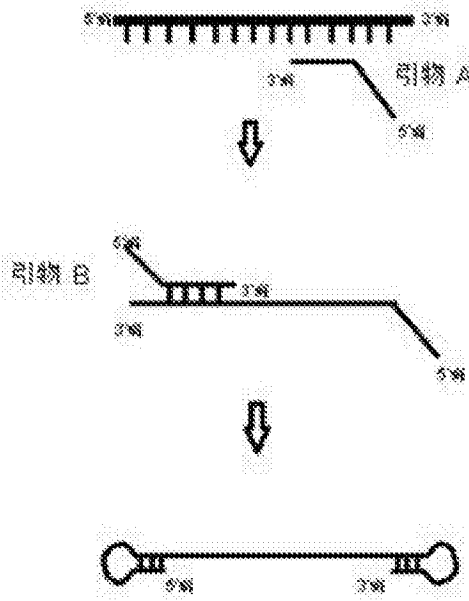


图3

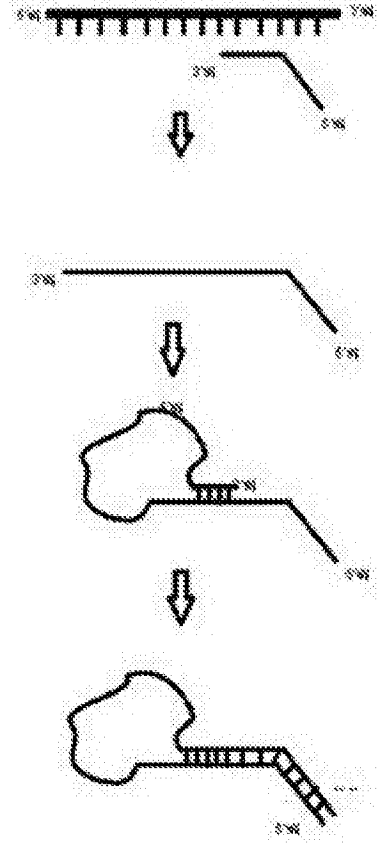


图4

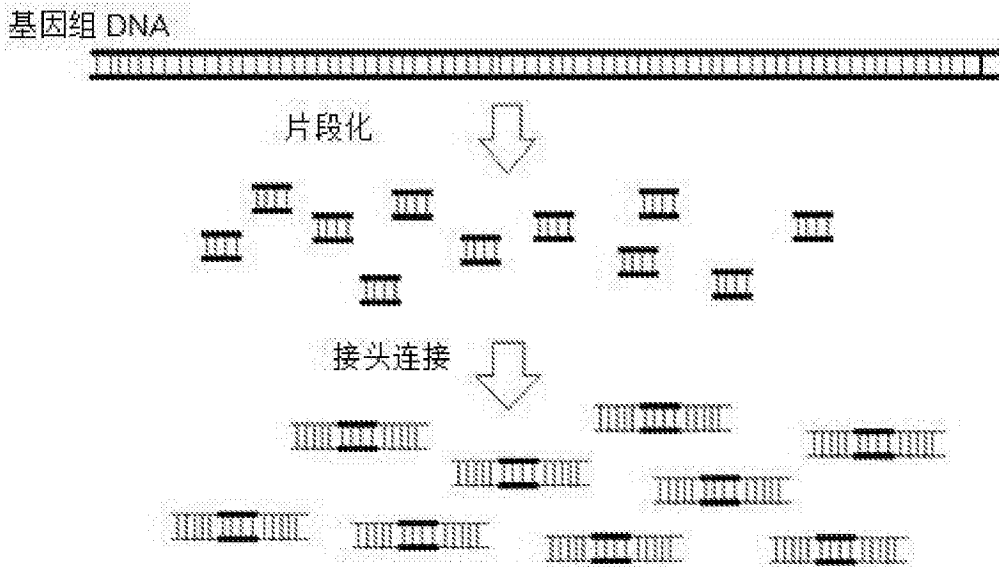


图5