(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 117327770 A
(43)申请公布日 2024.01.02

(21)申请号 202210723835.4

(22)申请日 2022.06.24

(71)申请人 上海明悦医疗科技有限公司
地址 201318 上海市浦东新区天雄路588弄1-28号24幢401室
申请人 浙江明悦医疗科技有限公司

(72)发明人 杨超 凡海峰 朱波风 宗果

(74)专利代理机构 华进联合专利商标代理有限公司 44224
专利代理师 张灵莉

(51)Int.Cl.
C12Q 1/6844(2018.01)
C12Q 1/6876(2018.01)
C12N 15/11(2006.01)

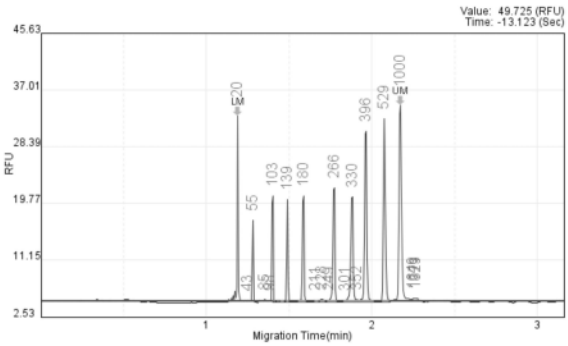
权利要求书1页 说明书10页
序列表3页 附图4页

(54)发明名称

核酸产品、单细胞全基因组的扩增缓冲剂、试剂盒和方法

(57)摘要

本发明涉及一种核酸产品、单细胞全基因组的扩增缓冲剂、试剂盒和方法。该核酸产品包括核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示的第一引物和核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示的第二引物。上述核酸产品用于单细胞全基因组扩增时,对单细胞全基因组的覆盖率高,完整性好。



CN 117327770 A

1.一种核酸产品,其特征在于,所述核酸产品包括核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示的第一引物和核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示的第二引物。

2.根据权利要求1所述的核酸产品,其特征在于,所述第一引物与所述第二引物的摩尔比为1:(0.8~1.2)。

3.权利要求1或2所述的核酸产品在制备单细胞全基因组扩增产品中的应用。

4.一种单细胞全基因组的扩增缓冲剂,其特征在于,包括权利要求1所述的核酸产品,还包括如下组分中的一种或多种:扩增酶缓冲剂、DMSO、甘油、BSA和dNTP。

5.根据权利要求4所述的扩增缓冲剂,其特征在于,所述扩增缓冲剂包括30μM~60μM的所述核酸产品、1×Phi29 DNA聚合酶缓冲液、体积百分浓度为1%~10%的DMSO、体积百分浓度为1%~20%的甘油、1μg/mL~100μg/mL的BSA和1mM~3mM dNTP。

6.根据权利要求4所述的扩增缓冲剂,其特征在于,所述扩增缓冲剂包括45μM~55μM的所述核酸产品、1×Phi29 DNA聚合酶缓冲液、体积百分浓度为3%~7%的DMSO、体积百分浓度为1%~5%的甘油、1μg/mL~50μg/mL的BSA和1.5mM~3mM dNTP。

7.一种单细胞全基因组扩增试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括权利要求4~6任一项所述的扩增缓冲剂,还包括细胞裂解剂、扩增酶、DTT和中和剂中的至少一种,所述细胞裂解剂含有碱性物质,所述中和剂用于与所述碱性物质发生中和反应。

8.根据权利要求7所述的单细胞全基因组扩增试剂盒,其特征在于,所述细胞裂解剂包括100mM~800mM一元强碱,1mM~15mM EDTA;进一步地,所述一元强碱选自KOH和NaOH中的至少一种;

和/或,所述DTT的浓度为0.1M~2M;

和/或,所述中和剂包括100mM~800mM HCl和100mM~800mM Tris;

和/或,所述扩增酶包括Phi29 DNA聚合酶;进一步地,所述扩增酶的工作浓度为0.1U/μL~10U/μL;更进一步地,所述扩增酶的工作浓度为0.1U/μL~5U/μL。

9.根据权利要求8所述的单细胞全基因组扩增试剂盒,其特征在于,所述细胞裂解剂包括200mM~600mM一元强碱和8mM~15mM EDTA;

和/或,所述DTT的浓度为0.5M~1.5M;

和/或,所述中和剂包括400mM~600mM HCl和400mM~700mM Tris。

10.一种单细胞全基因组扩增方法,其特征在于,采用权利要求4~6任一项所述的扩增缓冲剂,利用多重置换扩增技术扩增单细胞全基因组;所述方法包括以下步骤:

采用细胞裂解剂裂解单细胞,释放细胞内的基因组,制备裂解粗产物;

采用中和剂调整所述裂解粗产物的pH值至中性,得到裂解产物;及

将所述裂解产物与所述扩增缓冲剂和扩增酶混合之后进行多重置换扩增反应,获得单细胞全基因组扩增产物。

核酸产品、单细胞全基因组的扩增缓冲剂、试剂盒和方法

技术领域

[0001] 本发明涉及基因技术领域,特别是涉及一种核酸产品、单细胞全基因组的扩增缓冲剂、试剂盒和方法。

背景技术

[0002] 近年来,随着基因组研究的不断发展和深入,其检测方法和技术也层出不穷,除了传统的PCR(Polymerase Chain Reaction,多聚酶链反应)技术和一代测序技术之外,诸如基因芯片技术、高通量测序技术等也逐渐成为了基因检测领域的主流技术。

[0003] 由于新技术的不断更新迭代,越来越多的研究者不再局限于多细胞水平的基因研究,而是将目光聚焦在更具体的单个细胞的水平。单细胞是多细胞生物的基本单元,往往成熟生物体经过发育过程中的不断分化后导致细胞之间具有较大的差异,特别是肿瘤组织的高度异质性使得从单细胞的角度进行研究成为必须。另外,有些样品稀少且无法在实验室培养,或者样品量不足,难以进行基因组分析,例如循环肿瘤细胞、胚胎细胞等。所以,基因检测领域急需一种能将单个或少数几个细胞的基因组扩增放大后用于下游的分子生物学的分析的全基因组扩增的方法。

[0004] 单细胞全基因组扩增技术是在单细胞水平对全基因组进行扩增的一项技术,其原理是对分离的单个细胞的微量全基因组DNA进行扩增,获得高覆盖率的完整的基因组后进行下游的分子生物学的分析,广泛应用于癌症研究、胚胎发育、辅助生殖、细胞分化、免疫机制、微生物等方向的研究。目前市面上常见的单细胞全基因组扩增方法包括简并寡核苷酸引物PCR(Degenerate Oligonucleotide-Primed Polymerase Chain Reaction,DOP-PCR)、多重置换扩增 (Multiple Displacement Amplification,MDA)和多次退火环状循环扩增(multiple annealing and looping-based amplification cycles,MALBAC)等,三种方法各有优劣势。

[0005] DOP-PCR(Degenerate Oligonucleotide-Primed Polymerase Chain Reaction,简并寡核苷酸引物PCR)技术是一种基于PCR的方法,由于PCR具有明显的序列偏好性,很多具有复杂结构或高GC的序列并不能得到较好的扩增。MALBAC 技术是一种基于多重退火成环扩增的方法,是一种伪线性扩增技术,虽然规避了一定程度上的序列偏好性,但由于该技术主要采用的Bst DNA聚合酶作为扩增酶,导致扩增保真性较差,不适用于下游进行单碱基变异的分析。MDA技术是一种多重置换扩增技术,该扩增技术不仅能良好地扩增复杂序列结果,而且由于所使用的Phi29 DNA聚合酶具有高度保真性,扩增出错率极低,能更好地反映基因组序列的真实性。然而,传统的MDA技术的扩增产物对单细胞全基因组的覆盖率还有待提高。

发明内容

[0006] 基于此,有必要提供一种核酸产品,该核酸产品可以改善传统MDA单细胞全基因扩增时覆盖率较低的问题。

[0007] 此外,还提供一种可提高MDA单细胞全基因组扩增覆盖率的扩增试剂盒和方法。

[0008] 一种核酸产品,所述核酸产品包括核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示的第一引物和核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示的第二引物。

[0009] 上述核酸产品包括核苷酸序列如SEQ ID NO:1～2所示的引物对。经验证,采用上述核酸产品对单细胞进行全基因组扩增时,扩增产物对单细胞的全基因组覆盖率高,完整性好,可以改善传统MDA单细胞全基因扩增时覆盖率较低的问题。

[0010] 在其中一个实施例中,所述第一引物与所述第二引物的摩尔比为1:(0.8～2)。

[0011] 上述的核酸产品在制备单细胞全基因组扩增产品中的应用。

[0012] 一种单细胞全基因组的扩增缓冲剂,包括上述的核酸产品,还包括如下组分中的一种或多种:扩增酶缓冲剂、DMSO、甘油、BSA和dNTP。

[0013] 在其中一个实施例中,所述扩增缓冲剂包括30μM～60μM的所述核酸产品、1×Phi29DNA聚合酶的缓冲液、体积百分浓度为1%～10%的DMSO、体积百分浓度为1%～20%的甘油、1μg/mL～100μg/mL的BSA和1mM～3mMdNTP。

[0014] 在其中一个实施例中,所述扩增缓冲剂包括45μM～55μM的所述核酸产品、1×Phi29DNA聚合酶的缓冲液、体积百分浓度为3%～7%的DMSO、体积百分浓度为1%～5%的甘油、1μg/mL～50μg/mL的BSA和5mM～3mMdNTP。

[0015] 一种单细胞全基因组扩增试剂盒,所述试剂盒包括上述的扩增缓冲剂,还包括细胞裂解剂、扩增酶、DTT和中和剂中的至少一种,所述细胞裂解剂含有碱性物质,所述中和剂用于与所述碱性物质发生中和反应。

[0016] 在其中一个实施例中,所述细胞裂解剂包括100mM～800mM一元强碱, 1mM～15mMEDTA;进一步地,所述一元强碱选自KOH和NaOH中的至少一种;

[0017] 和/或,所述DTT的浓度为0.1M～2M;

[0018] 和/或,所述中和剂包括100mM～800mMHCl和100mM～800mMTris;

[0019] 和/或,所述扩增酶包括Phi29DNA聚合酶;进一步地,所述扩增酶的工作浓度为0.1U/μL～10U/μL;更进一步地,所述扩增酶的工作浓度为0.1U/μL～5U/μL。

[0020] 在其中一个实施例中,所述细胞裂解剂包括200mM～600mM一元强碱和 8mM～15mMEDTA;

[0021] 和/或,所述DTT的浓度为0.5M～5M;

[0022] 和/或,所述中和剂包括400mM～600mMHCl和400mM～700mMTris。

[0023] 一种单细胞全基因组扩增方法,所述方法采用上述的扩增缓冲剂,利用多重置换扩增技术扩增单细胞全基因组,所述方法包括以下步骤:

[0024] 采用细胞裂解剂裂解单细胞,释放细胞内的基因组,制备裂解粗产物;

[0025] 采用中和剂调整所述裂解粗产物的pH值至中性,得到裂解产物;及

[0026] 将所述裂解产物与所述扩增缓冲剂和扩增酶混合之后进行多重置换扩增反应,获得单细胞全基因组扩增产物。

附图说明

[0027] 图1为实施例1中的扩增产物的毛细管电泳图;

[0028] 图2为实施例2中NTP对应的扩增产物的毛细管电泳图;

[0029] 图3为实施例2中NGP对应的扩增产物的毛细管电泳图;

[0030] 图4为实施例2中NKP对应的扩增产物的毛细管电泳图;

[0031] 图5为实施例2中N6P对应的扩增产物的毛细管电泳图;

[0032] 图6为实施例2中K6P对应的扩增产物的毛细管电泳图;

[0033] 图7为实施例2中GTP对应的扩增产物的毛细管电泳图。

具体实施方式

[0034] 为了便于理解本发明,下面将对本发明进行更全面的描述,本发明可以以许多不同的形式来实现,并不限于本文所描述的实施例。相反地,提供这些实施例的目的是使本发明公开内容更加透彻全面。

[0035] 除非另有定义,本文所使用的所有的技术和科学术语与属于本发明的技术领域的技术人员通常理解的含义相同。本文中在本发明的说明书中所使用的术语只是为了描述具体的实施例的目的,不是旨在于限制本发明。此外,术语“第一”、“第二”等仅用于描述目的,而不能理解为指示或暗示相对重要性。术语“和 /或”包括一个或多个相关的所列项目的任意的和所有的组合。

[0036] 本申请一实施方式提供了一种核酸产品,该核酸产品包括核苷酸序列如 SEQ ID NO:1所示的第一引物和核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示的第二引物。

[0037] 具体地,SEQ ID NO:1的核苷酸序列为:NNGTTT;SEQ ID NO:1的核苷酸序列为:NNTGGG。经验证,核苷酸序列如SEQ ID NO:1的第一引物和核苷酸序列如SEQ ID NO:2的第二引物用于单细胞的全基因组扩增时,对单细胞的全基因组的覆盖率高,完整性好,能用于下游的分析生物学分析。

[0038] 在一些实施例中,第一引物和第二引物独立包装。也即是第一引物与第二引物并没有混合包装在一起。在另一些实施例中,第一引物和第二引物混合包装。在一个可选地具体示例中,在混合包装时,第一引物和第二引物的摩尔比为1:1。采用第一引物和第二引物的摩尔比为1:1的比例设置,便于后续使用。可以理解的是,在其他实施例中,即使第一引物和第二引物以混合的方式包装,也可以不采用摩尔比为1:1的比例进行包装,还可以第一引物和第二引物还可以是其他比例,例如1:(0.8～1.2)。

[0039] 可以理解的是,上述核酸产品的剂型没有特别限制。在一些实施例中,核酸产品为冻干粉剂。

[0040] 在一些实施例中,上述核酸产品的适用对象为人的单细胞。例如,人的单个癌细胞。

[0041] 基于上述,本申请一实施方式还提供了一种上述核酸产品在制备单细胞全基因组扩增产品中的应用。例如,上述核酸产品可以应用于单细胞全基因组扩增试剂的制备过程中;又例如,上述核酸产品还可以应用于单细胞全基因组扩增试剂盒的制备过程中。

[0042] 基于上述,本申请一实施方式还提供了一种扩增缓冲剂,该扩增缓冲剂用于制备扩增反应体系(简称扩增体系)。具体地,该扩增缓冲剂包括上述任一实施例的核酸产品。进一步地,除了上述核酸产品外,上述的扩增缓冲剂还包括扩增酶缓冲剂、DMSO、甘油、BSA和dNTP。

[0043] 在一些实施例中,扩增酶为Phi29 DNA聚合酶,上述的扩增缓冲剂包括30 μM～60μ

M的上述核酸产品、1×Phi29 DNA聚合酶缓冲液、体积百分浓度为 1%～10%的DMSO、体积百分浓度为1%～20%的甘油、1μg/mL～100μg/mL的BSA 和1mM～3mM dNTP。进一步地,上述的扩增缓冲剂包括45μM～55μM的上述核酸产品、1×Phi29 DNA聚合酶缓冲液、体积百分浓度为3%～7%的DMSO、体积百分浓度为1%～5%的甘油、1μg/mL～50μg/mL的BSA和1.5mM～3mM dNTP。

[0044] 在一些实施例中,上述的扩增缓冲剂由50μM的上述核酸产品、1×Phi29 DNA聚合酶缓冲液、体积百分浓度为1%～10%的DMSO、体积百分浓度为 1%～20%的甘油、1μg/mL～100μg/mL的BSA和1mM～3mM dNTP组成。进一步地,上述的扩增缓冲剂由50μM的上述核酸产品、1×Phi29 DNA聚合酶缓冲液、体积百分浓度为3%～7%的DMSO、体积百分浓度为1%～5%的甘油、 1μg/mL～50μg/mL的BSA和1.5mM～3mM dNTP组成,其中,上述核酸产品中的第一引物与所述第二引物的摩尔比为1:1。

[0045] 扩增酶用于扩增反应。在本实施方式中,扩增酶为Phi29 DNA聚合酶。在一些实施例中,Phi29 DNA聚合酶的工作浓度(Phi29 DNA聚合酶的工作浓度是指Phi29 DNA聚合酶在扩增体系中的浓度)为0.1U/μL～10U/μL。在一个可选地具体示例中,Phi29 DNA聚合酶的工作浓度为1U/μL、4U/μL、7U/μL或10U/μL。进一步地,Phi29 DNA聚合酶的工作浓度为0.1U/μL～5U/μL。可以理解的是,在其他实施例中,扩增酶不限于Phi29 DNA聚合酶,还可以是其他DNA聚合酶。此时,扩增酶的缓冲剂可以根据具体酶进行调整。在一些实施例中,上述的扩增缓冲剂不含扩增酶;在进行扩增反应时需添加扩增酶。

[0046] 基于上述,本申请一实施方式还提供了一种单细胞全基因组扩增试剂盒,该单细胞全基因组扩增试剂盒包括上述任一实施例的扩增缓冲剂。

[0047] 在一些实施例中,上述单细胞全基因组扩增试剂盒还包括细胞裂解剂、DTT、中和剂和扩增酶中的至少一种。

[0048] 在另一些实施例中,上述的单细胞全基因组扩增试剂盒由上述任一实施例的扩增缓冲剂、细胞裂解剂、DTT、中和剂、和扩增酶组成。

[0049] 具体地,细胞裂解剂用于裂解细胞,以使细胞中的基因组能够暴露。可选地,细胞裂解剂含有碱性物质。通过碱性物质对于细胞膜的损伤而破坏细胞膜,从而使得基因组能够暴露。

[0050] 在一些实施例中,细胞裂解剂包括100mM～800mM一元强碱和1mM～15mM EDTA。需要说明的是,在无特别说明的条件下,本文中试剂盒中的试剂的浓度均是指该试剂在使用时的浓度。例如,100mM～800mM一元强碱是指作为细胞裂解剂使用时,一元强碱的浓度为100mM～800mM。当然,采用使用浓度进行包装便于直接使用。可以理解的是,还可以将上述试剂盒中的试剂按照成倍(例如5倍、2倍等)浓缩之后包装,这样有利于运输和存储。可选地,一元强碱选自KOH和NaOH中的至少一种。可以理解的是,在其他实施例中,一元强碱不限于上述,还可以是其他物质。

[0051] 在一个可选地具体示例中,在细胞裂解剂中,一元强碱的浓度为150mM、 200mM、250mM、300mM、400mM、500mM或800mM。EDTA的浓度为3mM、 6mM、8mM、10mM、12mM或15mM。进一步地,细胞裂解剂包括200mM～600mM 一元强碱和8mM～15mM EDTA。

[0052] 在其中一个实施例中,细胞裂解剂由100mM～800mM一元强碱、1mM ～15mM EDTA和水组成。进一步地,细胞裂解剂由200mM～600mM一元强碱、 8mM～15mM EDTA和水组成。

[0053] DTT用于与细胞裂解剂混合后配制细胞裂解液工作液,即二硫苏糖醇。可选地,DTT的浓度为0.1M～2M。在一个可选地具体示例中,DTT的浓度为0.2M、0.5M、0.8M、1M、1.2M、1.5M或2M。进一步地,DTT的浓度为0.5M～1.5M。

[0054] 进一步地,细胞裂解剂与DTT的体积之比为(8～10):1。在一个可选地具体实施例中,细胞裂解剂与DTT的体积之比为9:1。

[0055] 经本申请研究发现,采用100mM～800mM一元强碱和1mM～15mM EDTA 作为裂解剂,并以DTT配制细胞裂解液工作液以裂解细胞可以提高基因组的完整性,避免在提取阶段基因组的降解。可以理解的是,在其他实施例中,细胞裂解剂不限于一元强碱与EDTA的组合,还可以是其他类型的细胞裂解剂。

[0056] 中和剂用于与细胞裂解剂中的碱性物质发生中和反应,以终止细胞裂解剂对细胞膜的裂解。可选地,中和剂包括100mM～800mM HCl和100mM～800mM Tris。进一步地,中和剂包括400mM～600mM HCl和400mM～700mM Tris。可以理解的是,中和剂中的酸性物质的摩尔量与细胞裂解剂的一元强碱的摩尔量相同。在一些实施例中,中和剂由100mM～800mM HCl和100mM～800mM Tris 组成。在另一些实施例中,中和剂由400mM～600mM HCl和400mM～700mM Tris组成。

[0057] 上述单细胞全基因组扩增试剂盒至少具有如下优点:

[0058] (1)上述单细胞全基因组扩增试剂盒包括上述核酸产品,具有上述核酸产品相应的优点。

[0059] (2)上述单细胞全基因组扩增试剂盒还包括细胞裂解剂、DTT、中和剂、扩增缓冲剂和扩增酶,其中:细胞裂解剂包括100mM～800mM一元强碱和1mM ～15mM EDTA,DTT的浓度为0.1M～2M,中和剂包括100mM～800mM HCl和 100mM～800mM Tris,扩增缓冲剂包括30μM～60μM的上述核酸产品、1×Phi29 的buffer、体积百分浓度为1%～10%的DMSO、体积百分浓度为1%～20%的甘油、0.1μg/mL～100μg/mL的BSA和1mM～3mM dNTP,扩增酶为Phi29 DNA聚合酶。通过细胞裂解剂、DTT和中和剂的配合,使得从单细胞中提取得到的基因组完整性好,杂质少,利于后续的扩增反应;另外通过缓冲体系中的Phi29缓冲液、DMSO、甘油、BSA的配合,使得扩增效果更好;此外,采用Phi29 DNA聚合酶还提高了扩增的保真度。

[0060] 此外,本申请一实施方式还提供了一种单细胞全基因组扩增方法,该单细胞全基因组扩增方法采用上述任一实施例的扩增缓冲剂,利用多重置换扩增技术扩增单细胞全基因组。

[0061] 可选地,上述单细胞全基因组扩增方法包括以下步骤:

[0062] 步骤S110:采用细胞裂解剂裂解单细胞,释放细胞内的基因组,制备裂解产物。

[0063] 在一些实施例中,采用细胞裂解剂裂解单细胞,释放细胞内的基因组,制备裂解粗产物;然后采用中和剂调整裂解粗产物的pH值至中性,得到裂解产物。进一步地,将细胞裂解剂与DTT混合制成,细胞裂解液工作液,然后将单细胞样本与细胞裂解液工作液混合反应,反应一段时间后加入中和剂终止反应,制备裂解产物。

[0064] 具体地,细胞裂解剂、DTT的浓度、细胞裂解剂与DTT的用量、中和剂及中和剂的用量均如上文单细胞全基因组扩增试剂盒处的描述,此处不再赘述。单细胞样本是指将只含有一个细胞的缓冲液。

[0065] 在一些实施例中,单细胞样本的体积与细胞裂解液工作液的体积之比为1:(2～

4)。在一个可选地具体示例中,单细胞样本的体积与细胞裂解液工作液的体积之比为1:3。

[0066] 在一些实施例中,细胞裂解液与单细胞样本的混合方式为瞬时离心。可以理解的是,在其实施例中,细胞裂解液与单细胞样本的混合方式不限于瞬时离心,还可以是其他方式。

[0067] 在一些实施例中,中和剂和加入有细胞裂解液工作液的溶液混合均匀以终止反应的步骤中,混合均匀的方式为吹打。可以理解的是,在吹打混匀之后,还包括将吹打混匀之后的溶液置于0℃～6℃的条件下保存以备后续使用的步骤。

[0068] 步骤S120:将裂解产物、上述任一实施例的扩增缓冲剂和扩增酶混合之后进行多重置换扩增反应,获得单细胞全基因组扩增产物。

[0069] 具体地,裂解产物、扩增缓冲剂和扩增酶均如上文描述,此处不再赘述。

[0070] 在一些实施例中,扩增反应的条件为:27℃～33℃,2h～3h;62℃～68℃, 8min～12min;4℃,∞。在一个可选地具体实施例中,扩增反应的条件为:30℃, 2.5h;65℃,10min;4℃,∞。

[0071] 在一些实施例中,在获得单细胞全基因组扩增产物的步骤之后,还包括对扩增产物进行验证的步骤。可选地,通过以单细胞全基因组扩增产物为模板,采用多个扩增不同管家基因的引物对进行多重PCR扩增反应,通过是否能够以及对多个管家基因扩增的效率是否一致来判断单细胞全基因组扩增产物的质量。

[0072] 在其中一个实施例中,管家基因为人1号染色体上的C1orf4基因、人3号染色体上的RAB7A基因、人5号染色体上的REEP5基因、人9号染色体上的 VCP基因、人12号染色体上的VPS29基因、人15号染色体上的EMC7基因、人19号染色体上的CHMP2A基因和人22号染色体上的SNRPD3基因。

[0073] 可选地,用于扩增C1orf4基因的引物的核苷酸序列如SEQ ID NO:3～4所示。用于扩增RAB7A基因的引物的核苷酸序列如SEQ ID NO:5～6所示。用于扩增REEP5基因的引物的核苷酸序列如SEQ ID NO:7～8所示。用于扩增VCP 基因的引物的核苷酸序列如SEQ ID NO:9～10所示。用于扩增VPS29基因的引物的核苷酸序列如SEQ ID NO:11～12所示。用于扩增EMC7基因的引物的核苷酸序列如SEQ ID NO:13～14所示。用于扩增CHMP2A基因的引物的核苷酸序列如SEQ ID NO:15～16所示。用于扩增SNRPD3基因的引物的核苷酸序列如SEQ ID NO:17～18所示。可以理解的是,在其他实施例中,可以用于扩增上述管家基因的引物不限于上述。

[0074] 经验证,上述单细胞全基因组扩增方法采用上述核酸产品进行单细胞全基因扩增,与传统的MDA方法和MALBAC方法相比,扩增效果好,在比对率和平均测序深度上无明显差异,但覆盖度和均一度显著优于传统的MDA方法和 MALBAC方法,能更好地保证结果的准确性和有效性。

[0075] 具体实施例

[0076] 以下结合具体实施例进行详细说明。以下实施例如未特殊说明,则不包括除不可避免的杂质外的其他组分。实施例中采用试剂和仪器如非特别说明,均为本领域常规选择。实施例中未注明具体条件的实验方法,按照常规条件,例如文献、书本中所述的条件或者生产厂家推荐的方法实现。

[0077] 实施例1

[0078] 1、单细胞分离

[0079] 获取细胞系样本(Genewe11 PGT-1Reference Standard,菁良基因),并制备成细胞悬液,然后通过显微操作将细胞悬液制备成单细胞分装于0.2mL的PCR 管中,溶液体积为3μL。

[0080] 2、细胞裂解反应

[0081] (1)配制细胞裂解液:配制由KOH、EDTA及水组成的细胞裂解液,在细胞裂解液中含400mM KOH和10mM EDTA,然后按9μL细胞裂解液和1μL 1M DTT的比例配制成10μL细胞裂解液工作液。

[0082] (2)配制中和液:中和液由HCl、Tris和水组成,其中,中和液中含400mM HCl和600mM Tris。

[0083] (3)在1μL单细胞样本中加入3μL细胞裂解液工作液,瞬时离心后,置于 PCR仪中,运行程序:65℃10min,4℃保存。

[0084] (4)步骤(3)反应结束后,加入1μL中和液,吹打混匀后,得到裂解产物,置于冰上备用。

[0085] 3、扩增反应

[0086] (1)按照表1的组成,在PCR管中加入各组分并瞬时离心,制备扩增体系。其中,200μM引物对由100μM核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示的引物、100 μM核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示的引物和ddH_2O组成。

[0087] 表1

[0088]

成分	反应体积 μL
10×Phi29 Buffer（诺唯赞）	2.5
200 μM 引物对	6.25
10mM dNTP	6.25
100%DMSO	1.25
50%甘油	1.25
100μg/mL BSA	2.5
Phi29 DNA 聚合酶（诺唯赞）	1
步骤 2(4)的裂解产物	4
合计：	25

[0089] (2)将配制得到的扩增体系置于PCR仪中,按照表2运行程序:

[0090] 表2

[0091]

循环	温度	时间
1	30℃	2.5h
1	65℃	10min
1	4℃	∞

[0092] 4、扩增产物浓度测定及多重PCR扩增测试

[0093] (1)按照扩增产物与纯化磁珠的体积比为1:1.5加入纯化磁珠,也即是每 10μL扩增产物加入15μL纯化磁珠,吹打混匀后室温吸附5min。

[0094] (2)采用100μL的70%乙醇将磁珠洗涤2遍,晾干2min。

[0095] (3)在晾干后的磁珠中加入10μL水吹打混匀,室温静置2min后洗脱,进行浓度检测。

[0096] (4)对扩增产物进行分布于不同染色体上的管家基因扩增,并采用毛细管电泳进行检测扩增结果,其中,管家基因信息及扩增引物如表3所示,检测结果如图1所示。需要说明的是,图1中“LM”所在的峰表示下限内标所在的峰;“UM”所在的峰代表的是上限内标所在的峰,图2～图7同理。

[0097] 表3

[0098]

染色体位置	引物名称	序列（5’-3’）
1q21.3	C1orf43-F	GTCAGTTGCAATGTGCAAGACAG（SEQ ID NO：3）
	C1orf43-R	AAACAGTTCCCATTCAACTGTGC（SEQ ID NO：4）
3q21.3	RAB7A-F	GTTCTGCTCCCTTCCTAGGATCT（SEQ ID NO：5）
	RAB7A-R	GTTCAATTTTATTGGCATTGCGT（SEQ ID NO：6）
5q22.2	REEP5-F	TCTGTACCTTCCTACTGGAGCTTGA（SEQ ID NO：7）
	REEP5-R	TGAGCATGATGCATGTTGTAGTCA（SEQ ID NO：8）
9p13.3	VCP-F	AGGACTGGTGGAAAGGGAGC（SEQ ID NO：9）
	VCP-R	CACAACTGTAAGTGATCACCAACCA（SEQ ID NO：10）
12q24.11	VPS29-F	GTTAATACATAATTGCTCCAAGCTTCC（SEQ ID NO：11）
	VPS29-R	TTATATCCGTAGTTTCACTTGGTTCCT（SEQ ID NO：12）
15q14	EMC7-F	GGAGCAGTCAATGAATATGCTGAA（SEQ ID NO：13）
	EMC7-R	GTTTGTGCAAATGCCAGCTCT（SEQ ID NO：14）
19q13.43	CHMP2A-F	TAGCTGATGCTGATGCAGACCT（SEQ ID NO：15）
	CHMP2A-R	AAGATCCTGGGCATCCACTG（SEQ ID NO：16）
22q11.23	SNRPD3-F	TTGTGGAAACAGATTCTTGGGAG（SEQ ID NO：17）
	SNRPD3-R	TCCTCTTGATGGCTTATGCTGTAG（SEQ ID NO：18）

[0099] 由图1可知,采用核苷酸序列如SEQ ID NO:1～2所示的引物对进行人单细胞基因组扩增时,完整性好,均一性高。

[0100] 实施例2

[0101] 1、单细胞分离:具体步骤同实施例1。

[0102] 2、细胞裂解反应:具体步骤同实施例1。

[0103] 3、扩增反应:

[0104] (1)按照实施例1中方法配制多个扩增反应体系,其中各个扩增体系的扩增引物如表4所示。需要说明的是,引物编号为NTP、NGP、NKP、N6P和K6P 的扩增引物为一种;编号为GTP的扩增引物为两种,这两种引物的摩尔比1:1 的比例。

[0105] 表4

[0106]

引物编号	引物序列
NTP	NNGTTT
NGP	NNTGGG
NKP	NNNNKK
N6P	NNNNNN
K6P	KKKKKK
GTP	NNGTTT+NNTGGG

[0107] (2)将各扩增反应体系置于PCR仪中,进行反应。具体反应程序同实施例 1。

[0108] 4、扩增产物浓度测定及多重PCR扩增测试:方法同实施例1,结果如图2～图7所示。

[0109] 从图2～图6的检测结果可以看出,在采用单独一种的随机六聚体对人单细胞的全基因组进行扩增时,存在部分染色体无法扩增的情况:NTP对应的扩增产物中只有一种管家基因能被检测到,NKP和NGP对应的扩增产物中只有6种管家基因能被检测到,N6P和K6P对应的扩增产物中只有5种管家基因能被检测到,这说明了采用NTP、NGP、NKP、N6P和K6P对人单细胞的全基因组进行扩增时,覆盖率不高,扩增完整度有缺陷。

[0110] 从图7可以看出,GTP(核苷酸序列如SEQ ID NO:1～2所示的引物对)对应的扩增产物中8种管家基因均能被检测出,并且各个管家基因的浓度相差较小,这说明了核苷酸序列如SEQ ID NO:1～2所示的引物对对人单细胞基因组进行扩增时,覆盖率高,完整性好,均一性好。此外,通过图1与图7的对比发现,采用上述扩增体系的重复性好。

[0111] 实施例3

[0112] 1、单细胞分离:方法同实施例1。

[0113] 2、获取单细胞全基因组并上机测序

[0114] (1)使用GTP(核苷酸序列如SEQ ID NO:1～2所示的引物对),采用实施例1的方法,获取人单细胞全基因组扩增产物i;利用传统的MDA方法获得人单细胞全基因组扩增产物ⅱ;利用单细MALBAC方法获取的人单细胞全基因组扩增产物iii。其中:

[0115] 与实施例1的MDA方法相比,传统的MDA方法采用的引物为NNNNNN,扩增体系中引物的浓度为50μM。

[0116] 单细MALBAC方法操作参见亿康基因的MALBAC™单细胞全基因组扩增试剂盒(货号KT110700110)。

[0117] (2)利用VAHTS DNA Clean Beads(N411)分别对各个扩增产物纯化,采用VAHTS®Universal Plus DNA Library Prep Kit for MGI((Vazyme,#NDM617)分别进行文库构建,并用Qubit 2.0荧光计检测浓度,Aglient 2100分析片段长度,文库质检合格后,上机测序,10×测序深度,将测序数据进行比对分析,得到扩增产物的基本信息。

[0118] 3、实验结果

[0119] 表5为3种扩增产物测序的基本数据情况:

[0120] 表5

[0121]

扩增产物	Clean reads	比对率	平均测序深度	覆盖度	SD 值
扩增产物 i	223469854	99.32	9.31	96.58	1.78
扩增产物 ii	216594626	99.75	9.46	90.75	2.43
扩增产物iii	213928452	99.46	9.24	91.66	2.37

[0122] 从表5中可以看出,在测序数据量方面,三种扩增产物大致相同;在比对率及平均测序深度方面,三者无显著差异;但在覆盖度和均一度方面上,扩增产物i的覆盖度和均一度均最高。由此可知,与传统的MDA方法和MALBAC 方法相比,采用核苷酸序列如SEQ ID NO:

1～2所示的引物进行MDA单细胞全基因组扩增的扩增效果好,比对率和平均测序深度无明显差异,但覆盖度和均一度显著优于传统的MDA方法和MALBAC方法。

[0123] 以上所述实施例的各技术特征可以进行任意的组合,为使描述简洁,未对上述实施例中的各个技术特征所有可能的组合都进行描述,然而,只要这些技术特征的组合不存在矛盾,都应当认为是本说明书记载的范围。

[0124] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,便于具体和详细地理解本发明的技术方案,但并不能因此而理解为对发明专利保护范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。应当理解的是,在本领域技术人员在本发明提供的技术方案的基础上,通过合乎逻辑的分析、推理或有限的试验得到的技术方案,均在本发明所附权利要求的保护范围内。因此,本发明专利的保护范围应以所附权利要求的内容为准,说明书及附图可以用于解释权利要求的内容。

序列表

<110> 上海明悦医疗科技有限公司

浙江明悦医疗科技有限公司

<120> 核酸产品、单细胞全基因组的扩增缓冲剂、试剂盒和方法

<160> 18

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

nngttt 6

<210> 2

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

nntggg 6

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

gtcagttgca atgtgcaaga cag 23

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 4

aaacagttcc cattcaactg tgc 23

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 5

gttctgctcc cttcctagga tct 23

<210> 6

<211> 23

<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 6
gttcaatttt attggcattg cgt 23
<210> 7
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 7
tctgtacctt cctactggag cttga 25
<210> 8
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 8
tgagcatgat gcatgttgta gtca 24
<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 9
aggactggtg gaaagggagc 20
<210> 10
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 10
cacaactgta agtgatcacc aacca 25
<210> 11
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 11
gttaatacat aattgctcca agcttcc 27
<210> 12
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 12

ttatatccgt agtttcactt ggttcct 27

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 13

ggagcagtca atgaatatgc tgaa 24

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 14

gtttgtgcaa atgccagctc t 21

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 15

tagctgatgc tgatgcagac ct 22

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 16

aagatcctgg gcatccactg 20

<210> 17

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 17

ttgtggaaac agattcttgg gag 23

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 18

tcctcttgat ggcttatgct gtag 24

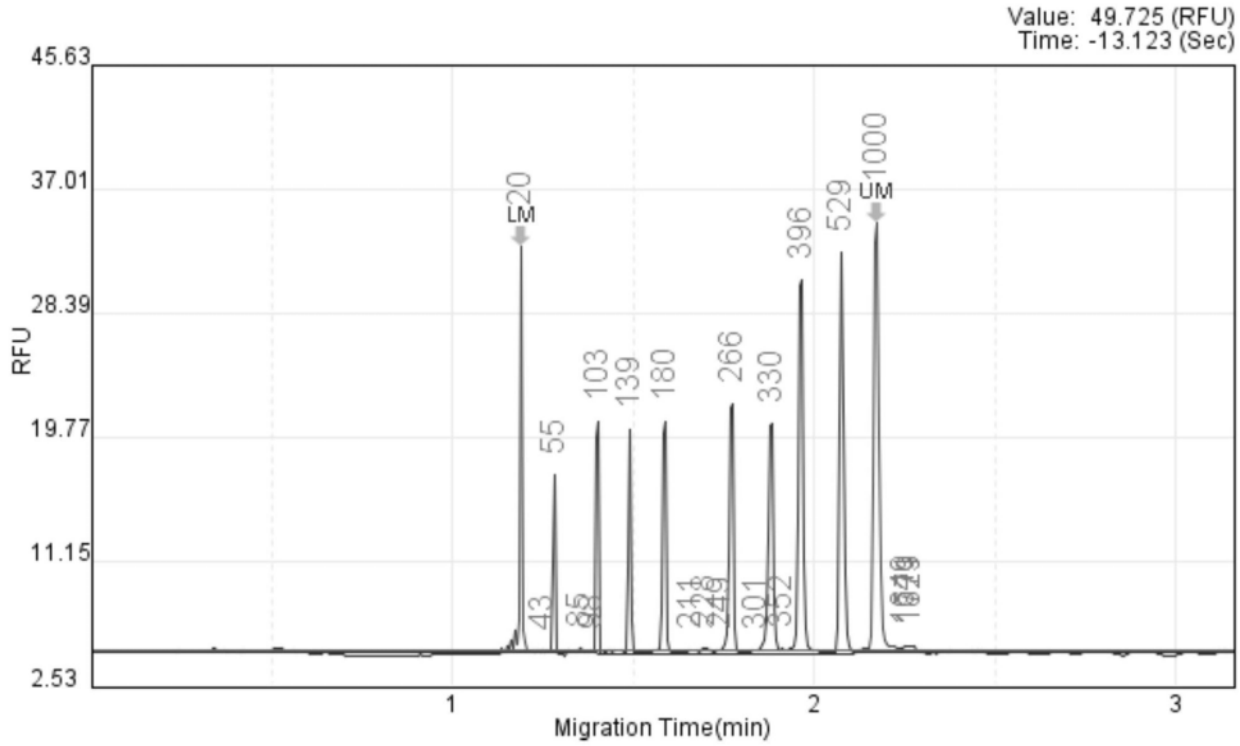

Value: 49.725 (RFU)
Time: -13.123 (Sec)
45.63
37.01
28.39
19.77
11.15
2.53
RFU
LM20
UM1000
43
55
85
103
139
180
211
249
266
301
330
352
396
529
1
2
3
Migration Time(min)

图1

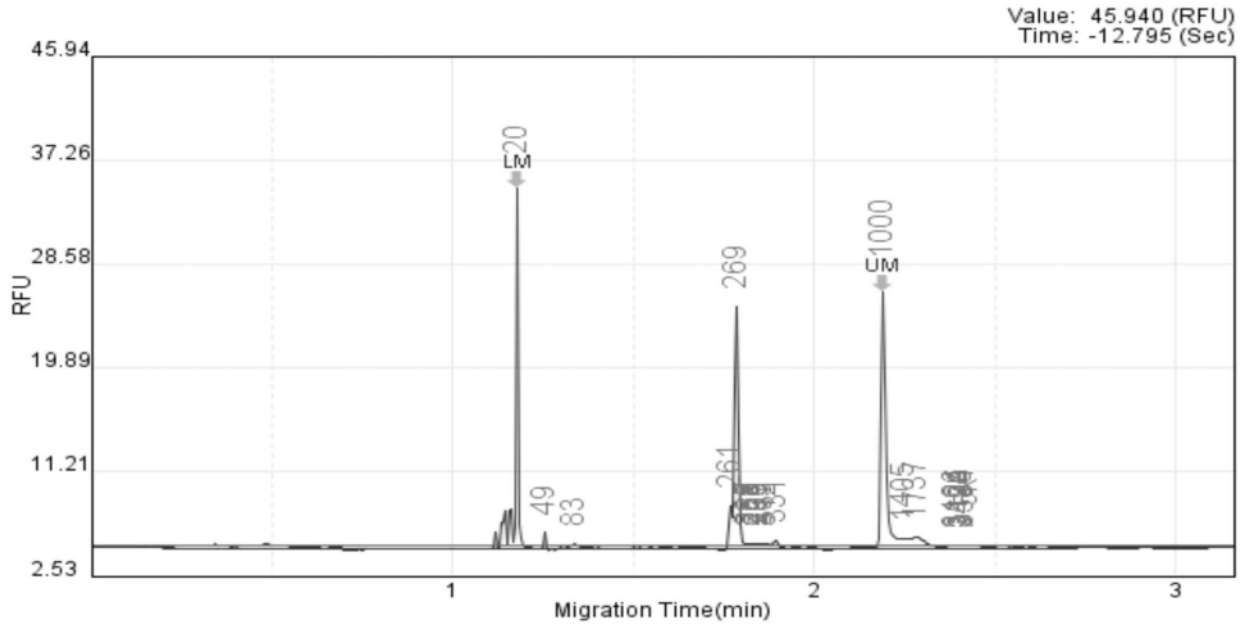

Value: 45.940 (RFU)
Time: -12.795 (Sec)
45.94
37.26
28.58
19.89
11.21
2.53
RFU
LM20
UM1000
49
83
261
269
1405
1739
1
2
3
Migration Time(min)

图2

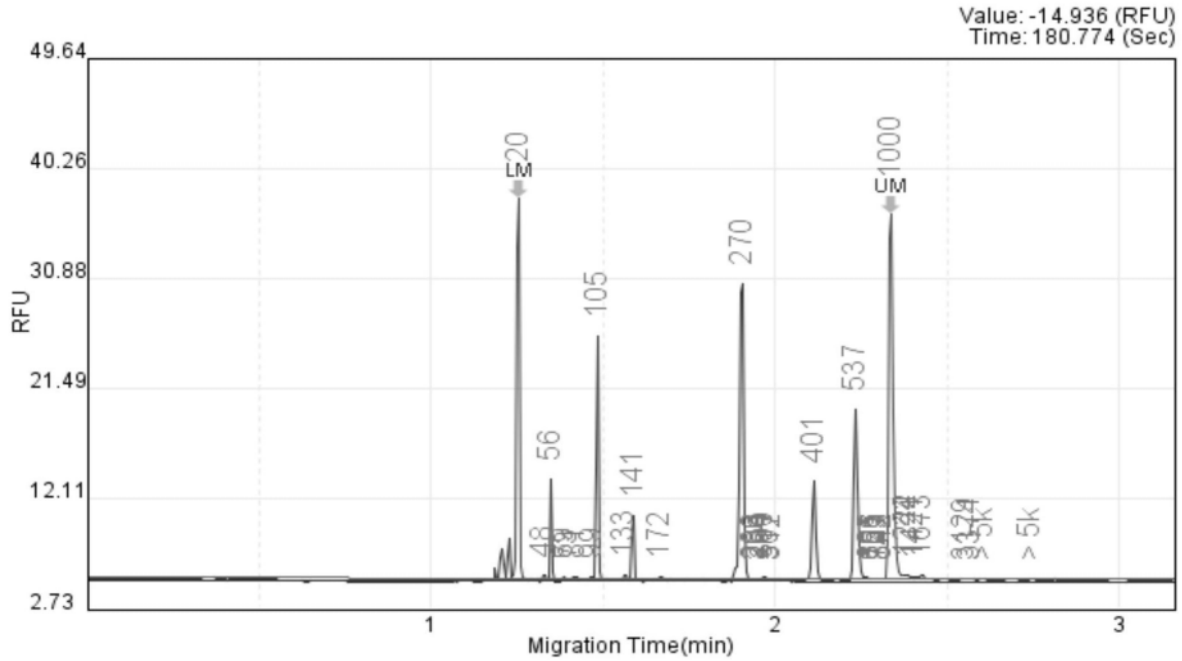

Value: -14.936 (RFU)
Time: 180.774 (Sec)
49.64
40.26
30.88
21.49
12.11
2.73
RFU
LM
UM
220
1000
270
105
537
401
56
141
133
172
48
> 5k
1
2
3
Migration Time(min)

图3

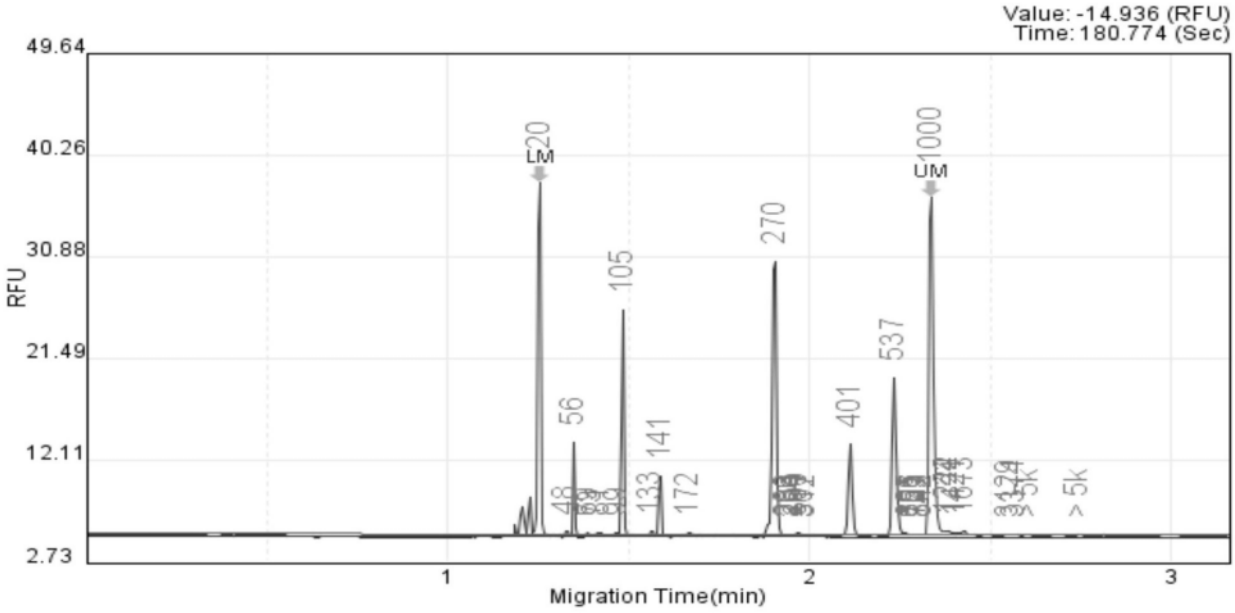

Value: -14.936 (RFU)
Time: 180.774 (Sec)
49.64
40.26
30.88
21.49
12.11
2.73
RFU
LM
UM
220
1000
270
105
537
401
56
141
133
172
48
> 5k
1
2
3
Migration Time(min)

图4

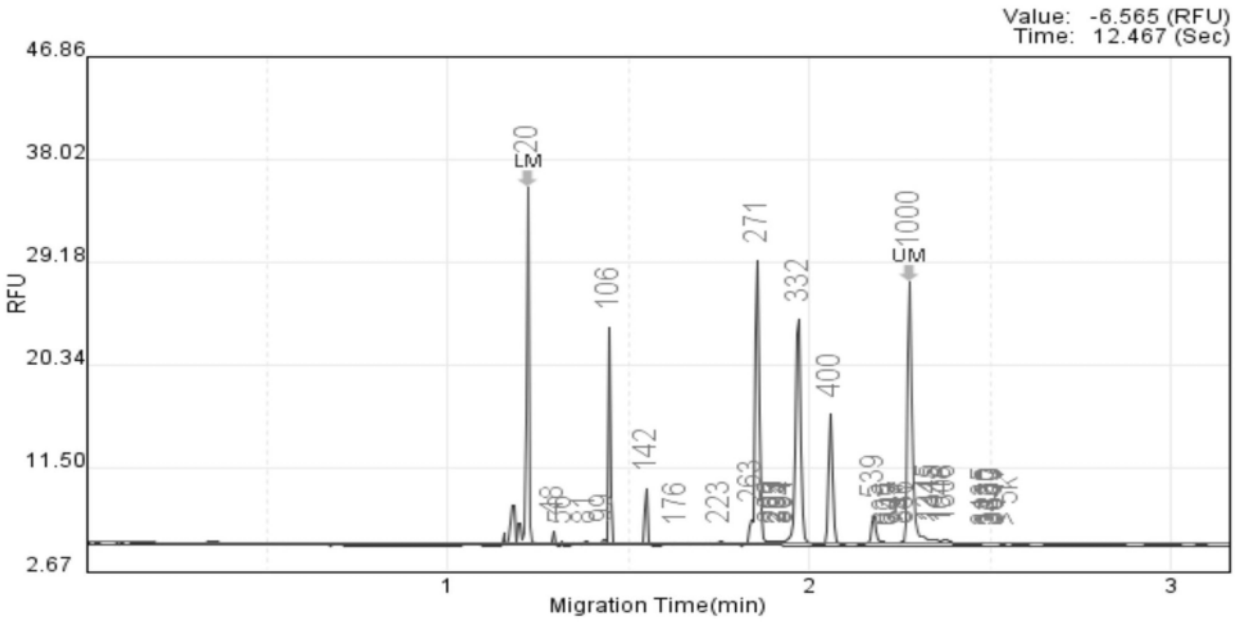

Value: -6.565 (RFU)
Time: 12.467 (Sec)
46.86
38.02
29.18
20.34
11.50
2.67
RFU
LM20
106
142
176
223
271
332
400
539
UM1000
5k
1
2
3
Migration Time(min)

图5

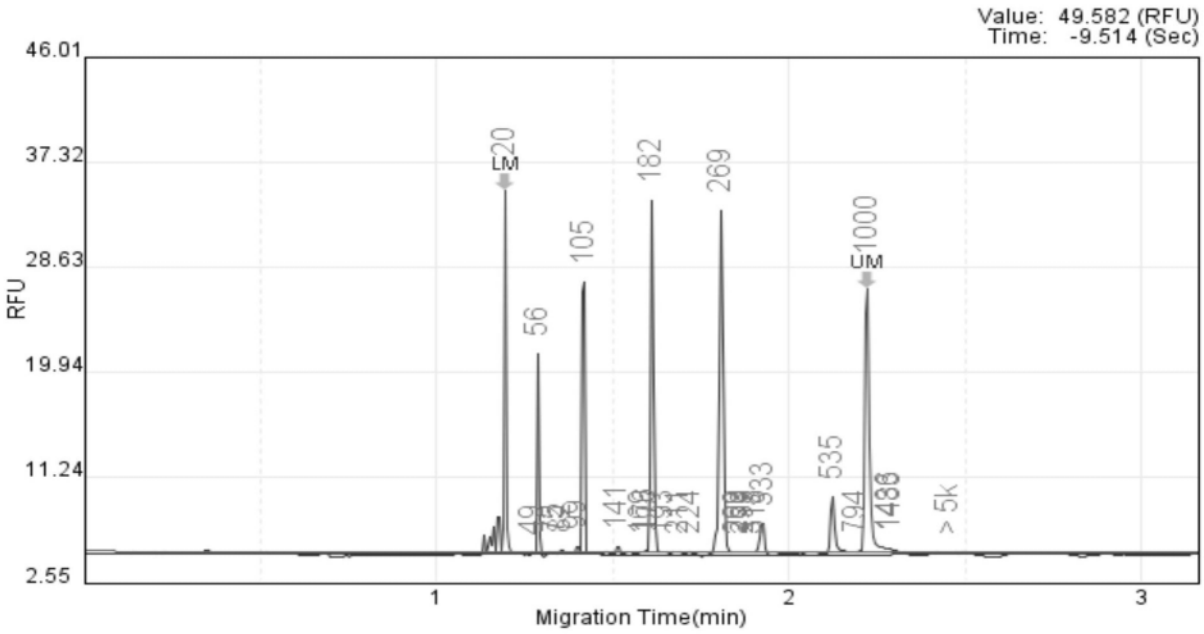

Value: 49.582 (RFU)
Time: -9.514 (Sec)
46.01
37.32
28.63
19.94
11.24
2.55
RFU
LM20
56
105
141
182
224
269
535
794
UM1000
1486
> 5k
1
2
3
Migration Time(min)

图6

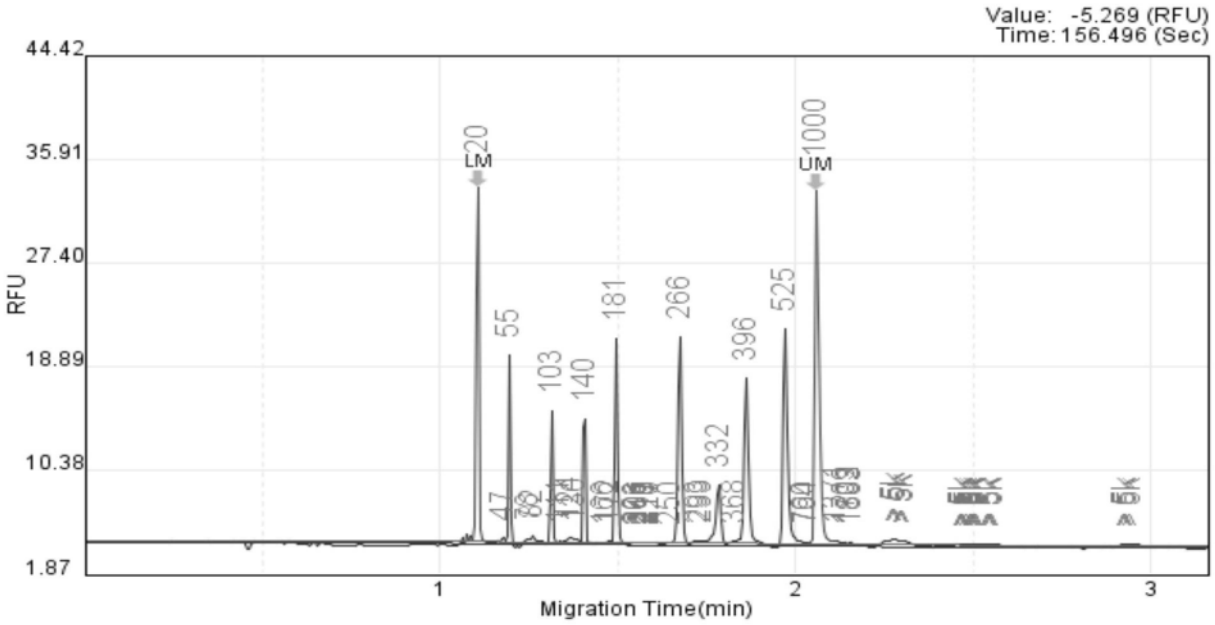

Value: -5.269 (RFU)
Time: 156.496 (Sec)
44.42
35.91
27.40
18.89
10.38
1.87
RFU
1
2
3
Migration Time(min)
20
UM
1000
UM
55
103
140
181
266
332
396
525

图7