



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102719528 A

(43) 申请公布日 2012. 10. 10

(21) 申请号 201210130266. 9

(22) 申请日 2012. 04. 27

(71) 申请人 上海派森诺生物科技有限公司

地址 200231 上海市徐汇区龙吴路 777 号 7
号楼 301 室

(72) 发明人 孟和 孙子奎 陈永灿

(74) 专利代理机构 上海智信专利代理有限公司

31002

代理人 胡美强 沈利

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 12 页

(54) 发明名称

一种用于基于焦磷酸原理的 454 高通量测序
的 emPCR 方法

(57) 摘要

本发明公开了一种用于基于焦磷酸原理的 454 高通量测序的 emPCR 方法,其是在配制 emPCR 扩增混合液的过程中,将超纯水、5× 扩增液、扩增引物、emPCR 扩增混合液和 PPIase 的体积做了调整;在进行扩增反应时将扩增条件由一步扩增改为两步扩增。采用本发明所述 emPCR 的方法能够有效降低非特异性扩增信号,减少冗余的数据,使有效数据的产量提高 30%,同时提高了实验效率,节约了实验成本。

1. 一种用于基于焦磷酸原理的 454 高通量测序中 emPCR 的方法,其包括步骤:

- 1) 乳化油、emPCR 扩增混合液和试剂准备;
- 2) DNA 文库捕获;
- 3) 乳化;
- 4) 扩增;
- 5) 磁珠回收;
- 6) DNA 文库磁珠富集;
- 7) 测序引物退火,即制得测序所用的 emPCR 产物;

其特征在于,步骤 1) 所述的 emPCR 扩增混合液包括下列各组分:emPCRAdditive, 30.6%~43.0% (v/v); 5× 扩增液, 18.4%~21.5% (v/v); 扩增引物, 2.0%~7.5% (v/v); emPCR 酶混合液, 2.6%~5.9% (v/v); PPIase, 0.1%~0.3% (v/v); 余量为水。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,步骤 1) 所述的 emPCR 扩增混合液包括下列各组分:emPCR Additive, 38.4% (v/v); 5× 扩增液, 20.3% (v/v); 扩增引物, 4.8% (v/v); emPCR 酶混合液, 5.3% (v/v); PPIase, 0.2% (v/v); 余量为水。

3. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述的 emPCR 扩增混合液的总体积为 930 μL ~ 980 μL。

4. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述的 emPCR 扩增混合液的总体积为 937 μL,包括下列各组分:360 μL emPCRAdditive; 180 ~ 200 μL 5× 扩增液; 35 ~ 55 μL 扩增引物; 50 μL emPCR 酶混合液; 2 μL PPIase; 余量为水。

5. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述的 emPCR 扩增混合液的总体积为 937 μL,包括下列各组分:290 μL 超纯水; 360 μL emPCRAdditive; 190 μL 5× 扩增液; 45 μL 扩增引物; 50 μL emPCR 酶混合液; 2 μL PPIase。

6. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,步骤 4) 所述扩增的反应程序为:

- ① 90-95℃, 3-6min;
 - ② 93-95℃, 28-32s;
 - ③ 57-59℃, 4-5min;
 - ④ 66-70℃, 28-32s;
- 步骤②至④共 45-55 个循环;
- ⑤ 4-10℃保存。

7. 如权利要求 6 所述的方法,其特征在于,所述扩增的反应程序中步骤②至④为:

- ② 94-95℃, 28-32s;
- ③ 57-58℃, 4-5min;
- ④ 67-69℃, 28-32s。

8. 如权利要求 6 所述的方法,其特征在于,所述扩增的反应程序中步骤①为 94℃, 4min; 步骤⑤为 10℃保存。

9. 如权利要求 6 所述的方法,其特征在于,所述扩增的反应程序为:

- ① 94℃, 4min;
- ② 94℃, 30s;
- ③ 58℃, 4.5min;

④ 68℃, 30s ;

步骤②至④共 50 个循环 ;

⑤ 10℃保存。

10. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述的高通量测序为基于焦磷酸原理的 454 高通量转录组测序。

一种用于基于焦磷酸原理的 454 高通量测序的 emPCR 方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,特别涉及一种 PCR 技术。更具体的说,本发明涉及一种用于基于焦磷酸原理的 454 高通量测序的 emPCR 方法。

背景技术

[0002] 焦磷酸测序技术是新一代 DNA 序列分析技术,该技术无须进行电泳,DNA 片段也无须进行荧光标记,操作极为简便。焦磷酸测序技术是由 4 种酶催化的同一反应体系中的酶级联化学发光反应,在每一轮测序反应中,只加入一种 dNTP,若该 dNTP 与模板配对,聚合酶就可以将其掺入到引物链中并释放出等摩尔数的焦磷酸基团 (PPi)。PPi 可最终转化为可见光信号,并通过光学系统生成一个峰值。每个峰值的高度与反应中掺入的核苷酸数目成正比,然后加入下一种 dNTP,继续 DNA 链的合成。

[0003] 焦磷酸测序中所使用的模板需要通过一种称为 emPCR 的方法制备得到。目前基于焦磷酸测序原理的 454 高通量测序中的 emPCR 方法属于常规技术,并且市场上也有开发相对成熟的商品可以直接应用。例如采用罗氏公司推出的试剂盒——RocheGS Titanium LV emPCR Kit (Lib-L) v2,按其说明书记载的步骤操作,即可制得测序所需的 emPCR 产物。利用 RocheGSTitanium LV emPCR Kit (Lib-L) v2 试剂盒制备测序所用的 emPCR 产物的步骤如下:

[0004] 1) 乳化油、emPCR 扩增混合液和试剂准备,其中 emPCR 扩增混合液包括下列各组分:

[0005]	4 SV Emulsion	
	体积百分比(v/v)	体积 (μL)

[0006]	超纯水	余量	240
	emPCR Additive	38.4%	360
	5×扩增液	22.4%	210
	扩增引物	8.0%	75
	emPCR 酶混合液	5.3%	50
	PPiase	0.2%	2
	总计	100%	937

[0007] 2) DNA 文库捕获;

[0008] 3) 乳化;

[0009] 4) 扩增, 扩增反应的程序如下所示:

[0010] ① 94℃, 4min;

[0011] ② 94℃, 30s;

[0012] ③ 60℃, 10min;

[0013] 步骤②至③共 50 个循环;

[0014] ④ 10℃保存;

[0015] 5) 磁珠回收;

[0016] 6) DNA 文库磁珠富集;

[0017] 7) 测序引物退火, 即制得测序所用的 emPCR 产物。

[0018] 现有的这种基于焦磷酸原理的 454 高通量测序中 emPCR 的方法对于所构建的文库中片段大小的要求比较苛刻, 如果片段大小差别过大, 就会导致 emPCR 扩增出的磁珠上序列信号强度差异很大, 进而影响后续测序时信号的读取效率及准确性, 产生较多的冗余数据, 使有效数据降低 30% 以上, 同时造成试剂和实验时间的浪费, 增加实验成本。

发明内容

[0019] 本发明所要解决的技术问题是为了克服上述基于焦磷酸原理的 454 高通量测序中的技术缺陷, 提供一种新的用于基于焦磷酸原理的 454 高通量测序的 emPCR 方法。

[0020] 本发明解决上述技术问题所采取的技术方案之一是: 一种用于基于焦磷酸原理的 454 高通量测序中 emPCR 的方法, 其包括如下步骤:

[0021] 1) 乳化油、emPCR 扩增混合液和试剂准备;

[0022] 2) DNA 文库捕获;

[0023] 3) 乳化;

[0024] 4) 扩增;

[0025] 5) 磁珠回收;

[0026] 6) DNA 文库磁珠富集;

[0027] 7) 测序引物退火, 即制得测序所用的 emPCR 产物;

[0028] 其中, 步骤 1) 所述的 emPCR 扩增混合液包括下列各组分: emPCR Additive, 30.6%~43.0% (v/v); 5× 扩增液, 18.4%~21.5% (v/v); 扩增引物, 2.0%~7.5% (v/v); emPCR 酶混合液, 2.6%~5.9% (v/v); PPiase, 0.1%~0.3% (v/v)。上述各组分均为 RocheGS Titanium LV emPCR Kit (Lib-L) v2 试剂盒自带产品。

[0029] 较佳的, emPCR 扩增混合液包括下列各组分: emPCR Additive, 38.4% (v/v); 5× 扩增液, 20.3% (v/v); 扩增引物, 4.8% (v/v); emPCR 酶混合液, 5.3% (v/v); PPiase, 0.2% (v/v); 余量为水。

[0030] 本发明中, 所述的水是本领域常规的用于测序的水, 优选超纯水。

[0031] 本发明中, 所述的 emPCR 扩增混合液的总体积是本领域基于焦磷酸原理的 454 高通量测序中所采用的常规总体积, 一般为 930 μl ~ 980 μl, 本发明最佳的是 937 μL。

[0032] 本发明的一较佳实例为, 步骤 1) 所述的 emPCR 扩增混合液的总体积为 937 μL, 包括下列各组分: 360 μL emPCR Additive; 180 ~ 200 μL 5× 扩增液; 35 ~ 55 μL 扩增引物; 50 μL emPCR 酶混合液; 2 μL PPiase; 其余为水。各组分含量如下表所示:

[0033]

	4 SV Emulsion
	体积 (μL)
超纯水	余量
emPCR Additive	360
5×扩增液	180~200
扩增引物	35~55
emPCR 酶混合液	50
PPiase	2
总计	937

[0034] 本发明的一最佳实例为,步骤 1) 所述的 emPCR 扩增混合液的总体积为 937 μL,包括下列各组分:290 μL 超纯水;360 μL emPCRAdditive;190 μL 5× 扩增液;45 μL 扩增引物;50 μL emPCR 酶混合液;2 μL PPiase。各组分含量如下表所示:

[0035]

	现有技术	本发明	4 SV Emulsion
	体积百分比 (v/v)	体积百分比 (v/v)	体积 (μL)
超纯水	余量	余量	290
emPCR Additive	38.4%	38.4%	360
5×扩增液	22.4%	20.3%	190
扩增引物	8.0%	4.8%	45
emPCR 酶混合液	5.3%	5.3%	50
PPiase	0.2%	0.2%	2
总计	100%	100%	937

[0036] 较佳地,在本发明中,步骤 4) 所述扩增的反应程序如下所示:

[0037] ① 90-95℃,3-6min;

[0038] ② 93-95℃,28-32s;

[0039] ③ 57-59℃,4-5min;

[0040] ④ 66-70℃,28-32s;

[0041] 步骤②至④共 45-55 个循环;

[0042] ⑤ 4-10℃保存。

[0043] 更佳地,扩增反应程序步骤②至④中循环数为 48-52,最优选 50。

[0044] 更佳地,扩增反应程序步骤②至④为② 94-95℃,28-32s;③ 57-58℃,4-5min;④ 67-69℃,28-32s;最优选② 94℃,30s;③ 58℃,4.5min;④ 68℃,30s。

[0045] 本发明的一最佳实例中,步骤 4) 所述扩增的反应程序为:

[0046] ① 94℃,4min;

[0047] ② 94℃,30s;

[0048] ③ 58℃,4.5min;

[0049] ④ 68℃,30s;

[0050] 步骤②至④共 50 个循环;

[0051] ⑤ 10℃保存。

[0052] 本发明所述的用于基于焦磷酸原理的 454 高通量测序的 emPCR 方法中,其他的步骤都采用本领域常规方法和条件,可参阅罗氏公司试剂盒 RocheGSTitanium LV emPCR Kit(Lib-L)v2 中的工作手册——《Roche, emPCR Amp-Lib L SV Method Manual_XL+_May2011》上所记载的方法。

[0053] 本发明的 emPCR 方法用于基于焦磷酸原理的 454 高通量测序,所述的 454 高通量测序可以是 454 高通量转录组测序,也可以是 454 高通量基因组测序或者其他 454 高通量测序,优选 454 高通量转录组测序。

[0054] 本发明的积极进步效果在于:本发明在配制 emPCR 扩增混合液的过程中,将 emPCR Additive、5× 扩增液、扩增引物、emPCR 酶混合液和超纯水的用量做了优化调整;在进行扩增反应时对扩增程序进行了优化改良,由一步扩增改为两步扩增。采用本发明所述的 emPCR 方法能够有效降低非特异性扩增信号,减少冗余的数据,使有效数据的产量提高 30%,同时提高了实验效率,节约了实验成本。

具体实施方式

[0055] 下面结合实施例对本发明作进一步说明。应理解,以下实施例仅用于说明本发明而非用于限定本发明的范围。下述实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件或按照制造厂商所建议的条件进行。

[0056] 实施例 1

[0057] 本实施例采用本发明所述方法制备基于焦磷酸原理的 454 高通量测序所需的 emPCR 产物,所用试剂如无特别说明,均采用 Roche GS Titanium LVemPCR Kit(Lib-L)v2 试剂盒中的自带试剂,包括以下步骤。

[0058] 1、乳化油、emPCR 扩增混合液和试剂准备;

[0059] 1) 将乳化油放于 TissueLyser tube 架 (Qiagen 公司生产) 上。

[0060] 2) 25Hz 的频率震荡 2min。

[0061] 3) 移走震荡完成的乳化油。

[0062] 4) 以 4ml 超纯水稀释 1ml 5×Mock Amplification Mix,涡旋震荡制成 1× 浓度的工作液。

[0063] 5) 将震荡完成的乳化油按 600 μL/ 离心管分装到 1.7ml 离心管中。

- [0064] 6) 向每管乳化油中加入 290 μL 稀释后的 MockAmplification Mix。
- [0065] 7) 上下颠倒 3 次混匀,固定于 TissueLyser(Qiagen 公司生产)。
- [0066] 8) 5Hz 的频率震荡 5min。
- [0067] 9) 取下 Emulsion 管。
- [0068] 10) 配制 emPCR 扩增混合液:根据 Emulsion 反应量配制 emPCR 扩增混合液。按下述顺序添加各组分,配制 937 μL 的扩增混合液。涡旋振荡扩增液 5s,并储存于冰上。

[0069]

	4 SV Emulsion
	体积 (μL)
超纯水	290
emPCR Additive	360
5 $\times$ 扩增液	190
扩增引物	45
emPCR 酶混合液	50
PPiase	2
总计	937

- [0070] 2、DNA 文库捕获
- [0071] 1) 加入 9ml 的超纯水,将 1ml 的 10 $\times$ Capture Bead Wash Buffer TW 稀释至 1 $\times$ 的工作液。
- [0072] 2) 涡旋震荡 DNA Capture Beads。
- [0073] 3) 向 1.7ml 的离心管中按每个 Emulsion 反应 80 μL 加入 DNA CaptureBeads。
- [0074] 4) 离心 10s 后,旋转 180 $^{\circ}$ 后再次离心 10s,沉淀珠子。
- [0075] 5) 小心移去上清,注意不要碰到珠子。
- [0076] 6) 加入 1ml 的 1 $\times$ Capture Bead Wash Buffer TW,涡旋震荡重悬珠子进行清洗,此步骤重复两次,离心后吸去上清。
- [0077] 7) 将清洗后的 Capture Beads 分配至单个 Emulsion 反应的量:
- [0078] a. 用 40 $\times$ Emulsion 反应数的量的 Capture Bead Wash Buffer TW 重悬每份 DNA Capture Beads。
- [0079] b. 测量 DNA Capture Beads 悬浮液的总体积,然后均匀分配至 1.7ml 离心管中。
- [0080] c. 按照 2 中 4) 的方法和步骤沉淀珠子,吸除上清。
- [0081] 8) 解冻需要扩增的 DNA 文库:
- [0082] 控制稀释的文库体积在 1 ~ 15 μL 之间,PCR 仪上加热变性 DNA 文库,95 $^{\circ}\text{C}$,2min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。
- [0083] 9) 计算所需的 DNA 文库的体积,并加入到清洗后的 DNA CaptureBeads 中。
- [0084] 方程式:

[0085]

$$\text{每管所需文库体积} = \frac{\text{每个珠子所需模板分子数} \times 2.4 \times 10^6 \text{个珠子}}{\text{文库浓度 (分子数/微升)}}$$

[0086] 10) 涡旋震荡 5s, 充分混匀得文库捕获混合液。

[0087] 11) 加入 215 μL 扩增混合液至文库捕获混合液中, 涡旋震荡。

[0088] 3. 乳化

[0089] 1) 吸取捕获好的文库 (2 制备) 加入到 Emulsion 管中。

[0090] 2) 上下颠倒管架 3 次混匀后, 置于 TissueLyser。

[0091] 3) 15Hz 震动 5min。

[0092] 4. 扩增

[0093] 4.1 分配乳化试剂

[0094] 1) 乳化后, 将 emPCR 扩增混合液分配至 96 孔 PCR 板中, 每孔 100 μL 。每管 emPCR 扩增混合液可分配 10 个孔。密封 PCR 板。

[0095] 2) 清洗溅出的反应混合液。

[0096] 4.2 扩增反应, 其反应程序为:

[0097] ① 94°C, 4min;

[0098] ② 94°C, 30s;

[0099] ③ 58°C, 4.5min;

[0100] ④ 68°C, 30s;

[0101] 步骤②至④共 50 个循环;

[0102] ⑤ 10°C 保存。

[0103] 5. 磁珠回收

[0104] 5.1 收集乳化液和初步清洗

[0105] 1) 取出 Enhancing Fluid XT 和 Annealing Butter XT, 保持在室温下。

[0106] 2) 装配平端针头至一次性无菌 10ml 注射器末端, 每个样品匹配一个注射器。

[0107] 3) 将各样品的乳化液吸到合适数量的注射器中。

[0108] 4) 各孔中加入 100 μL 异丙醇, 上下吸取混匀。

[0109] 5) 从孔中吸取异丙醇溶液。

[0110] 6) 二次吸取孔中剩余溶液。

[0111] 7) 颠倒注射器并吸入 3ml 空气。

[0112] 8) 除掉平端针头。

[0113] 9) 将蓝色过滤器装至注射器末端。

[0114] 10) 将 Kimwipe 无尘擦拭纸 (Fisher Scientific 公司产品, 编号 06-666A) 放至涡旋平台, 注射器末端置于涡旋振荡器震荡 5s。

[0115] 11) 通过过滤器将注射器内容物排出。

[0116] 5.2 磁珠清洗与回收

[0117] 1) 颠倒注射器, 吸入 3ml 空气。

[0118] 2) 吸入 3-5ml 异丙醇。

[0119] 3) 过滤器向下指向 Kimwipe, 最大速漩涡注射器 5s。

- [0120] 4) 通过过滤器将注射器内容物排出。
- [0121] 5) 重复 1) 到 4) 步 2 次。
- [0122] 6) 颠倒注射器,吸入 3ml 空气。
- [0123] 7) 吸入 3ml Enhancing Fluid XT,不要吸入空气。
- [0124] 8) 过滤器向下指向 Kimwipe,最大速漩涡注射器 5s。
- [0125] 9) 通过过滤器将注射器内容物排出。
- [0126] 10) 重复 6) 到 9) 步 2 次。
- [0127] 11) 颠倒注射器,吸入 3ml 空气。
- [0128] 12) 吸入 Enhancing Fluid XT 至 0.5ml 刻度处,不要吸入空气。
- [0129] 13) 过滤器向下指向 Kimwipe,最大速漩涡注射器 5s。
- [0130] 14) 迅速地颠倒注射器,吸入额外 3ml 空气。
- [0131] 15) 去掉(不要丢掉)过滤器,将珠子悬浮液打到一个新的 1.5ml EP 管中。
- [0132] 16) 离心 1.5ml EP 管 10s,旋转 180°,再离心 5s。吸除上清。
- [0133] 17) 颠倒注射器,吸入 3ml 空气。
- [0134] 18) 将过滤器装回注射器,吸入 Enhancing Fluid XT 至 0.5ml 刻度处,不要吸入空气。
- [0135] 19) 过滤器向下指向 Kimwipe,最大速漩涡 5s。
- [0136] 20) 迅速地颠倒注射器,吸入额外的 3ml 空气。
- [0137] 21) 去掉过滤器,将珠子悬浮液打到同一 1.5ml EP 管中。
- [0138] 22) 丢弃注射器和过滤器。
- [0139] 6. DNA 文库磁珠富集
- [0140] 6.1 富集前准备
- [0141] 1) 打开干式加热器(Labnet 公司生产),设置为 65℃。
- [0142] 2) 混合 125 μ L 10N NaOH(Amresco 公司生产)和 9.875ml 超纯水,配制成 Melt Solution。
- [0143] 3) 离心旋转 180° 再离心 EP 管,吸除上清。
- [0144] 4) 每管中加入 1ml Melt Solution,漩涡。室温孵育 2min。离心旋转 180° 再离心,吸除上清。
- [0145] 5) 重复 4) 步一次。
- [0146] 6) 每管中加入 1ml Annealing Buffer XT,漩涡。离心旋转 180° 再离心,吸除上清。
- [0147] 7) 重复 6) 步一次。
- [0148] 8) 每管中加入 30 μ L Annealing Buffer XT,12 μ L 的 Enrichment Primer,漩涡。
- [0149] 9) 放置于 65℃干式加热器上 5min,之后迅速放至冰上 2min。
- [0150] 10) 每管加入 500 μ L Enhancing Fluid XT,漩涡。离心旋转 180° 再离心,吸除上清。
- [0151] 11) 重复步骤 10) 一次。
- [0152] 12) 每管中加入 800 μ L Enhancing Fluid XT,漩涡。
- [0153] 6.2 准备富集珠子

- [0154] 1) 涡旋震荡棕色的“Enrichment Beads”管 1min, 使其充分重悬。
- [0155] 2) 将管子置于磁力架 (Invitrogen 公司生产) 上, 富集磁珠。
- [0156] 3) 吸除上清, 小心不要吸到磁珠。取下。
- [0157] 4) 加入 500 μ L Enhancing Fluid XT, 涡旋震荡。
- [0158] 5) 置于磁力架上, 吸附 Enrichment Beads。
- [0159] 6) 吸除上清, 小心不要吸到磁珠。
- [0160] 7) 重复 4-6 步。
- [0161] 8) 吸除上清后, 将其从磁力架上取下。
- [0162] 9) 按每 emulsion oil 管 20 μ L 加入 Enhancing Fluid XT, 涡旋震荡。
- [0163] 6.3 富集携带 DNA 片段的磁珠
- [0164] 1) 向每管清洗过的 Capture Beads 管中加入清洗过的 EnrichmentBeads 40 μ L。
- [0165] 2) 室温下在混合器上旋转 5min。
- [0166] 3) 将各管放至磁力架上, 等待 3-5min, 使磁珠吸附到磁力架上。
- [0167] 4) 颠倒磁力架几次。
- [0168] 5) 用 1000 μ L 吸头小心地吸除上清, 不要干扰到磁珠。
- [0169] 6) 按以下方法用 Enhancing Fluid XT 清洗磁珠, 直到上清中无可见珠子:
- [0170] A. 每管中加入 1ml Enhancing Fluid XT;
- [0171] B. 将各管从磁力架上取下, 漩涡;
- [0172] C. 将各管放回磁力架上, 使磁珠吸附到管壁, 颠倒磁力架;
- [0173] D. 用 1000 μ L 吸头小心地吸除每管中的上清;
- [0174] E. 重复 6-10 次直到上清中无可见珠子。
- [0175] 6.4 收集富集好的连有 DNA 片段磁珠
- [0176] 1) 将各管从磁力架上取下, 加入 700 μ L 的 Melt Solution 重悬磁珠。
- [0177] 2) 漩涡 5s, 将各管放回磁力架直至 Enrichment Beads 吸附到管壁。
- [0178] 3) 将各管中的上清转移到 1.5ml EP 管中。
- [0179] 4) 离心旋转 180° 再离心, 吸除上清。
- [0180] 5) 向各原管中再加入一次 700 μ L Melt Solution。
- [0181] 6) 漩涡 5s, 将各管放回磁力架上, 直至 Enrichment Beads 吸附到管壁。
- [0182] 7) 转移上清至同一个 1.5ml EP 管中。
- [0183] 8) 丢弃原管。
- [0184] 9) 离心旋转 180° 再离心, 吸除上清。
- [0185] 10) 向各管中加入 500 μ L Annealing Buffer XT, 漩涡 5s。
- [0186] 11) 离心旋转 180° 再离心, 去除上清。
- [0187] 12) 重复 10) 到 11) 步 2 次。
- [0188] 13) 各管中加入 60 μ L 的 Annealing Buffer XT, 漩涡重悬浮珠子。
- [0189] 7. 测序引物退火
- [0190] 1) 加入 12 μ L 的测序引物, 涡旋振荡混匀。
- [0191] 2) 干式加热器中, 65°C 加热 5min, 后迅速放于冰上 2min。
- [0192] 3) 每管中加入 500 μ L Annealing Buffer XT, 涡旋振荡 5s, 离心旋转 180° 再离

心,去除上清。

[0193] 4) 用 500 μ L Annealing Buffer 重复步骤 3) 两次。

[0194] 5) 各管中加入 1ml Annealing Buffer,涡旋震荡。

[0195] 6) 计数珠子,计算富集的百分率:

[0196]

$$\text{磁珠富集百分比} = \frac{\text{计数的珠子}}{2.4 \times 10^6 \times \text{emulsion反应数}} \times 100\%$$

[0197] 通过上述各步骤即得测序所用的 emPCR 产物。

[0198] 实施例 2

[0199] 本实施例的所有方法和步骤同实施例 1,其不同之处包括以下两点:

[0200] 一、步骤 1 中第 1) 步所述的 emPCR 扩增混合液包括下列各组分:

[0201]

	4 SV Emulsion
	体积 (μ L)
超纯水	309
emPCR Additive	350
5 $\times$ 扩增液	200
扩增引物	20
emPCR 酶混合液	50
PPiase	1
总计	930

[0202] 二、步骤 4.2 的扩增反应中,其反应程序为:

[0203] ① 90 $^{\circ}$ C, 3min;

[0204] ② 95 $^{\circ}$ C, 28s;

[0205] ③ 57 $^{\circ}$ C, 5min;

[0206] ④ 66 $^{\circ}$ C, 32s;

[0207] 步骤②至④共 45 个循环;

[0208] ⑤ 4 $^{\circ}$ C 保存。

[0209] 实施例 3

[0210] 本实施例的所有方法和步骤同实施例 1,其不同之处包括以下两点:

[0211] 一、步骤 1 中第 1) 步所述的 emPCR 扩增混合液包括下列各组分:

[0212]

	4 SV Emulsion
	体积 (μL)
超纯水	327
emPCR Additive	400
5×扩增液	180
扩增引物	45
emPCR 酶混合液	25
PPiase	3
总计	980

[0213] 二、步骤 4.2 的扩增反应中,其反应程序为:

[0214] ① 94℃,4min;

[0215] ② 93℃,32s;

[0216] ③ 59℃,4min;

[0217] ④ 70℃,28s;

[0218] 步骤②至④共 55 个循环;

[0219] ⑤ 10℃保存。

[0220] 实施例 4

[0221] 本实施例的所有方法和步骤同实施例 1,其不同之处包括以下两点:

[0222] 一、步骤 1 中第 1) 步所述的 emPCR 扩增混合液包括下列各组分:

[0223]

	4 SV Emulsion
	体积 (μL)
超纯水	318
emPCR Additive	300
5×扩增液	200
扩增引物	70
emPCR 酶混合液	50
PPiase	2
总计	940

[0224] 二、步骤 4.2 的扩增反应中,其反应程序为:

- [0225] ① 94℃, 4min ;
 [0226] ② 94℃, 30s ;
 [0227] ③ 58℃, 5min ;
 [0228] ④ 68℃, 30s ;
 [0229] 步骤②至④共 50 个循环 ;
 [0230] ⑤ 10℃保存。
 [0231] 实施例 5
 [0232] 本实施例的所有方法和步骤同实施例 1, 其不同之处包括以下两点 :
 [0233] 一、步骤 1 中第 1) 步所述的 emPCR 扩增混合液包括下列各组分 :

[0234]		4 SV Emulsion
		体积 (μL)
	超纯水	303
	emPCR Additive	380
	5×扩增液	190

[0235]	扩增引物	50
	emPCR 酶混合液	55
	PPiase	2
	总计	980

- [0236] 二、步骤 4.2 扩增反应中, 其反应程序为 :

- [0237] ① 95℃, 6min ;
 [0238] ② 94℃, 30s ;
 [0239] ③ 57℃, 5min ;
 [0240] ④ 68℃, 31s ;
 [0241] 步骤②至④共 50 个循环 ;
 [0242] ⑤ 10℃保存。
 [0243] 效果实施例 1

- [0244] 现在结合效果实施例对本发明作进一步的说明。

[0245] 本效果实施例分别比较了通过罗氏公司试剂盒 RocheGS Titanium LVemPCR Kit(Lib-L)v2 中的工作手册——《Roche, emPCR Amp-Lib L SVMETHOD Manual_XL+_May2011》上所记载的方法即现有技术制备的 emPCR 产物和通过实施例 1 所述方法制备的 emPCR 产物用于基于焦磷酸原理的 454 高通量测序中的效果, 结果如下表所示 :

- [0246]

	emPCR 产物来源途径	
	现有技术	本发明实施例 1
原始序列数	486620 条	441813 条
通过过滤序列数	165845 条	277732 条
通过过滤序列比例	35.42%	64.63%
平均读长	361.37bp	475.67bp

[0247]

总数据量	59.9M	132M
平均质量	31.45	32.08

[0248] 从上述表格可以看出,采用本发明所述方法制备的 emPCR 产物在用于基于焦磷酸原理的 454 高通量测序中,其通过过滤序列的比例与现有技术相比有了很大程度的提高,平均读长和总数据量也大幅度提高。因此,在基于焦磷酸原理的 454 高通量测序的科研和生产实践中,采用本发明所述方法可以有效降低非特异性扩增信号,减少冗余的数据,使有效数据的产量提高 30%,从而提高了实验效率,节约了实验成本。

[0249] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。