



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113337501 B

(45) 授权公告日 2022. 02. 18

(21) 申请号 202110898938.X
 (22) 申请日 2021.08.06
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 113337501 A
 (43) 申请公布日 2021.09.03
 (73) 专利权人 北京橡鑫生物科技有限公司
 地址 102600 北京市大兴区北京经济技术
 开发区科创十三街18号院5号楼16层
 1601
 专利权人 天津橡鑫生物科技有限公司
 天津橡鑫医疗器械有限公司
 (72) 发明人 楼峰 刘磊 王旺 孙宏 曹善柏
 (74) 专利代理机构 北京维正专利代理有限公司
 11508
 代理人 李爱民

(51) Int.Cl.
 G12N 15/11 (2006.01)
 G40B 50/06 (2006.01)
 (56) 对比文件
 CN 112941635 A, 2021.06.11
 CN 110396534 A, 2019.11.01
 CN 112626189 A, 2021.04.09
 CN 111599407 A, 2020.08.28
 CN 111243673 A, 2020.06.05
 CN 107988320 A, 2018.05.04
 CN 111455469 A, 2020.07.28
 CN 110452958 A, 2019.11.15
 CN 112708619 A, 2021.04.27
 CN 110331187 A, 2019.10.15
 审查员 刘波

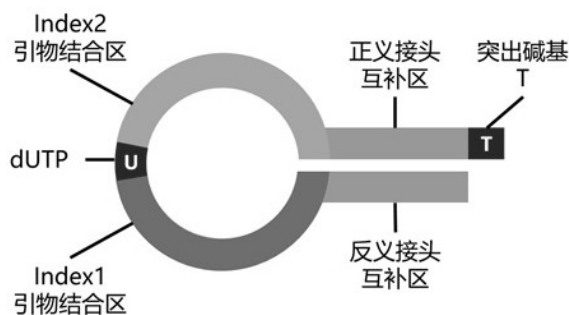
权利要求书1页 说明书11页
 序列表7页 附图2页

(54) 发明名称

一种发卡型接头及其在双端index建库中的应用

(57) 摘要

本申请属于核酸测序技术领域,具体公开了一种发卡型接头,其包括index1引物结合区、脱氧尿嘧啶核苷酸、index2引物结合区、反义接头互补区和正义接头互补区,所述index1引物结合区通过脱氧尿嘧啶核苷酸与index2引物结合区连接;所述正义接头互补区与所述反义接头互补区分别连接于所述index1引物结合区和index2引物结合区,所述正义接头互补区与所述反义接头互补区完全互补配对。本申请至少具有以下有益效果之一:本申请提供的发卡型接头,将其应用于双端index建库时,能够显著提高文库产量。



1. 一种发卡型接头,其特征在于,包括index1引物结合区、脱氧尿嘧啶核苷酸、index2引物结合区、反义接头互补区和正义接头互补区,所述index1引物结合区通过脱氧尿嘧啶核苷酸与index2引物结合区连接;所述正义接头互补区与所述反义接头互补区分别连接于所述index1引物结合区和index2引物结合区,所述正义接头互补区与所述反义接头互补区完全互补配对,所述发卡型接头还包括UMI序列,所述UMI序列如下表所示:

UMI ID	序列	UMI ID	序列	UMI ID	序列	UMI ID	序列
UMI_1	CAAG	UMI_9	CATG	UMI_17	ACGT	UMI_25	GACC
UMI_2	GTAA	UMI_10	CTTT	UMI_18	GGTC	UMI_26	CAAC
UMI_3	ATGC	UMI_11	GGGA	UMI_19	CTAC	UMI_27	TTAA
UMI_4	CCAC	UMI_12	CTGC	UMI_20	GACT	UMI_28	AGTA
UMI_5	GCTG	UMI_13	GCGC	UMI_21	TAGC	UMI_29	ATCC
UMI_6	GCTT	UMI_14	CCTT	UMI_22	GCAA	UMI_30	TTGC
UMI_7	GATC	UMI_15	GTGT	UMI_23	TCGC	UMI_31	ACCT
UMI_8	AACC	UMI_16	TTCA	UMI_24	CGAG	UMI_32	AGAC

所述UMI序列分别通过补充碱基T连接于正义接头互补区的3'端和通过补充碱基A连接于反义接头互补区的5'端。

2. 根据权利要求1所述的发卡型接头,其特征在于,所述发卡型接头,由5'端到3'端依次包括:反义接头互补区、index1引物结合区、脱氧尿嘧啶核苷酸、index2引物结合区和正义接头互补区。

3. 根据权利要求1所述的发卡型接头,其特征在于,还包括突出碱基T,所述突出碱基T连接于所述发卡型接头的3'端。

4. 根据权利要求1所述的发卡型接头,其特征在于,所述突出碱基T经过硫代修饰。

5. 权利要求1-4任一项所述的发卡型接头在双端index建库中的应用。

一种发卡型接头及其在双端index建库中的应用

技术领域

[0001] 本申请属于核酸测序技术领域,更具体地说,它涉及一种用于核酸检测的发卡型接头及其在双端index建库中的应用。

背景技术

[0002] 2001年首个人类基因组草图绘制完成,耗时13年,耗费资金超过30亿美元。在随后的12年中,测序技术迎来了快速发展期,到2013年,Illumina推出的Novaseq6000测序仪,使全基因组测序进入100美元时代。随着华大智造基于DNBSEQ技术的多款测序平台的相继发布,NGS单Gb数据成本已降至5美金。测序成本大大降低,为NGS在临床诊断中的应用提供了强大助力。但在DNBSEQ技术测序时,存在接头不稳定,文库产量低的问题。

发明内容

[0003] 基于此,为了提高文库产量,本申请提供一种发卡型接头,该接头用于双端index建库时,能够显著提高文库的产量。

[0004] 本申请是通过以下方案实现的:

[0005] 本申请提供一种发卡型接头,其包括index1引物结合区、脱氧尿嘧啶核苷酸、index2引物结合区、反义接头互补区和正义接头互补区,所述index1引物结合区通过脱氧尿嘧啶核苷酸与index2引物结合区连接;所述正义接头互补区与所述反义接头互补区分别连接于所述index1引物结合区和index2引物结合区,所述正义接头互补区与所述反义接头互补区完全互补配对。

[0006] 本申请通过脱氧尿嘧啶核苷酸将index1引物结合区和index2引物结合区相连接形成发卡型的接头,有助于接头寡核苷酸链在接头制备过程中形成正确的二级结构。将该接头应用于双端index建库时,能够有效提高文库的产量。

[0007] 在本申请的一个具体实施方式中,所述脱氧尿嘧啶核苷酸的长度为1-20bp。

[0008] 在本申请的一个具体实施方式中,所述发卡型接头,由5'端到3'端依次包括:反义接头互补区、index1引物结合区、脱氧尿嘧啶核苷酸、index2引物结合区和正义接头互补区。

[0009] 在本申请的一个具体实施方式中,所述发卡型接头还包括突出碱基T,所述突出碱基T连接于所述发卡型接头的3'端。

[0010] 在本申请的一个具体实施方式中,所述突出碱基T经过硫代修饰。

[0011] 在本申请一个具体实施方式中,所述正义接头互补区和/或所述反义接头互补区的1个或多个核苷酸经过LNA修饰。

[0012] 在本申请一个具体实施方式中,所述正义接头互补区和/或所述反义接头互补区的1-14核苷酸经过LNA修饰。例如,经LNA修饰的核苷酸为1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个或14个。

[0013] 在本申请一个具体实施方式中,所述正义接头互补区的核苷酸经过LNA修饰。

- [0014] 在本申请的一个具体实施方式中,所述LNA修饰的核苷酸为A和/或T。
- [0015] 在本申请的一个具体实施方式中,所述正义接头互补区的A和T均经过LNA修饰。
- [0016] 在本申请的一个具体实施方式中,所述发卡型接头还包括UMI序列。
- [0017] 在本申请的一个具体实施方式中,所述UMI序列分别通过补充碱基T连接于正义接头互补区的3'端和通过补充碱基A连接于反义接头互补区的5'端。
- [0018] 在本申请的一个具体实施方式中,所述UMI的长度为2-6bp。例如,所述UMI的长度为2bp,3bp,4bp,5bp或6bp,优选地,所述UMI的长度4bp。
- [0019] 在本申请的一个具体实施方式中,所述UMI序列如下表所示。

UMI ID	序列	UMI ID	序列	UMI ID	序列	UMI ID	序列
UMI_1	CAAG	UMI_9	CATG	UMI_17	ACGT	UMI_25	GACC
UMI_2	GTAA	UMI_10	CTTT	UMI_18	GGTC	UMI_26	CAAC
UMI_3	ATGC	UMI_11	GGGA	UMI_19	CTAC	UMI_27	TTAA
UMI_4	CCAC	UMI_12	CTGC	UMI_20	GACT	UMI_28	AGTA
UMI_5	GCTG	UMI_13	GCGC	UMI_21	TAGC	UMI_29	ATCC
UMI_6	GCTT	UMI_14	CCTT	UMI_22	GCAA	UMI_30	TTGC
UMI_7	GATC	UMI_15	GTGT	UMI_23	TCGC	UMI_31	ACCT
UMI_8	AACC	UMI_16	TTCA	UMI_24	CGAG	UMI_32	AGAC

- [0020] 在本申请的一个具体实施方式中,所述发卡型接头的5'端经过磷酸化修饰。
- [0022] 在本申请的一个具体实施方式中,所述发卡型接头序列为:
- [0023] /5phos/AGTCGGAGGCCAAGCGGTCTTAGGAAGACUGAACGACATGGCTACGATCCGACT*T,*T表示碱基T经过硫代修饰。
- [0024] 在本申请的一个具体实施方式中,经过LNA修饰的发卡型接头序列为:
- [0025] /5phos/AGTCGGAGGCCAAGCGGTCTTAGGAAGACUGAACGACATGGCTACGA/iXNA_T/CCG/iXNA_A/C/iXNA_T/*T,/iXNA_T/表示碱基T被LNA修饰;/iXNA_A/表示碱基A被LNA修饰,*T表示碱基T经过硫代修饰。
- [0026] 其中,/iXNA_T/表示碱基T被LNA修饰;/iXNA_A/表示碱基A被LNA修饰。
- [0027] 在本申请的一个具体实施方式中,所述index1引物结合区的长度为20-31bp。例如所述index1引物结合区的长度为20bp、21bp、22bp、23bp、24bp、25bp、26bp、27bp、28bp、29bp、30bp或31bp优选地,所述index1引物结合区的长度为24bp。
- [0028] 在本申请的一个具体实施方式中,所述index2引物结合区的长度为20-41bp。例如,所述index2引物结合区的长度为20bp、21bp、22bp、23bp、24bp、25bp、26bp、27bp、28bp、29bp、30bp、31bp、32bp、33bp、34bp、35bp、36bp、37bp、38bp、39bp、40bp或41bp优选地,所述index2引物结合区的长度为22bp。
- [0029] 本申请另一方面提供上述发卡型接头在双端index建库中的应用。
- [0030] 本申请另一方面提供上述发卡型接头在MGISEQ测序平台或DNBSEQ测序平台中的应用。
- [0031] 本申请提供的发卡型接头至少具有以下有益效果之一:
- [0032] 本申请提供的发卡型接头,将其应用于双端index建库时,能够显著提高文库产

量。

附图说明

[0033] 图1为本申请实施例中提供的发卡型接头的结构示意图。

[0034] 图2为本申请实施例中提供的分别利用发卡型接头与标准接头建库的文库产量图。

[0035] 图3为本申请实施例中提供的含有UMI标签的发卡型接头的结构示意图。

[0036] 图4为本申请实施例中提供的分别利用发卡型接头、修饰发卡型接头以及含有UMI标签的发卡型接头建库的文库产量图。

具体实施方式

[0037] 除非另有定义,本申请中使用的所有技术和科学术语具有与本申请所述技术领域的普通技术人员通常理解的含义。

[0038] 下面将结合本申请实施例,对本申请的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅是本申请一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本申请中的实施例,本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本申请保护的范畴。实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市售购买获得的常规产品。

[0039] 本申请中的发卡型接头包括反义接头互补区,index1引物结合区,脱氧尿嘧啶核苷酸(dUTP,简写U),index2引物结合区,正义接头互补区和一个突出的腺苷酸脱氧核苷酸(dTTP,简写T),index1引物结合区和index2引物结合区通过U相连接,正义接头互补区和反义接头互补区分别连接于index2引物结合区和index1引物结合区的两端,正义接头互补区和反义接头互补区可以互补配对形成发卡型。

[0040] 实施例1 发卡型接头

[0041] 如图1所示,本实施例中发卡型接头从5'端到3'端依次为:反义接头互补区、index1引物结合区、U、index2引物结合区和正义接头互补区。本实施例中正义接头互补区与反义接头互补区完全互补配对,在3'端还连接有突出的碱基T。

[0042] 本实施例中突出的碱基T经过硫代修饰(以下序列中用“*T”表示)。

[0043] 本实施例中的发卡型接头的5'端磷酸化修饰(以下序列中用“/5phos/”表示)。

[0044] 本实施例中发卡型接头的具体序列如下:

[0045] /5phos/AGTCGGAGCCAAGCGGTCTTAGGAAGACUGAACGACATGGCTACGATCCGACT*T,*T表示碱基T经过硫代修饰。

[0046] 其中,

[0047] 反义接头互补区序列为AGTCGGA;

[0048] index1引物结合区序列为GGCCAAGCGGTCTTAGGAAGAC;

[0049] index2引物结合区序列为GAACGACATGGCTACGA;

[0050] 正义接头互补区序列为TCCGACT。

[0051] 本申请中,正义接头互补区部分核苷酸序列或者全部核苷酸序列也可以作为index2引物结合区的一部分,其能够与index2引物特异性结合。

[0052] 本申请中,反义接头互补区部分核苷酸序列或者全部核苷酸序列可以作为index1引物结合区的一部分,其能够与index1引物特异性结合。

[0053] 本实施例中,正义接头互补区全部核苷酸序列作为index2引物结合区的一部分,能够与index2引物特异性结合。

[0054] 发卡型接头的制备过程具体如下:

[0055] (1)按照发卡型接头的序列合成寡核苷酸链,取合成的寡核苷酸链10nmol,向其中加入100 μ L的接头退火缓冲液(10mM Tris, pH7.5-8.0, 50mM NaCl, 1mM EDTA),充分混匀,离心,室温静置溶解10min,制备成摩尔浓度为100 μ M的接头工作液;

[0056] (2)取接头工作液50 μ L至新的PCR管中,震荡混匀,离心,置于PCR仪中按照表1中的程序进行梯度降温退火,得到发卡型接头母液,使用时使用接头退火缓冲液稀释至15 μ M。

[0057] 表1 接头退火PCR程序

温度 ($^{\circ}$ C)	时间 (min)	降温速率
95	10	1%
70	10	
65	10	
60	10	
55	10	
50	10	
45	10	
40	10	
35	10	
30	10	
25	10	
20	10	
4	∞	

[0059] 注:NA表示不适用。

[0060] 实施例2 双端index建库

[0061] 建库时,发卡型接头建库PCR引物序列如下:

[0062] 发卡接头index Primer_F:

[0063] TCTCAGTACGTCAGCAGTTNNNNNNNNNCAACTCCTTGGCTCACAGAACGACATGGCTACGATCCGAC*T,其中N为index序列,*T表示碱基T经过硫代修饰。

[0064] 发卡接头index Primer_R:

[0065] GGCATGGCGACCTTATCAGNNNNNNNNNTTGTCTTCCTAAGACCGCTTGGC*C,其中N为index序列,*C表示碱基C经过硫代修饰。

[0066] 利用实施例1中的发卡型接头和NadPrep[®] 快速DNA酶切文库构建试剂盒(for MGI)(纳昂达(南京)生物)进行双端index建库的具体方法如下:

[0067] (1) DNA片段化

[0068] 以NA12878细胞系的DNA(购自Coriell Institute)为样本,按照表2配制DNA片段化反应体系,并按照表3中的程序进行PCR得到片段化DNA,置于冰盒上备用。

[0069] 表2 DNA片段化反应体系

组分	单反应体积 (μL)
DNA 样本 (10ng/ μL)	10
Fragmentase Buffer	3
Fragmentase	2
总体积	15

[0071] 表3 DNA片段化反应程序

温度	时间
25 $^{\circ}\text{C}$	30min
60 $^{\circ}\text{C}$	10min
4 $^{\circ}\text{C}$	Hold

[0073] (2) 末端修复及加“A”

[0074] 向步骤(1)反应体系中,加入3 μL End Repair & A-Tailing Mix,混合均匀,按照表4中的程序进行PCR反应,得到末端修复及加“A”产物,置于冰盒上备用。

[0075] 表4末端修复及加“A”反应程序

温度	时间
65 $^{\circ}\text{C}$	10min
4 $^{\circ}\text{C}$	Hold

[0077] (3) 接头连接

[0078] 按照表5,在冰上配制接头连接反应mix。

[0079] 表5 接头连接反应mix

组分	单反应体积 (μL)
Ligation Buffer II	18
DNA Ligase II	2
总体积	20

[0081] 向步骤(2)反应体系中加入实施例1中制备的发卡型接头(15 μM) 2 μL ,震荡混匀;再加入20 μL 接头连接反应mix,震荡混匀,按照表6中的程序进行PCR,得到接头连接产物,置于冰盒上备用。

[0082] 表 6 接头连接反应程序

	温度	时间
[0083]	20℃	15min
	4℃	Hold

[0084] (4) USER酶消化及磁珠纯化

[0085] 向接头连接产物中,加3 μ L USER酶,振荡混匀并离心后置于PCR仪中37℃孵育15min(热盖 \geq 47℃)。反应结束后,向每个反应中补加37 μ L Nuclease Free Water,然后加入55 μ L NadPrep® SP Beads磁珠进行纯化,利用80%乙醇溶液漂洗,晾干至磁珠表面哑光,其后加入22 μ L TE缓冲液(pH 8.0),室温下孵育5min得到消化后的产物,备用。

[0086] (5) Index PCR

[0087] 按照表7,依次向PCR管中添加对应反应组分并混匀离心。将样本置于PCR仪中,按照表8程序进行PCR扩增,利用磁珠进行纯化得到双端index文库。

[0088] 表7 Index PCR Mix配制表

	组分	单反应体积 (μ L)
	发卡接头 index Primer_F (10 μ M)	2.5
	发卡接头 index Primer_R (10 μ M)	2.5
[0089]	2 \times KAPA HiFi HotStart ReadyMix	25
	消化后的产物	20
	总体积	50

[0090] 表8 Index PCR反应程序

	步骤	温度 (℃)	时间	循环数
	预变性	98	2min	1
	变性	98	15s	6
[0091]	复性	60	30s	
	延伸	72	30s	
	最后延伸	72	2min	1
	Hold	4	∞	1

[0092] 利用Qubit dsDNA HS Assay Kit试剂盒进行文库定量,计算文库产量,比较不同接头的建库性能。

[0093] 以利用常用的标准接头序列建库为对照,标准接头的序列如下:

[0094] 标准接头: MGI-dual Barcode-Ad-B:

[0095] /5Phos/AGTCGGAGCCAAGCGGTCTTAGGAAGACAATCA*G,*G表示碱基G经过硫代修饰。

[0096] MGI-dual Barcode-Ad-T:

[0097] TTGTCTTCCTAAGCAACTCCTTGGCTCACAGAACGACATGGCTACGATCCGACT*T,*T表示碱基T经过硫代修饰。

[0098] 标准接头建库PCR引物:

[0099] Primer_F:

[0100] /5Phos/CTCTCAGTACGTCAGCAGTTNNNNNNNNNCAACTCCTTGGCTCACAGAA*C,其中N为index序列,*C表示碱基C经过硫代修饰。

[0101] Primer_R:

[0102] GCATGGCGACCTTATCAGNNNNNNNNNTTGTCTTCCTAAGACCGCTTG*G,其中N为index序列,*G表示碱基G经过硫代修饰。

[0103] 发卡型接头与标准接头的实验结果见表9和图2所示。

[0104] 表9 发卡型接头和标准接头构建的文库产量

Index No	Index 序列	文库产量 (ng)	
		发卡型接头	标准接头
1	CCATCTCATA	2327	1856
2	GATTCGCTCA	2590	1834
3	AGGAAACACT	2418	2052
4	TGGCCCTCAA	2395	2156
5	TCCTACCTCA	2449	1980
6	CTCGTGATCA	2671	2188
7	TAGATGGAAA	2494	1844
8	ACTAGGGACT	2496	2016
9	GCAACCTTTG	2450	2124
10	TTATTTTCCG	2754	2287
11	ACGCGATGCA	2378	2088
12	AGTGGCGCCG	2609	2268
[0105] 13	TGCCCCGGTA	2430	2016
14	TACTAAGGAC	2592	2216
15	GTCAGGACCA	2590	1969
16	ACGTGGCGGC	2636	1893
17	AGAAAGAAAA	2544	2231
18	TGAAGGATTA	2387	1980
19	GGCATCTTCT	2367	1872
20	AACCATCGTA	2395	2052
21	TCACCACTTG	2384	1944
22	GACTTAATGT	2283	2088
23	CTTCATTA AAA	2496	1916
24	CATCTGCTTA	2542	2188
平均	-	2486	2044
CV	-	4.8%	6.9%
中位数	-	2472	2034

[0106] 从表9和图2中可以看出,利用实施例1中提供的发卡型接头构建的文库产量的平均值(2486)、中位数(2472)均高于利用标准接头构建的文库产量的平均值(2044)、中位数(2034),且P值小于0.01,具有显著性差异。而且发卡型接头文库产量的cv值低于标准接头,可见,利用发卡型接头构建文库时,文库产量更高,更稳定,扩增效率更均一。

[0107] 实施例2 LNA修饰的发卡型接头

[0108] 本申请的发明人实验了将发卡型接头进行LNA修饰,并实验了在发卡型接头插入UMI序列后建库的效果。发卡型接头插入UMI序列的结构示意图见图3所示。具体的序列如

下:

[0109] 发卡型接头序列:

[0110] /5phos/AGTCGGAGGCCAAGCGGTCTTAGGAAGACUGAACGACATGGCTACGATCCGACT*T,*T表示碱基T经过硫代修饰。

[0111] LNA修饰的发卡型接头序列:

[0112] /5phos/AGTCGGAGGCCAAGCGGTCTTAGGAAGACUGAACGACATGGCTACGA/iXNA_T/CCG/iXNA_A/C/iXNA_T/*T,/iXNA_T/表示碱基T被LNA修饰;/iXNA_A/表示碱基A被LNA修饰,*T表示碱基T经过硫代修饰。

[0113] 插入UMI的发卡型接头序列:

[0114] /5phos/NNNNAAGTCGGAGGCCAAGCGGTCTTAGGAAGACUGAACGACATGGCTACGATCCGACTTN NNN*T,其中NNNN为UMI序列,*T表示碱基T经过硫代修饰,具体参见表10。表10中的UMI序列为5'端的序列,3'端的序列为与5'端的序列完全互补的序列。

[0115] 表10 UMI序列

[0116]

UMI ID	序列	UMI ID	序列	UMI ID	序列	UMI ID	序列
UMI_1	CAAG	UMI_9	CATG	UMI_17	ACGT	UMI_25	GACC
UMI_2	GTAA	UMI_10	CTTT	UMI_18	GGTC	UMI_26	CAAC
UMI_3	ATGC	UMI_11	GGGA	UMI_19	CTAC	UMI_27	TTAA
UMI_4	CCAC	UMI_12	CTGC	UMI_20	GACT	UMI_28	AGTA
UMI_5	GCTG	UMI_13	GCGC	UMI_21	TAGC	UMI_29	ATCC
UMI_6	GCTT	UMI_14	CCTT	UMI_22	GCAA	UMI_30	TTGC
UMI_7	GATC	UMI_15	GTGT	UMI_23	TCGC	UMI_31	ACCT
UMI_8	AACC	UMI_16	TTCA	UMI_24	CGAG	UMI_32	AGAC

[0117] 建库PCR引物:

[0118] 发卡型接头index Primer_F:

[0119] TCTCAGTACGTCAGCAGTTNNNNNNNNNCAACTCCTTGGCTCACAGAACGACATGGCTACGATCCG AC*T,其中N为index序列,*T表示碱基T经过硫代修饰,同表9中的index序列。

[0120] 发卡型接头index Primer_R:

[0121] GGCATGGCGACCTTATCAGNNNNNNNNNTGTCTTCCTAAGACCGCTTGGC*C,其中N为index序列,*C表示碱基C经过硫代修饰,同表9中的index序列。

[0122] 具体实验方法同实施例1,其实验结果如表11和图4。

[0123] 表11 三种类型接头构建的文库产量

[0124]

Index 号	文库产量 (ng)		
	发卡型接头	LNA 修饰发卡型接头	UMI 发卡型接头
1	2372.5	3171.8	3004.5
2	2553.9	3092.6	3068.2
3	2404.6	3274.6	3250.2
4	2558.3	3318.2	3325.6
5	2460.4	3054.4	3155.5
6	2485.2	3331.3	3278.7
7	2688.2	3310.4	3219.5
8	2536.9	3178.1	3085.0
9	2393.1	2903.0	3229.6
10	2586.0	3305.6	3201.1
11	2455.8	3091.3	3100.1
12	2566.9	3349.9	3309.3
13	2633.1	3363.9	3384.6
14	2688.5	3262.4	3142.5
15	2748.0	3119.8	3206.3
16	2591.9	3234.9	3170.8
17	2399.3	2983.4	3184.2
18	2368.0	3265.5	3089.7
19	2480.8	3008.6	3083.6
20	2559.0	3155.9	3303.4
21	2516.4	3208.8	3274.9
22	2412.9	3204.0	3202.6
23	2672.8	3213.3	3231.8
24	2454.0	3307.2	3111.6
平均值	2524.4	3196.2	3192.2
cv	4.3%	3.9%	3.0%
中位数	2526.7	3211.0	3201.8

[0125] 从表11和图4可知,LNA修饰的发卡型接头与UMI发卡型接头构建的文库产量基本一致(无显著性差异),均高于普通的发卡型接头构建的文库产量,且 $P < 0.01$,具有显著性差异,而且扩增效率更均一。

[0126] 综上,本申请提供的发卡型接头应用于双端index建库时,所构建的文库产量明显高于标准接头,而且经过LNA修饰后的发卡型接头构建的文库产量更高。在LNA修饰的发卡型接头中插入UMI序列,对文库的产量无影响,但cv值明显降低,说明文库的扩增效率更均

一。

[0127] 本具体实施例仅仅是对本申请的解释,其并不是对本申请的限制,本领域技术人员在阅读完本说明书后可以根据需要对本实施例做出没有创造性贡献的修改,但只要在本申请的权利要求范围内都受到专利法的保护。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 北京橡鑫生物科技有限公司
- [0003] 天津橡鑫生物科技有限公司
- [0004] 天津橡鑫医疗器械有限公司
- [0005] <120> 一种发卡型接头及其在双端index建库中的应用
- [0006] <160> 7
- [0007] <170> SIP0SequenceListing 1.0
- [0008] <210> 1
- [0009] <211> 55
- [0010] <212> DNA
- [0011] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0012] <220>
- [0013] <221> N_region
- [0014] <222> (30)..(30)
- [0015] <223> 发卡型接头
- [0016] <220>
- [0017] <221> misc_feature
- [0018] <222> (30)..(30)
- [0019] <223> n is a, c, g, t or u
- [0020] <400> 1
- [0021] agtcggaggc caagcggctct taggaagacn gaacgacatg gctacgatcc gactt 55
- [0022] <210> 2
- [0023] <211> 70
- [0024] <212> DNA
- [0025] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0026] <220>
- [0027] <221> N_region
- [0028] <222> (20)..(29)
- [0029] <223> index Primer_F
- [0030] <220>
- [0031] <221> misc_feature
- [0032] <222> (20)..(20)
- [0033] <223> n is a, c, g, t or u
- [0034] <220>
- [0035] <221> misc_feature
- [0036] <222> (21)..(21)
- [0037] <223> n is a, c, g, t or u
- [0038] <220>

[0039] <221> misc_feature
[0040] <222> (22)..(22)
[0041] <223> n is a, c, g, t or u
[0042] <220>
[0043] <221> misc_feature
[0044] <222> (23)..(23)
[0045] <223> n is a, c, g, t or u
[0046] <220>
[0047] <221> misc_feature
[0048] <222> (24)..(24)
[0049] <223> n is a, c, g, t or u
[0050] <220>
[0051] <221> misc_feature
[0052] <222> (25)..(25)
[0053] <223> n is a, c, g, t or u
[0054] <220>
[0055] <221> misc_feature
[0056] <222> (26)..(26)
[0057] <223> n is a, c, g, t or u
[0058] <220>
[0059] <221> misc_feature
[0060] <222> (27)..(27)
[0061] <223> n is a, c, g, t or u
[0062] <220>
[0063] <221> misc_feature
[0064] <222> (28)..(28)
[0065] <223> n is a, c, g, t or u
[0066] <220>
[0067] <221> misc_feature
[0068] <222> (29)..(29)
[0069] <223> n is a, c, g, t or u
[0070] <400> 2
[0071] tctcagtacg tcagcagttt nnnnnnnnc aactccttgg ctacagaac gacatggcta 60
[0072] cgatccgact 70
[0073] <210> 3
[0074] <211> 53
[0075] <212> DNA
[0076] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0077] <220>

[0078] <221> N_region
[0079] <222> (20)..(29)
[0080] <223> index Primer_R
[0081] <220>
[0082] <221> misc_feature
[0083] <222> (20)..(20)
[0084] <223> n is a, c, g, t or u
[0085] <220>
[0086] <221> misc_feature
[0087] <222> (21)..(21)
[0088] <223> n is a, c, g, t or u
[0089] <220>
[0090] <221> misc_feature
[0091] <222> (22)..(22)
[0092] <223> n is a, c, g, t or u
[0093] <220>
[0094] <221> misc_feature
[0095] <222> (23)..(23)
[0096] <223> n is a, c, g, t or u
[0097] <220>
[0098] <221> misc_feature
[0099] <222> (24)..(24)
[0100] <223> n is a, c, g, t or u
[0101] <220>
[0102] <221> misc_feature
[0103] <222> (25)..(25)
[0104] <223> n is a, c, g, t or u
[0105] <220>
[0106] <221> misc_feature
[0107] <222> (26)..(26)
[0108] <223> n is a, c, g, t or u
[0109] <220>
[0110] <221> misc_feature
[0111] <222> (27)..(27)
[0112] <223> n is a, c, g, t or u
[0113] <220>
[0114] <221> misc_feature
[0115] <222> (28)..(28)
[0116] <223> n is a, c, g, t or u

[0117] <220>
[0118] <221> misc_feature
[0119] <222> (29) .. (29)
[0120] <223> n is a, c, g, t or u
[0121] <400> 3
[0122] ggcattggcga ccttatcagn nnnnnnnnt tgtcttctta agaccgcttg gcc 53
[0123] <210> 4
[0124] <211> 35
[0125] <212> DNA
[0126] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0127] <220>
[0128] <223> MGI-dual Barcode-Ad-B
[0129] <400> 4
[0130] agtcggaggc caagcggctt taggaagaca atcag 35
[0131] <210> 5
[0132] <211> 55
[0133] <212> DNA
[0134] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0135] <220>
[0136] <223> MGI-dual Barcode-Ad-T
[0137] <400> 5
[0138] ttgtcttctt aagcaactcc ttggctcaca gaacgacatg gctacgatcc gactt 55
[0139] <210> 6
[0140] <211> 51
[0141] <212> DNA
[0142] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0143] <220>
[0144] <221> N_region
[0145] <222> (21) .. (30)
[0146] <223> Primer_F
[0147] <220>
[0148] <221> misc_feature
[0149] <222> (21) .. (21)
[0150] <223> n is a, c, g, t or u
[0151] <220>
[0152] <221> misc_feature
[0153] <222> (22) .. (22)
[0154] <223> n is a, c, g, t or u
[0155] <220>

[0156] <221> misc_feature
[0157] <222> (23)..(23)
[0158] <223> n is a, c, g, t or u
[0159] <220>
[0160] <221> misc_feature
[0161] <222> (24)..(24)
[0162] <223> n is a, c, g, t or u
[0163] <220>
[0164] <221> misc_feature
[0165] <222> (25)..(25)
[0166] <223> n is a, c, g, t or u
[0167] <220>
[0168] <221> misc_feature
[0169] <222> (26)..(26)
[0170] <223> n is a, c, g, t or u
[0171] <220>
[0172] <221> misc_feature
[0173] <222> (27)..(27)
[0174] <223> n is a, c, g, t or u
[0175] <220>
[0176] <221> misc_feature
[0177] <222> (28)..(28)
[0178] <223> n is a, c, g, t or u
[0179] <220>
[0180] <221> misc_feature
[0181] <222> (29)..(29)
[0182] <223> n is a, c, g, t or u
[0183] <220>
[0184] <221> misc_feature
[0185] <222> (30)..(30)
[0186] <223> n is a, c, g, t or u
[0187] <400> 6
[0188] ctctcagtac gtcagcagtt nnnnnnnnnn caactccttg gctcacagaa c 51
[0189] <210> 7
[0190] <211> 50
[0191] <212> DNA
[0192] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0193] <220>
[0194] <221> N_region

[0195] <222> (19) .. (28)
[0196] <223> Primer_R
[0197] <220>
[0198] <221> misc_feature
[0199] <222> (19) .. (19)
[0200] <223> n is a, c, g, t or u
[0201] <220>
[0202] <221> misc_feature
[0203] <222> (20) .. (20)
[0204] <223> n is a, c, g, t or u
[0205] <220>
[0206] <221> misc_feature
[0207] <222> (21) .. (21)
[0208] <223> n is a, c, g, t or u
[0209] <220>
[0210] <221> misc_feature
[0211] <222> (22) .. (22)
[0212] <223> n is a, c, g, t or u
[0213] <220>
[0214] <221> misc_feature
[0215] <222> (23) .. (23)
[0216] <223> n is a, c, g, t or u
[0217] <220>
[0218] <221> misc_feature
[0219] <222> (24) .. (24)
[0220] <223> n is a, c, g, t or u
[0221] <220>
[0222] <221> misc_feature
[0223] <222> (25) .. (25)
[0224] <223> n is a, c, g, t or u
[0225] <220>
[0226] <221> misc_feature
[0227] <222> (26) .. (26)
[0228] <223> n is a, c, g, t or u
[0229] <220>
[0230] <221> misc_feature
[0231] <222> (27) .. (27)
[0232] <223> n is a, c, g, t or u
[0233] <220>

-
- [0234] <221> misc_feature
[0235] <222> (28)..(28)
[0236] <223> n is a, c, g, t or u
[0237] <400> 7
[0238] gcatggcgac cttatcagnn nnnnnnntt gtcttcctaa gaccgcttgg 50

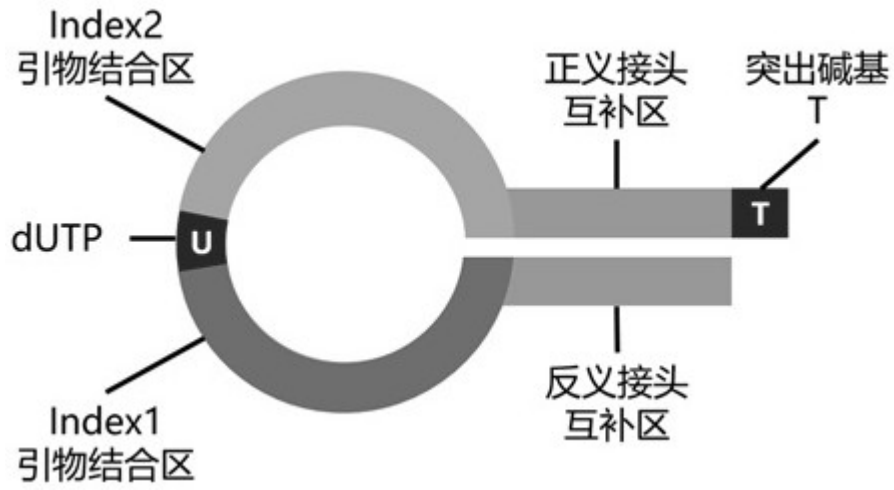


图1

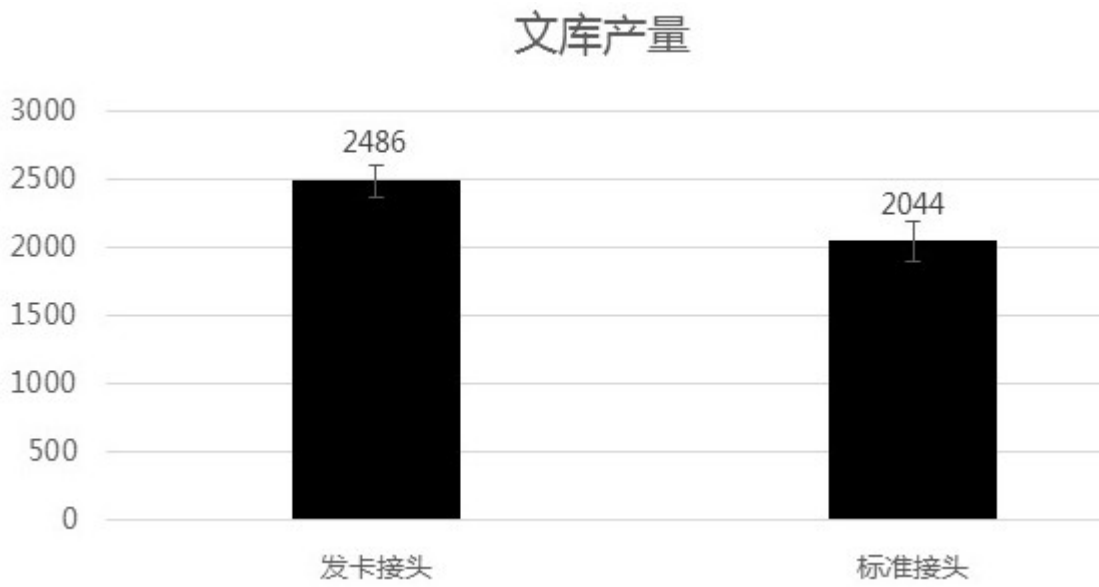


图2

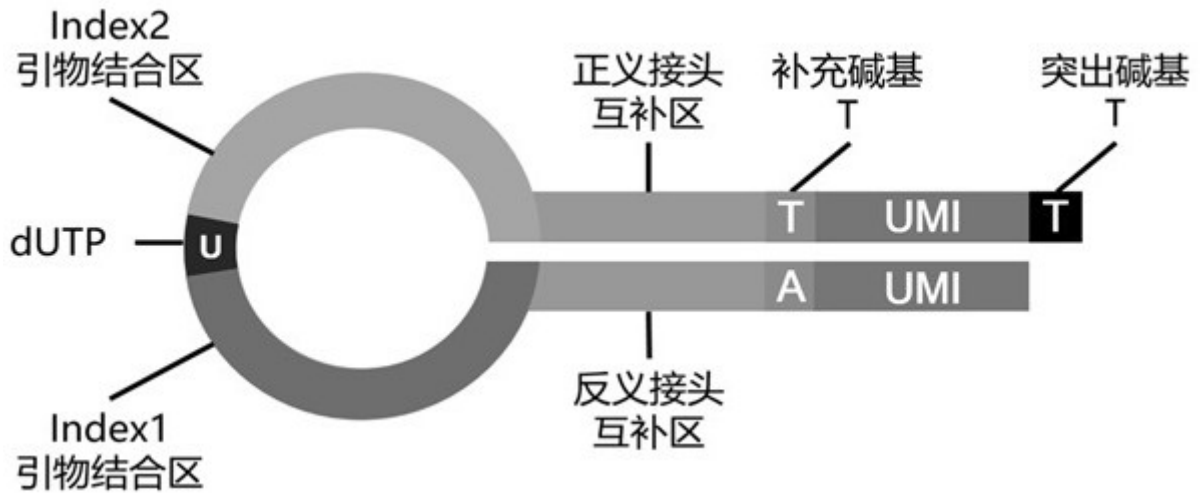


图3

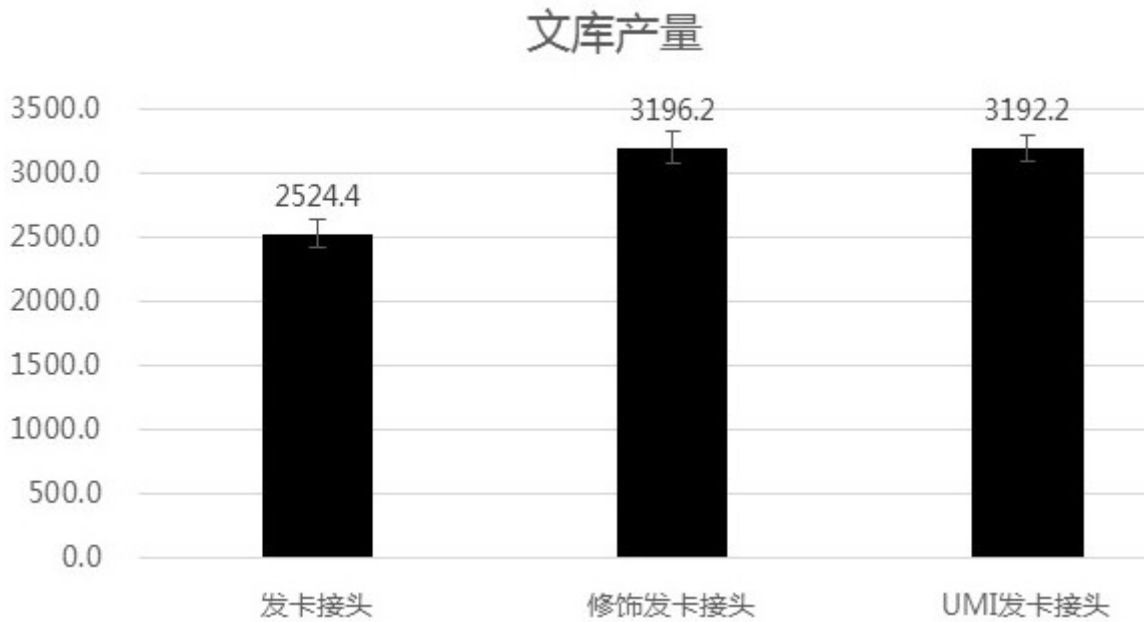


图4