



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102301009 B

(45) 授权公告日 2015. 09. 30

(21) 申请号 201080005891. X

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 02. 03

C12Q 1/68(2006. 01)

(30) 优先权数据

审查员 蔡放

61/149, 675 2009. 02. 03 US

61/158, 815 2009. 03. 09 US

61/275, 531 2009. 08. 31 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 07. 28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2010/023007 2010. 02. 03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/091060 EN 2010. 08. 12

(73) 专利权人 新英格兰生物实验室公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 谢沛仲 管楚狄

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

公司 11245

代理人 赵蓉民 潘满根

权利要求书1页 说明书6页

序列表2页 附图10页

(54) 发明名称

使用酶在 DNA 中产生随机双链断裂

(57) 摘要

描述了包括单位比率小于 1 : 200 的非特异性核酸酶和 T7 EndoI 突变体的酶制剂。这种酶制剂可用于大小具有适合 DNA 测序的双链 DNA 片段。所述片段的末端可以根据需要容易地被修饰, 以将连接物或者单独的核苷酸与双链 DAN 片段的一条链连接。

1. 制剂,其包括:单位比率小于 1 : 200 的非特异性切口核酸酶和在两个催化结构域之间的桥接区具有突变的抵消切口核酸酶 T7 Endo I 突变体。
2. 根据权利要求 1 所述的制剂,其中非特异性切口核酸酶是 Vvn 核酸酶。
3. 根据权利要求 2 所述的制剂,其中所述 Vvn 核酸酶在 Q69 具有突变,其对应于 SEQ ID NO :5 中的氨基酸位置 51。
4. 从大的双链 DNA 产生适合测序的片段的方法,其包括:
  - (a) 将大的 DNA 与根据权利要求 1 所述的制剂混合;和
  - (b) 将所述大的 DNA 切割成大小适合测序的片段。
5. 根据权利要求 4 所述的方法,其中非特异性切口核酸酶是 Vvn 核酸酶。
6. 根据权利要求 5 所述的方法,其中所述 Vvn 核酸酶在 Q69 具有突变,其对应于 SEQ ID NO :5 中的氨基酸 51。
7. 根据权利要求 4-6 任一项所述的方法,还包括:在由 (b) 中切割产生的片段上产生平端。
8. 根据权利要求 4-6 任一项所述的方法,还包括:将具有平端或者单核苷酸突出端的连接物与所述片段的一端或者两端连接。
9. 权利要求 7 所述的方法,还包括:将具有平端或者单核苷酸突出端的连接物与所述片段的一端或者两端连接。

## 使用酶在 DNA 中产生随机双链断裂

### 背景技术

[0001] 将基因组 DNA 断裂成较小的不同大小的片段是在许多测序技术中重要的步骤。目前机械断裂方法,例如超声处理、自适应-聚焦声法 (adaptive-focused acoustics) 或者雾化,没有碱基切割偏好地产生 DNA 片段。但是这些方法,具有在非磷酸二酯键的地方破坏 DNA 的可能性,且与酶方法相比具有较低的 DNA 回收效率。另一方面,酶方法,例如依靠具有特定识别序列的限制性内切核酸酶的那些,产生固定的特定大小的片段,其依赖于识别序列出现的频率是可大可小的。迄今为止,对于非特异性核酸酶的研究已经显示尽管识别和切割不需要非特异性序列,但是这些酶显示出对于在切割位点的某些碱基的偏好 (Anderson *Nucleic Acids Res.* 9(13):3015-27(1981); Herrera 和 Chaires *J. Mol. Biol.* 236(2):405-11(1994))。

### [0002] 发明简述

[0003] 在本发明的一种实施方式中,提供了包括小于 1 : 200 单位比率的非特异性核酸酶和 T7Endo I 突变体的制剂。在一种实施例中,非特异性核酸酶是一种嗜盐弧菌 (*Vibrio vulnificus*) (Vvn) 核酸酶,其在 Q69 具有突变。

[0004] 在本发明的另一种实施方式中,提供了从大的 DNA 产生适合测序的片段的方法,其包括将感兴趣的 DNA 与包含小于 1 : 200 单位比率的非特异性核酸酶和 T7 Endo I 突变体的制剂混合。大 DNA 被切割成大小适合测序的片段。正如上所述,在方法中使用的非特异性核酸酶的例子是 Vvn 核酸酶,更具体地是具有增强比活的 Vvn 核酸酶突变体,如在 Q69 的突变。大 DNA 的片段可包含一个或者两个平端并可以被进一步修饰以与测序 DNA 使用类型的连接物 (adapter) 连接。

### [0005] 附图简述

[0006] 图 1 显示使用麦芽糖-结合蛋白 (MBP)-T7 Endo I 突变体和 MBP-Vvn 组合的 DNA 断裂。CB4 是 2 体积 MBP-T7 Endo I 突变体 (PA/A) (0.13 单位 /  $\mu$ l) 和 1 体积 MBP-Vvn (0.14 单位 /  $\mu$ l) 的混合物。每条泳道代表 30  $\mu$ l 反应,其中 5  $\mu$ g 基因组 DNA (如在泳道的上方所指示) 与 3  $\mu$ l CB4 在 37°C 下温育。每个反应在 30 分钟、60 分钟和 90 分钟时间间隔后用 15mM EDTA 停止。DNA 片段被乙醇沉淀和接着风干。DNA 沉淀物在 50  $\mu$ l 1 $\times$  凝胶加样染料——橙色 (新英格兰生物实验室公司 (New England Biolabs, Inc.), (NEB), Ipswich, MA, NEB#B7022) 中再悬浮并加样在 2% 琼脂糖凝胶上。框指示大约 100-200bps 的片段。

[0007] 图 1A 显示来自海拉 (宫颈腺癌) 细胞、大肠杆菌 (*E. coli*) 和 CpG 海拉细胞 (NEB#4007) 的基因组 DNA 的断裂。

[0008] 图 1B 显示来自鲱鱼 (Herring) 精子、 $\lambda$  噬菌体和 Jurkat (人急性 T-细胞白血病) 细胞基因组 DNA 的断裂。

[0009] 图 2 显示与两个 DNA 梯序列 M1——2-对数 DNA 梯序列 (NEB#N3200, Ipswich, MA) 和 M2——NEB PCR 标记物 (NEB #N3234, Ipswich, MA) 比较,用 CB4 混合物产生的 DNA 片段。建立 7 种反应并包含 3  $\mu$ l CB4 混合物和 5  $\mu$ g DNA 梯序列 (NEB#N3231) 的每 50  $\mu$ l 反应物在 37°C 下温育不同时间,随后用 15mM EDTA 以 0、5、10、20、40、80 和 160 分钟时间间隔终止。

片段加样在 1% 琼脂糖凝胶上。

[0010] 图 3A-3B 显示从 30  $\mu$ l 反应物中的 1  $\mu$ g  $\lambda$  DNA, 在 37°C 下、30 分钟使用核酸酶: MBP-Vvn 核酸酶 (野生型 (WT)) 或者 MBP-Vvn 核酸酶 (Q69S) 的连续稀释产生 DNA 片段。

[0011] 图 3A: 泳道 M 是 NEB (Ipswich, MA) PCR 标记物 (#N3234); 泳道 1-9 是在泳道 1 中的 2  $\mu$ g MBP-Vvn 核酸酶 (野生型) 起始的连续 2 倍稀释 (稀释缓冲液: 20mM Tris-HCl (pH7.5)、50mM NaCl、0.15% Triton X-100 和 0.1  $\mu$ g/ml BSA)。泳道 3 中使用的酶的量定义为一个凝胶单位, 其中 90% DNA 片段小于 150bp。

[0012] 图 3B: 泳道 M 是 NEB (Ipswich, MA) PCR 标记物 (#3234); 泳道 1-9 是在泳道 1 中的 1.5  $\mu$ g MBP-Vvn 酶 (突变体) 起始的连续 2 倍稀释 (稀释缓冲液如上)。泳道 6 中使用的酶的量定义为一个凝胶单位。

[0013] 图 4 显示对与由 MBP-T7 Endo I 突变体和 MBP-Vvn 核酸酶 (Q69S) (CB4v2) 组成的混合物使用不同温育时间产生的 DNA 片段。CB4v2 是 2 体积 MBP-T7 EndoI 突变体 (0.16 单位 /  $\mu$ l) 和 1 体积 MBP-Vvn 核酸酶 (Q69S) (0.048TCA 单位 /  $\mu$ l) 的混合物。

[0014] 每个泳道代表在 37°C 下与相同量的 3  $\mu$ l CB4v2 混合物一起温育的具有 5  $\mu$ g 不同基因组 DNA (如在泳道上方所指示) 的 50  $\mu$ l 反应物。每个反应在 30 分钟、60 分钟和 90 分钟时间间隔后用 15mM EDTA 停止。DNA 片段被乙醇沉淀和接着风干。DNA 沉淀物在 50  $\mu$ l 1 $\times$  凝胶加样染料——橙色 (NEB#B7022, Ipswich, MA) 中再悬浮并加样在 2% 琼脂糖凝胶上。框指示大约 150bp 片段。

[0015] 图 5 显示 Vvn 核酸酶 (Q69S) 突变体的氨基酸序列 (SEQ ID NO:5)。氨基酸序列从 19 位开始, 由于信号肽 (1-18) 没有克隆在 MBP-Vvn 核酸内切酶 (Q69S) 构建物中。“\*” 指示 Q 突变成 S 的 69 位。

[0016] 图 6A 和 6B 显示在分开的反应容器中使用许多不同核酸内切酶、然后断裂产物合并 (图 6A) 和在相同反应容器中一起使用两种核酸内切酶 (图 6B) 在时间范围上的比较。M 是 2-对数 DNA 梯序列和 C 是未消化的 pUC19。“-N-”指示其中 pUC19 的带切口形式迁移。“-L-”指示其中 pUC19 的线性形式迁移。“-S-”指示其中 pUC19 的超螺形式迁移。

[0017] 图 6A 显示分别使用产生切口酶 MBP-Vvn 核酸内切酶 (Q69S) 和 MBP-T7Endo I 突变体的随机双链切割。8  $\mu$ g pUC19 与 1.376TCA 单位 MBP-Vvn 核酸内切酶在 480  $\mu$ l 反应中温育。在另一个新管中, 8  $\mu$ g pUC19 与 5.6 单位 MBP-T7 Endo I 突变体在 480  $\mu$ l 反应中温育。样品在 37°C 下温育。在 0、5、10、15、20、30、40、和 60 分钟时, 从每个温育混合物中移出 30  $\mu$ l, 且通过添加 EDTA (终浓度 15mM) 使反应停止。具有相同温育时间的样品集中在一起并加样在对应于温育时间 0 至 60 分钟的从 1 至 8 泳道的 0.8% 琼脂糖凝胶上。

[0018] 图 6B 显示一起使用 MBP-T7Endo I 突变体和 MBP-Vvn 核酸内切酶核酸内切酶 (Q69S) 的随机双链切割。16  $\mu$ g pUC 与 1.376T.C.A. 单位 /  $\mu$ l 的 MBP-Vvn 核酸内切酶 (Q69S) 和 5.6 单位 /  $\mu$ l MBP-T7 Endo I 突变体 (CB4V2) 在 480  $\mu$ l 反应中温育。样品在 37°C 下温育。在 0、5、10、15、20、30、40、和 60 分钟时, 从每个温育混合物中移出 60  $\mu$ l, 且通过添加 EDTA (终浓度 15mM) 使反应停止。样品加样在对应于温育时间 0 至 60 分钟的从 1 至 8 泳道的 0.8% 琼脂糖凝胶上。发现了 MBP-T7 Endo I 突变体和产生切口酶 MBP-Vvn 核酸内切酶 (Q69S) 对随机 DNA 片段产生的协同作用。

[0019] 图 7 显示为核酸酶混合物确定合适单位比率的滴定。通过凝胶电泳确定 T7 Endo I

突变体对现有切口位点的特异性切割。连续 2 倍稀释酶且单个单位被定义为能够将 90% 底物转换成 2 个片段的酶量。从最浓 (泳道 1) 到最稀 (泳道 9) 显示连续稀释。T7 内切酶突变体对现有切口位点——其在上述底物制备时由 BsaI/Nt.BstNBI 产生——的特异性切割将线性切口 2.44Kb 双链 DNA (dsDNA) 转化成 2 个片段 (1.37Kb 和 1.07Kb)。因此, 1 单位 T7 核酸内切酶突变体被定义为用在 20  $\mu$ l 反应物中包含 5 单位 E. coli 连接酶、60  $\mu$  MNAD/20mM Tris-HCl (pH 7.5)、10mM MgCl<sub>2</sub>、0.15% Triton X-100 和 50mM NaCl 的缓冲液, 在 37°C 下 1 个小时将 90% (如在泳道 5 中所示) 的 2  $\mu$ g 线性切口的 2.44kb 的 dsDNA 转化成 2 个片段 (1.37kb 和 1.07kb) 所需要的酶的量。泳道“M”是 2- 对数 DNA 梯序列 (NEB, Ipswich, MA, #3200)。

[0020] 图 8 显示与包含核酸内切酶混合物的产品一起运送的数据卡片。

[0021] 实施方式详述

[0022] 在本发明的实施方式中, 提供组合物和方法, 其依靠制剂中的酶混合物, 产生具有大约均一大小——其中均一大小可根据需要而预先确定并通过例如, 改变温育时间产生——双链 DNA 片段。与单独的非特异性核酸酶切割反应相比, 酶制剂通过包括抵消-切口 (counter-nicking) 活性减少 dsDNA 片段中非生产性切口的数量。抵消-切口允许产生确定长度的突出端, 其在正常解离条件下会解离, 且其能修复成平端以用于随后的操作。修复可涉及回切 (chewing back) 3' 突出端或者通过聚合酶的方式合成 5' 突出端的互补序列。具有平端或者单个核酸突出端的连接物可接着与修饰的片段连接。这些片段可接着用于各种测序平台。

[0023] 现有技术中随机断裂方法产生突出端, 但是这些是非离散大小的 并至少产生两个问题。第一, 因为解链温度取决于突出端的长度和碱基组成, 末端的解离不均一。第二, 存在超出片段解离需要的过多切口是在随后步骤中——包括扩增和/或者实际测序反应——需要的聚合作用的阻碍。涉及模板物理一致性的测序平台也会受到影响。

[0024] 在本发明的一种实施方式中, 制剂包含非特异性核酸酶和 T7 核酸内切酶 I 或其突变体。尽管可使用对于切割 AT 或者 GC 碱基对有偏好的核酸酶, 但是优选地选择对于 GC 或者 AT 没有明显偏好的核酸酶。属于后者范畴的核酸酶的例子获得自嗜盐弧菌 (Vvn) (GI : 2625684 Wu, 等人, Appl Environ Microbiol 67(1) :82-8(2001)。

[0025] 其它可在制剂中利用的细胞外核酸酶包括来自霍乱弧菌 (Vibrio cholera) 的 Dns (Focareta and Manning Gene 53(1) :31-40(1987) ; 来自菊欧文菌 (Erwinia chrysanthemi) 的 NucM (Moulard, 等人, Mol Microbiol 8(4) :685-95(1993) ; 来自大肠杆菌 (E. coli) 的 Endo I (Jekel, et al Gene 154(1) :55-59(1995) ; 来自嗜水气单胞菌 (Aeromonas hydrophila) 的 Dns 和 DnsH (Chang 等人, Gene 122(1) :175-80(1992) 和 Dodd, 等人, FEMS Microbiol Lett 173(1) :41-6(1999) ; Wang, 等人, Nucleic Acids Res 35 : 584-94(2007) ; 和 Wang, 等人, Nucleic Acid Res. 35 :584-594(2007))。

[0026] 这里显示核酸酶的突变能导致提高的比活。例如, Vvn 核酸内切酶的 Q69 突变产生具有增强比活的核酸酶。具体地, 实施例利用 Q69S。发现例如当基因与 MBP 的基因结合产生在周质空间中积聚的融合蛋白以改进突变体核酸内切酶突变体回收时, 在宿主细胞中容易产生突变体核酸酶。

[0027] 包含非特异性核酸的酶制剂添加 T7 Endo I 突变体对于具有期望性质的片段的

产生具有重要的有益效果。在 T7 Endo I 突变体存在的情况下,由于它抵消 - 切口的活性,通过在变性条件下产生不同大小片段的非特异性核酸酶产生的切口有效地消失。抵消 - 切口活性产生具有末端的片段,其能容易地从切口位点优选地解离 8 个或者更少的核苷酸。酶混合物对于 dsDNA 的其它有益效果包括产生 DNA 片段,其具有可预知的突出端倾向 (disposition) 和长度,其适合于修复或者移除以允许连接有时候 DNA 测序平台需要的连接物。

[0028] 在本发明的另一种实施方式中,许多核酸酶组合在反应混合物中,其中至少一种核酸酶是在任一条链上能够在整条 DNA 引入随机切口的类型和第二种核酸酶能够在该第一个切口的紧邻处抵消 - 切口,但是在 DNA 双螺旋的相对链上,因此,导致双链 DNA 断裂。

[0029] 分别使用源自弧菌的非特异性核酸酶和在美国公开号 2007-0042379 中描述类型的突变体 T7 Endo I,例如,在桥接区具有突变的 T7 Endo I 证实这种方法。预测酶片段沿着基因组分布。

[0030] 使用上述酶制剂将质粒 DNA 和不同类型的基因组 DNA (gDNA) 酶切成大小适合测序方法的 DNA 片段。在 DNA 断裂后, DNA 片段进行凝胶分离和处理用于下一代测序。

[0031] 实施例 2 提供的试验可用于为任何具体 DNA、选择的温育时间确定核酸酶合适的量,或者为所选择的核酸酶的比率确定合适的温育时间。

[0032] 两种核酸酶 (切口核酸内切酶比如 Vvn 核酸内切酶突变体: 抵消 - 切口核酸酶比如 T7 Endo I 突变体) 的单位比率优选地小于 1 : 200 例如,小于 1 : 100,例如,小于 1 : 10。范围可以是 1 : 2 到 1 : 200。

[0033] 1 个单位 T7 Endo I 或者其突变体定义为在 37°C 下 1 个小时将 90% 的 2  $\mu$ g 线性切口的 2.44kb 的 dsDNA 转化成 2 个片段 (1.37kb 和 1.07kb) 所需要的酶的量。

[0034] 1 个单位 Vvn 核酸酶和其突变体定义为在 37°C 下 30 分钟释放 1A<sub>260</sub> 单位的酸性可溶寡核苷酸所需要的酶的量。

[0035] 在本发明的一种实施方式中,根据 DNA 是否落在大于 60% (高 GC 含量)、40% - 60% GC (标准 GC 含量)、或者小于 40% GC (低 GC 含量) 的范围内可测定 DNA 断裂反应的最佳温育时间。例如,温育时间范围可典型地在 10 分钟至 120 分钟,例如,15 分钟至 60 分钟范围内。

[0036] 本文引用的所有参考文献,以及 2009 年 2 月 3 日提交的美国临时申请号 61/149,675、2009 年 3 月 10 日提交的 61/158,815 和 2009 年 8 月 31 日提交的 61/275,531,通过引用并入本文。

## 实施例

[0037] “大”等同于具有为了测序需要断裂的大小的 DNA。

[0038] T7Endo I 突变体指在两个催化结构域之间的桥接区具有突变的 T7Endo I。

[0039] MBP-T7Endo I 突变体与 T7Endo I 起同样的作用。

[0040] MBP-Vvn 核酸酶 (WT 或者突变体) 与 Vvn 核酸酶 (WT 或者突变体) 起同样的作用。

[0041] 非特异性核酸酶指不识别特定 DNA 序列的任何 DNA 核酸酶。DNA 序列至少由 2 个确定顺序的核苷酸组成。这不包括识别特定 DNA 序列的限制性核酸内切酶。

[0042] 实施例 1 : 包含 Vvn 或其突变体的酶混合物的制备

[0043] 化学合成来自 Vvn 的编码周质核酸酶的基因。Vvn 基因——缺少它的信号肽,对应于图 5 的氨基酸 19 至 231 (SEQ ID NO :5)。它使用一对引物 1 (5' -AAGTTGAATTCGCGCCACC TAGCTCCTTCTCTGCC-3') (SEQ ID NO :1) 和 2

[0044] (5' -GGTAGAGGATCCTTATTGAGTTTGACAGGATTGC TG-3') (SEQ ID NO :2) 通过 PCR 扩增合成且片段克隆在 pMALp4x 载体 (NEB, Ipswich, MA, #N8104) 的 EcoRI 和 BamHI 之间。融合蛋白 MBP-Vvn 核酸内切酶在大肠杆菌的周质腔隙中表达并通过直链淀粉亲和柱纯化至同质性。MBP-Vvn 核酸酶 (WT) 通过肝素柱 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) 进一步纯化。通过 Bradford 试验 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) 测定蛋白浓度。

[0045] 产生突变体 MBP-Vvn 核酸内切酶 (Q69S), 其比 MBP-Vvn 核酸内切酶 (WT) 具有大 5-10 倍的比活 (图 3A-3B)。为产生 MBP-Vvn 核酸内切酶 (Q69S) 突变体, 使用引物 3 (5' -CA AGTACGCAAAAGCCAAACTCGCGCAT CG-3') (SEQ ID NO :3) 和 2 (SEQ ID NO :2) 以扩增 Vvn 基因的 C 末端部分, 而使用引物 1 (SEQ ID NO :1) 和引物 4 (5' -TGC GCGAGTTTGGCTTTTGC GTA CTTGGTA-3') (SEQ ID NO :4) 以扩增 Vvn 基因不包括信号肽序列的 N 末端部分。混合来自每个反应的 PCR 片段并使用引物 1 (SEQ ID NO :1) 和 2 (SEQ ID NO :2) 从完整的 Vvn 基因中再扩增。PCR 产物用 EcoRI 和 BamHI 切割, 接着为了蛋白表达的目的将其克隆入用相同的酶切割的 pMAL-p4x 载体。Vvn 突变体 核酸内切酶 (Q69S) 氨基酸序列示于图 5 中。融合蛋白 MBP-Vvn 核酸内切酶 (Q69S) 在 E. coli 的周质中表达并通过直链淀粉亲和柱纯化至同质性。通过 Bradford 试验 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) 测定蛋白浓度。当 Vvn 突变体核酸内切酶与 T7Endo I 突变体 (CB4v2) 组合时, 发现混合物以时间 - 依赖的方式有效地断裂不同来源和大小的基因组 DNA (图 4A 和 4B)。

[0046] 实施例 2 : 确定混合物中酶的单位比率

[0047] (a) 确定 T7 Endo I 突变体活性

[0048] 为了制备具有特异性切口位点的线性 dsDNA, 利用 pNB1 (2.44Kb)。pNB1 是具有单个 Nt. BstNBI 和 BsaI 切割位点的质粒。用 BsaI 切割使质粒线性化, 而 Nt. BstNBI 在其识别位点引入位点 - 特定切口。质粒 pNB1 在 50°C 下用 Nt. BstNBI 和 BsaI 限制性酶消化 1 个小时。然后, 添加小牛小肠碱性磷酸酶到线性 - 切口 dsDNA 中并在 37°C 下温育 1 个小时。这种处理防止在随后的试验中 E. coli 连接酶封闭 Nt. BstNBI 切口。使用 Qiagen 柱 (Valencia, CA) 将断裂的 dsDNA 与相关酶分离。

[0049] 用 T7 Endo I 突变体处理断裂的 pNB1 DNA, 在大约 Nt. BstNBI 切口的对面将抵消 - 切口引入 DNA 链以产生 2 个片段 (1.37kb 和 1.07kb) (见图 7)。1 单位 T7 Endo I 突变体定义为使用包含 5 单位大肠杆菌连接酶、60 μM NAD、20mM Tris-HCl (pH 7.5)、10mM MgCl<sub>2</sub>、0.15% Triton X-100 和 50mM NaCl 的缓冲液在 37°C 下 1 个小时将 2 μg 的 2.44kb 线性 - 切口 dsDNA 的 90% 转化成 2 个片段 (1.37kb 和 1.07kb) 所需的酶的量。图 7 的泳道 5 显示满足该限定的反应。

[0050] (b) 确定突变体 Vvn 核酸内切酶的活性

[0051] 超声处理的小牛胸腺基因组 DNA 用作底物以测定 Vvn 核酸内切酶的活性。5 μl Vvn 核酸内切酶突变体在 37°C 下添加到 3ml 包含 20mM Tris-HCl (pH 7.5)、10mM MgCl<sub>2</sub>、0.15% Triton X-100、50mM NaCl、超声处理小牛胸腺 gDNA (3mg) 和 BSA (0.1mg/ml) 的反应混合物中, 并继续在 37°C 下温育。移出 500 μl 的反应混合物且核酸内切酶的活性用

500  $\mu$ l 5%的 TCA 在 10、20、30、40 和 50 分钟时间间隔之后停止。这些 TCA-猝灭的样品在冰上温育 1 个小时并在 14000rpm 下离心 15 分钟以沉淀完整的 DNA。小心地从每管移出上清液并测量上清液在 260nm 的吸光度。1 单位 Vvn 核酸内切酶突变体定义为在 37°C 下 30 分钟内释放 1  $A_{260}$  单位酸性可溶寡核苷酸所需的酶的量。

[0052] (c) 确定突变体 Vvn 核酸内切酶的和突变体 T7 Endo I 在核酸酶混合物中的单位比率

[0053] 期望量的 Vvn 核酸酶和 T7 Endo I 突变体以各种比率在 10mM Tris-HCl (pH 7.5)、50mM NaCl、0.1mM EDTA、200  $\mu$ g/ml BSA 和 50% 甘油的贮存缓冲液中组合。DNA 断裂缓冲液包含 20mM Tris-HCl (pH7.5)、50mM NaCl、10mM  $MgCl_2$ 、0.15% Triton X-100 和 0.1mg/ml BSA。

[0054] 为了确定两种核酸内切酶合适的比率,利用 TCA 试验在其它类似反应条件下,一种核酸内切酶保持常量而另一种核酸酶改变浓度。

[0055] 在这里所说明的核酸酶混合物中,MBP-T7 Endo I 突变体:MBP-Vvn 核酸内切酶(Q69S) 突变体的单位比率大约是 3 : 1。当单位比率降低至 2 : 1 时, DNA 降解速度降低 50%,如通过上述 TCA 试验所确定的。但是,当比率增加至 8 : 1 时,速度仅增加 14%。

[0056] 实施例 3 :核酸酶与 T7 Endo I 突变体的组合在酶混合物中的协同作用

[0057] 显示 CB4 以时间 - 依赖方式断裂不同来源和不同大小的基因组 DNA (图 2)。CB4 是 2 体积 MBP-T7 Endo I 突变体 (PA/A) (0.26mg/ml) 和 1 体积 MBP-Vvn (WT) (0.2mg/ml) 的混合物。CB4 也将 100-1500bps 大小的小片段的混合物转化成大小适合几种目前下一代测序平台的 100 至 150bp 的片段 (图 2)。

[0058] MBP-Vvn 核酸酶 (Q69S) 和 MBP-T7 Endo I 突变体在混合物中协同作用以产生小的双链 DNA 片段。图 6A 和 6B 显示随温育时间增加用 MBP-Vvn 核酸酶 (Q69S) 或者 MBP-T7 Endo I PA/A 处理质粒如何导致切口环状 DNA 积聚增加,然后形成线性质粒和将该 DNA 降解成较小的片段。但是,当 2 种酶在同一反应混合物中存在时,与用相同浓度的单个酶所观察的 (图 6A) 相比,超螺旋质粒转化成开环或者线性 DNA 及其降解大大增加 (图 6B)。例如,在组合样品中泳道 6 (即,图 6B) 没有离散的超螺旋、切口和线性质粒,而用与单个酶温育之后存在至少 切口和线性质粒的大量剩余物 (图 6A,泳道 6)。

[0059] 任何具体 DNA 的期望的降解是起始 DNA 的大小、期望片段的大小和与混合物中选择比率的核酸酶的温育时间的函数。



[0001]

## 序列表

- <110> 新英格兰生物实验室公司  
谢沛仲  
管楚狄
- <120> 使用酶在DNA中产生随机双链断裂
- <130> NEB-321-PCT
- <150> US 61/149,675  
<151> 2009-02-03
- <150> US 61/158,815  
<151> 2009-03-10
- <150> US 61/275,531  
<151> 2009-08-31
- <160> 5
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- <220>  
<223> 引物
- <400> 1  
aaggttgaat tcgcccacc tagcicccttc tctgcc 36
- <210> 2  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- <220>  
<223> 引物
- <400> 2  
gtagaggat ccttattgag ttgacagga ttgctg 36
- <210> 3  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- <220>  
<223> 引物
- <400> 3  
caagtacgca aaagccaaac tcgcatcg 30
- <210> 4  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- <220>  
<223> 引物
- <400> 4  
tcgcatcgatc ttgcttttgc gtacttggta 30
- <210> 5  
<211> 213  
<212> PRT  
<213> 嗜盐弧菌
- <220>

[0002]

<221> MISC\_FEATURE  
 <222> (69)..(69)  
 <223> Q突变为S的突变体  
 <400> 5  
 Ala Pro Pro Ser Ser Phe Ser Ala Ala Lys Gln Gln Ala Val Lys Ile  
 1 5 10 15  
 Tyr Gln Asp His Pro Ile Ser Phe Tyr Cys Gly Cys Asp Ile Glu Trp  
 20 25 30  
 Gln Gly Lys Lys Gly Ile Pro Asn Leu Glu Thr Cys Gly Tyr Gln Val  
 35 40 45  
 Arg Lys Ser Gln Thr Arg Ala Ser Arg Ile Glu Trp Glu His Val Val  
 50 55 60  
 Pro Ala Trp Gln Phe Gly His His Arg Gln Cys Trp Gln Lys Gly Gly  
 65 70 75 80  
 Arg Lys Asn Cys Ser Lys Asn Asp Gln Gln Phe Arg Leu Met Glu Ala  
 85 90 95  
 Asp Leu His Asn Leu Thr Pro Ala Ile Gly Glu Val Asn Gly Asp Arg  
 100 105 110  
 Ser Asn Phe Asn Phe Ser Gln Trp Asn Gly Val Asp Gly Val Ser Tyr  
 115 120 125  
 Gly Arg Cys Glu Met Gln Val Asn Phe Lys Gln Arg Lys Val Met Pro  
 130 135 140  
 Gln Thr Glu Leu Arg Gly Ser Ile Ala Arg Thr Tyr Leu Tyr Met Ser  
 145 150 155 160  
 Gln Glu Tyr Gly Phe Gln Leu Ser Lys Gln Gln Gln Gln Leu Met Gln  
 165 170 175  
 Ala Trp Asn Lys Ser Tyr Pro Val Asp Glu Trp Glu Cys Thr Arg Asp  
 180 185 190  
 Asp Arg Ile Ala Lys Ile Gln Gly Asn His Asn Pro Phe Val Gln Gln  
 195 200 205  
 Ser Cys Gln Thr Gln  
 210

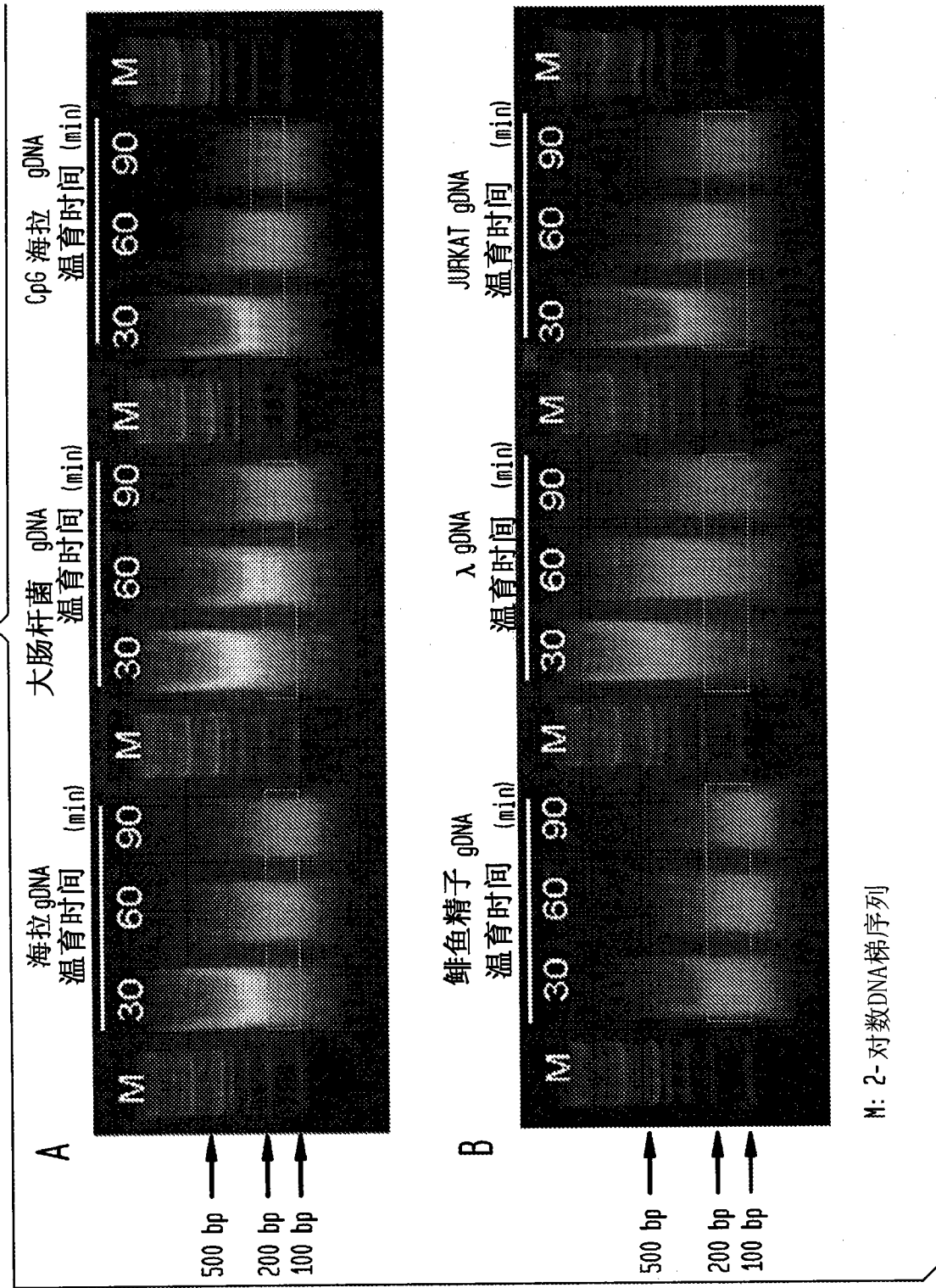


图 1

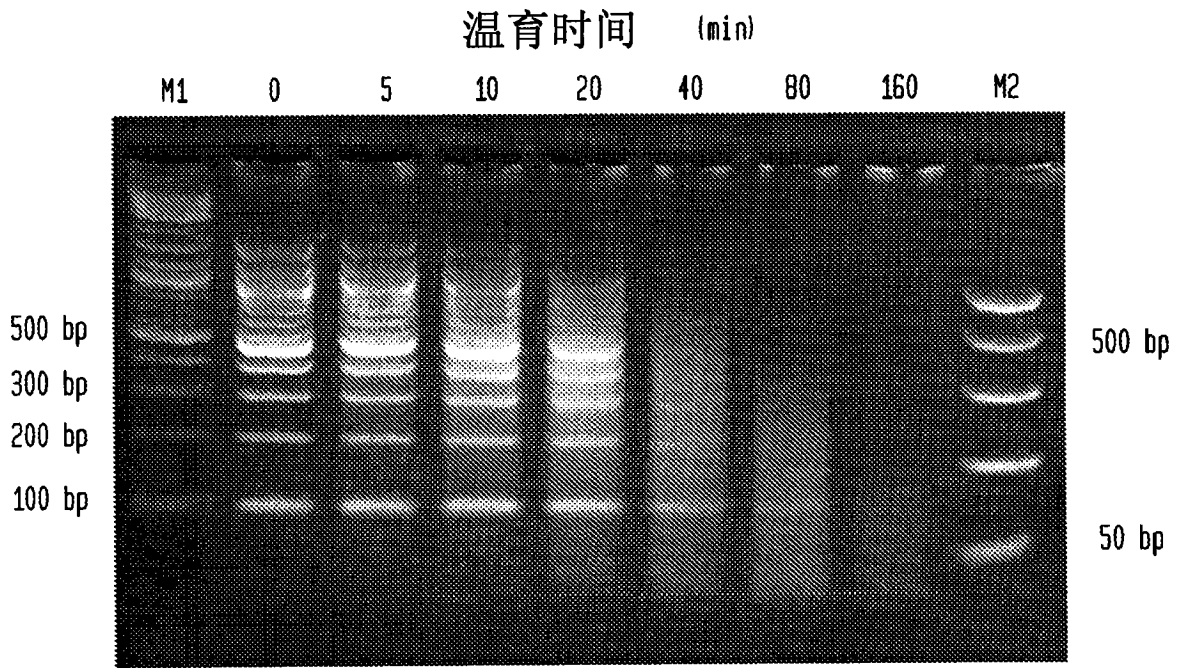


图 2

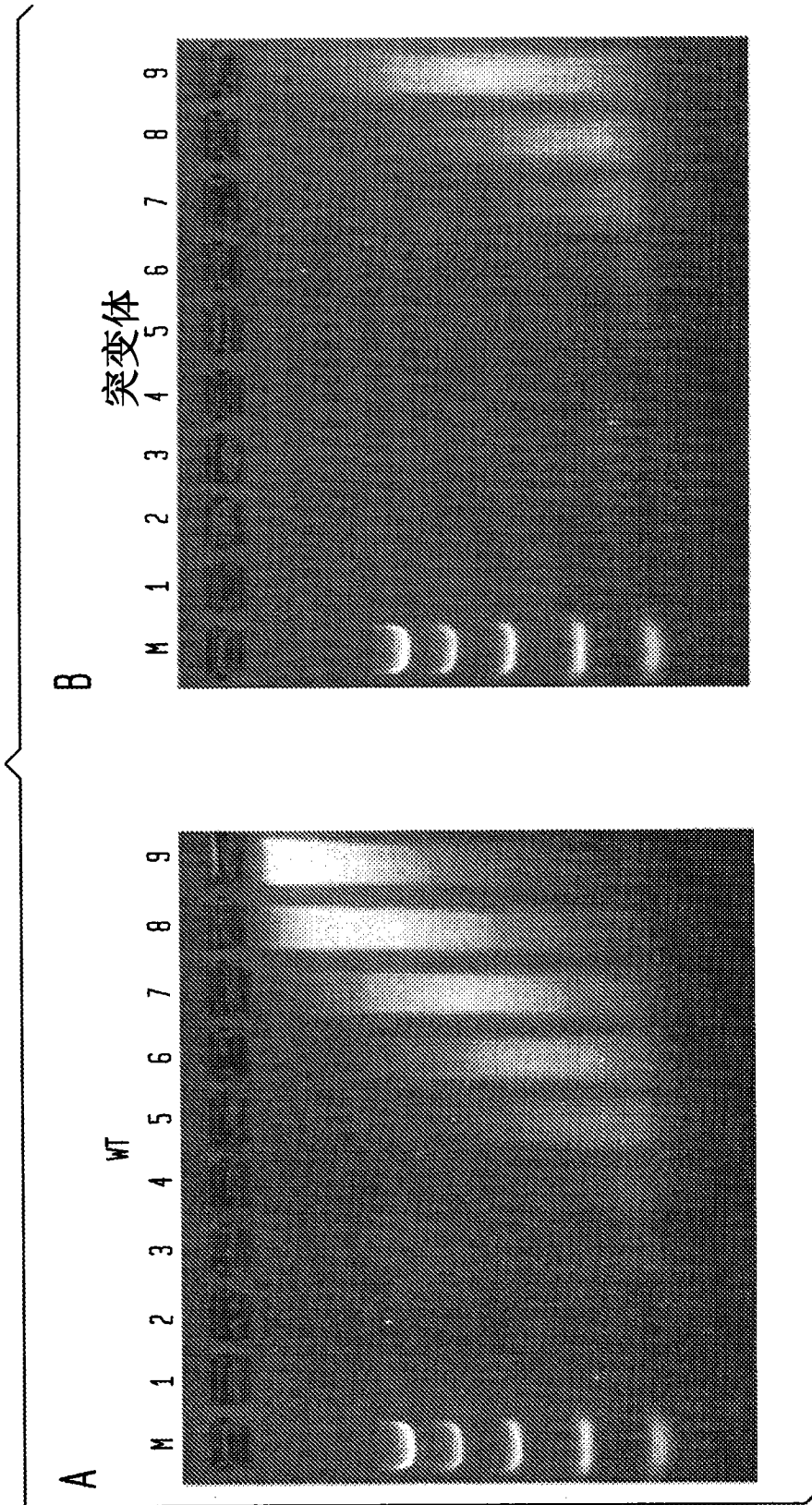


图 3

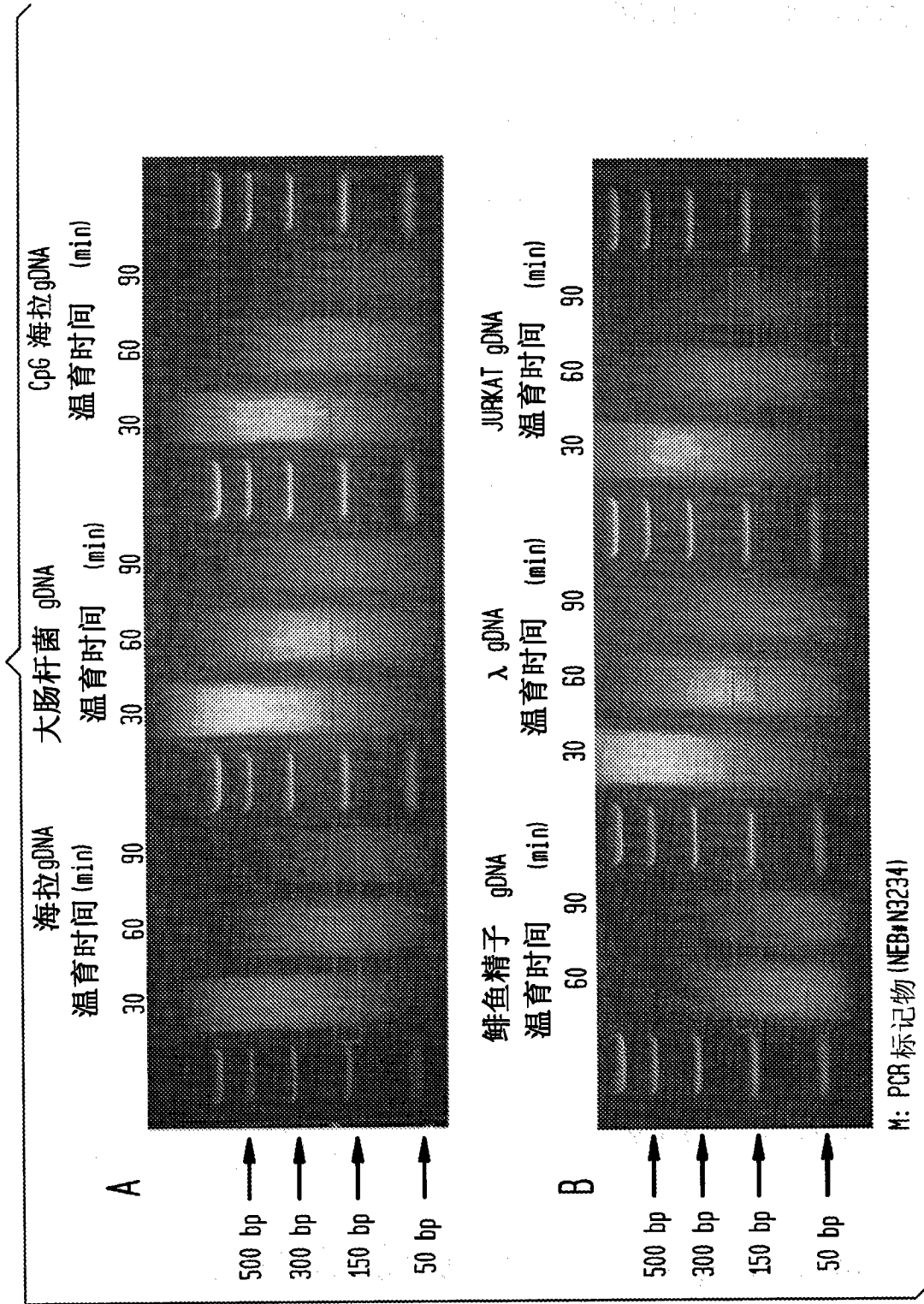


图 4

20	25	30	35	40	45	50	55
AP	PSSFS	AAKQQ	AVKIY	QDHPI	SFYCG	CDIEW	QGKKG
	60	65	*70	75	80	85	90
	IPNLE	TCGYQ	VRKSQ	TRASR	IEWEH	VVPAW	QFGHH
	95	100	105	110	115	120	125
	RQCWQ	KGGRK	NCSKN	DQQFR	LMEAD	LHNLT	PAIGE
	130	135	140	145	150	155	160
	VNGDR	SNFNF	SQWNG	VDGVS	YGRCE	MQVNF	KQRKV
	165	170	175	180	185	190	195
	MPQTE	LRGSI	ARTYL	YMSQE	YGFQL	SKQQQ	QLMQA
	200	205	210	215	220	225	230
	WNKSY	PVDEW	ECTRD	DRIAK	IQGNH	NPFVQ	QSCQT Q

(SEQ ID NO:5)

图 5





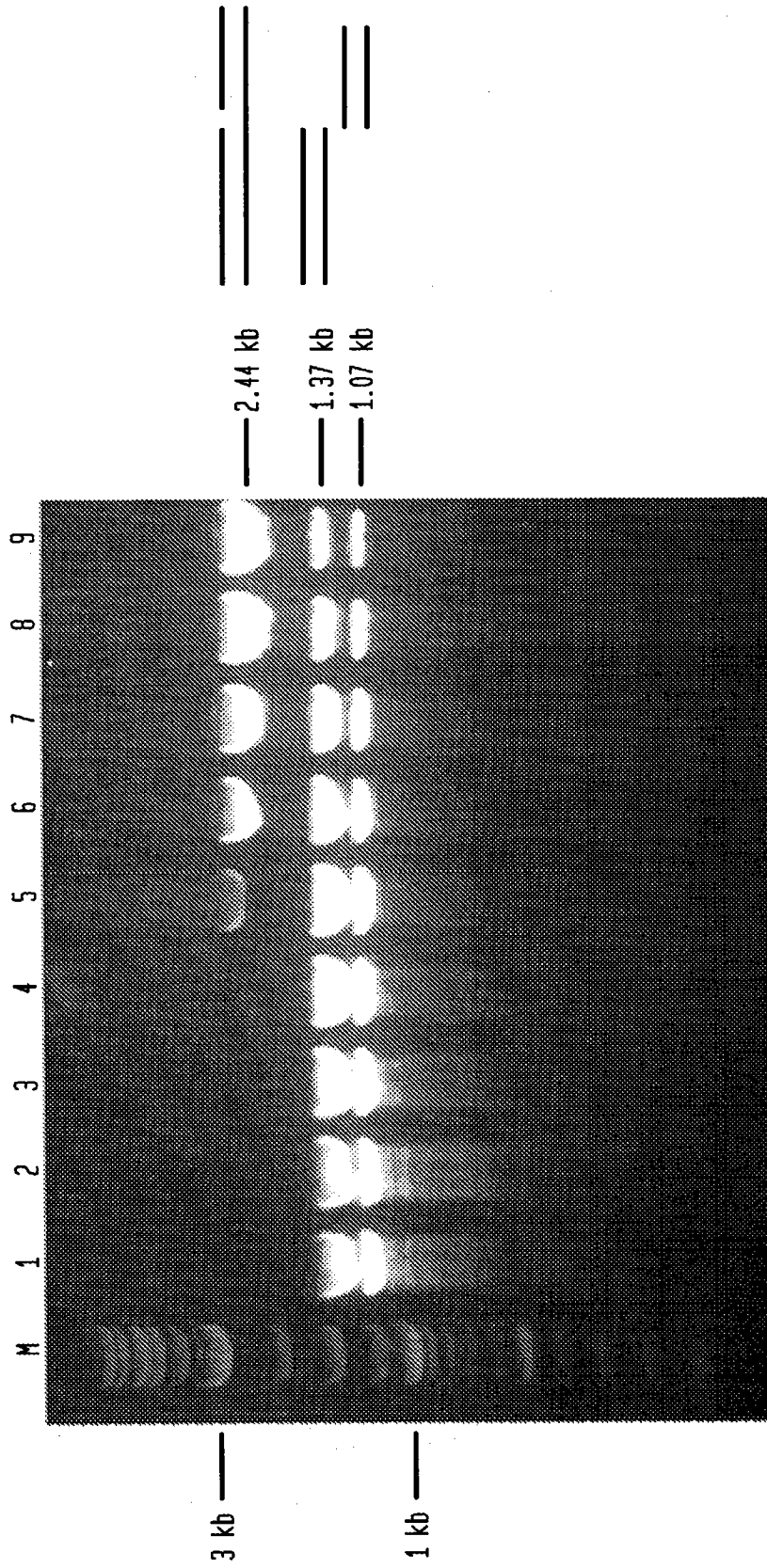
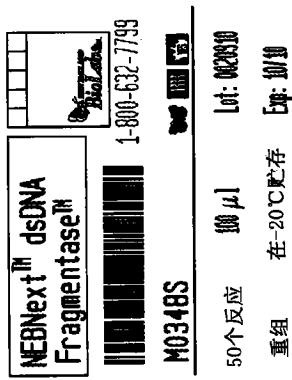


图 7



描述: NEBNext™ dsDNA Fragmentase™以时间-依赖方式产生dsDNA断裂, 以根据反应时间产生100-800 bp DNA片段(1)。NEBNext dsDNA Fragmentase包含两种酶, 一种在DNA上随机产生切口和另一种识别切口位点并从切口切开相对DNA链, 产生dsDNA断裂。所得到的DNA片段包含短突出端、5'-磷酸、和3'-羟基。NEBNext dsDNA Fragmentase的随机切口活性已经通过制备用于下一代测序的文库得以确认。用NEBNext dsDNA Fragmentase和机械剪切制备的gDNA的测序结果之间的比较显示NEBNext dsDNA Fragmentase在测序文库制备期间没有引入任何可检测出的偏好且用这两种方法没有发现测序覆盖上的不同(2)。

反应条件: 1×NEBNext dsDNA Fragmentase反应缓冲液, 补充100 μg/ml BSA。在37°C下温育。  
 1×NEBNext dsDNA Fragmentase反应缓冲液:  
 20 mM Tris-HCl  
 10 mM MgCl<sub>2</sub>  
 50 mM NaCl  
 0.15% Triton X-100

反应定义: 一种反应定义为在补充100 μg/ml BSA的20 μl 11×NEBNext dsDNA Fragmentase反应缓冲液中, 在37°C下30分钟内, 将1 μg纯化的海拉细胞gDNA转化成短(100-300 bp) DNA需要的NEBNext dsDNA Fragmentase的量。

加热失活: 在50 mM DTT存在时, 65°C, 15分钟。  
 质量保证: 无可检测的蛋白酶和磷酸酶活性。

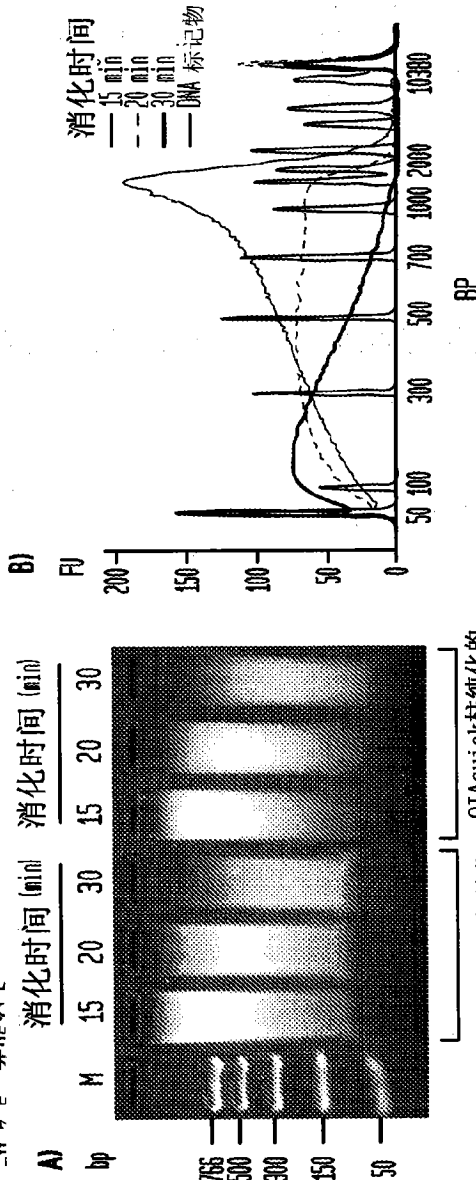


图1: 通过琼脂糖凝胶电泳(A)和BioAnalyzer 2100(B)分析海拉细胞gDNA断裂。5 μg的海拉基因组DNA和NEBNext dsDNA Fragmentase温育不同的时间, 如指示。断裂的DNA使用MinElute柱纯化并通过BioAnalyzer 2100分析。

图 8-1

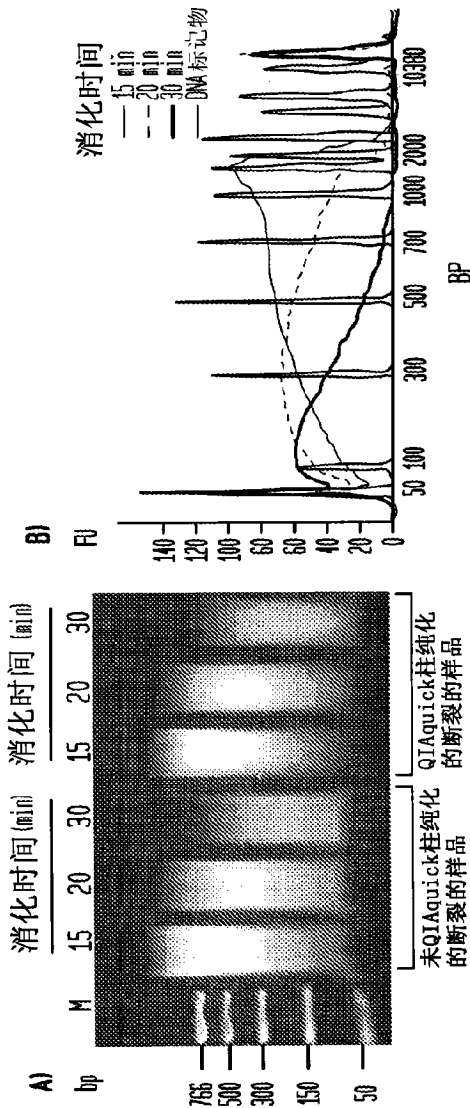


图2: 琼脂糖凝胶电泳 (A) 和BioAnalyzer 2100 (B) 分析E. coli DNA断裂。5 μg的E. coli基因组DNA和NEBNext dsDNA Fragmentase如指示的温育不同的时间。断裂的DNA使用MinElute柱纯化并通过BioAnalyzer 2100分析。

蛋白酶试验: 10 μl NEBNext dsDNA Fragmentase和0.2 mol蛋白质标准混合物在37°C下温育20小时, 导致通过SDS-PAGE检测的没有蛋白水解活性。

磷酸酶试验: 37°C下10 μl NEBNext dsDNA Fragmentase 在包含2.5 mM对硝基苯磷酸蛋白磷酸酶试验缓冲液中 (1 M二乙醇胺 pH 9.8和0.5 mM MgCl<sub>2</sub>) 温育1小时产生无可检测的对硝基苯基的阴离子如通过分光光度在405nm的分析所确定。

来源: NEBNext dsDNA Fragmentase 由分离自两种不同大肠杆菌来源的核酸内切酶组成: 一种结构表达由大肠杆菌麦芽糖结合蛋白和创伤弧菌核酸酶突变体蛋白组成的融合蛋白; 另一种表达由麦芽糖结合蛋白和T7核酸内切酶突变体蛋白组成的融合蛋白。

应用: 为在下一代测序平台上的测序产生dsDNA片段, 为文库产生dsDNA片段

提供在: 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 200 μg/ml BSA和50% 甘油中。

和酶一起提供的试剂: 10xNEBNext dsDNA Fragmentase反应缓冲液 100XBSA (100 mg/ml) 对应Fragmentase的大肠杆菌 DNA连接酶

质量控制实验 物理纯度: 纯化至>95%同质性如通过SDS-PAGE分析, 使用考马斯蓝检测确定。为了稳定, 酶中加入BSA。

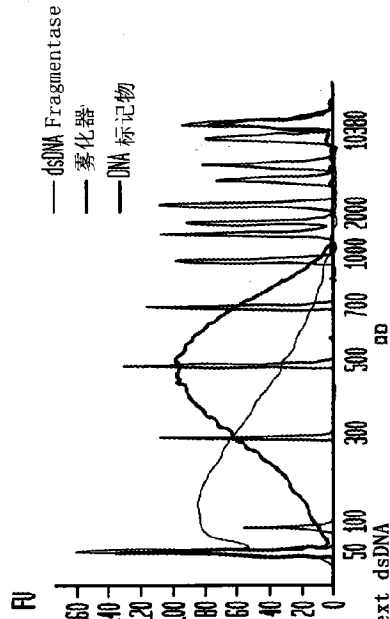


图3: 用NEBNext dsDNA Fragmentase与雾化器的大肠杆菌DNA片段相关大小分布的对照如使用BioAnalyzer 2100所看见。dsDNAFragmentase样品在37°C下和0.5 μgDNA每ml NEBNext dsDNAFragmentase在具有100 μg/mlBSA 的1xNEBNext dsDNAFragmentase 反应缓冲液中温育30分钟。雾化器样品通过在50%甘油中的DNA在35psi下雾化6分钟制备。

**方案:**  
**NEBNext dsDNA Fragmentase消化:**

起始材料的小心制备和浓度确定对于该反应成功是重要的。起始材料的推荐范围是1-5 μg/L 但是能使用较低或者较高的量。在反应中DNA的终浓度应该是0.05 μg/μl。添加NEBNext dsDNA Fragmentase 之前在冰上温育反应混合物5分钟。每DNA添加2 μl NEBNext dsDNA Fragmentase并如下述温育。  
1. 使用下面的指南建立消化反应（注意NEBNext dsDNA Fragmentase应该在此时添加）：

反应组分	起始DNA量 (μg)				
DNA (μg)	1	2	3	4	5
10X Fragmentase 反应缓冲液 (μl)	2	4	6	8	10
100X BSA (μl)	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
dsDNA Fragmentase (μl)	2	4	6	8	10
终浓度* (μl)	20	40	60	80	100

2. 在冰上温育5分钟。
3. 添加NEBNext dsDNA Fragmentase。
4. 根据下面推荐的时间在37℃下温育以产生期望片段大小（见注意）

期望片段大小 (bp)	温育时间 (min)
600-800	15
300-600	20
100-300	30

5. 添加5 μl 0.5M 的EDTA以停止反应。
6. 为DNA末端修复、大小选择或分析准备好DNA片段。

末端修复：清除断裂DNA（即，柱纯化）接着用期望的DNA末端修复方案处理。如果DNA片段打算用于为Illumina®基因组分析仪制备样品，对于具有1 μg DNA的末端修复反应为Fragmentase添加1 μl的大肠杆菌DNA连接酶或者对于具有<1 μg DNA的末端修复反应为Fragmentase添加0.5 μl的E. coli DNA连接酶  
琼脂糖凝胶大小选择/分析：样品直接加样到琼脂糖凝胶上。在加样之前没有必要清除反应。  
聚丙烯酰胺凝胶分析：样品加样在PAGE凝胶上之前清除断裂DNA（即，柱纯化）。  
长期贮存：在长期贮存之前清除断裂DNA（即，柱纯化）。  
注意：对于包含>60%GC含量的gDNA，需要用dsDNA Fragmentase较长的温育时间，以获得期望的片段大小。见在www.neb.com的应用注意。  
PCR产物和cDNA需要用dsDNA Fragmentase不同的温育时间以获得期望的片段大小。见在www.neb.com的应用注意。  
对于Fragmentase的E. coli DNA连接酶包含NAD且仅在与 NEBNext dsDNA Fragmentase温育和DNA清除之后在DNA末端修复反应中使用。不能添加E. coli DNA连接酶至NEBNext dsDNA Fragmentase反应。  
参考文献：  
1. 在审专利  
2. 未发表的观察数据  
仅为研究目的。  
商用可需要来自马萨诸塞州，伊普斯维奇，210国家路，New England Biolabs, Inc. 的许可。商业许可信息，联系busdev@neb.com。

图 8-3