

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2024年6月20日 (20.06.2024)



(10) 国际公布号
WO 2024/124567 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12Q 1/68 (2018.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2022/139739
- (22) 国际申请日: 2022年12月16日 (16.12.2022)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (71) 申请人: 深圳华大生命科学研究院 (BGI SHENZHEN) [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。
- (72) 发明人: 陈俊毅 (CHEN, Junyi); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。曾涛 (ZENG, Tao); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。季州翔 (JI, Zhouxiang); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。黎

宇翔 (LI, Yuxiang); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。董宇亮 (DONG, Yuliang); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。章文蔚 (ZHANG, Wenwei); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。徐讯 (XU, Xun); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。

- (74) 代理人: 北京汇知杰知识产权代理有限公司 (IP MARCH); 中国北京市海淀区知春路63号卫星大厦15层1508室, Beijing 100190 (CN)。
- (81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ,

(54) Title: NANOPORE SEQUENCING METHOD AND KIT

(54) 发明名称: 纳米孔测序方法和试剂盒

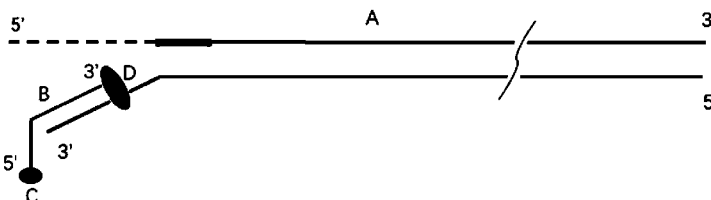


图 10

(57) Abstract: Provided are a nanopore sequencing method and a kit. The method comprises: 1) providing a sequencing library, comprising target polynucleotide double strands, wherein the target polynucleotide double strands comprise a first strand and a second strand, and a 5' end of the first strand and a 3' end of the second strand comprise non-paired first single-stranded regions, which comprise a guide sequence and a second primer pairing region, respectively; 2) incubating a first primer and the sequencing library to form a sequencing complex, wherein the first primer has a 3' free end and is attached, by means of a 5' end, to a membrane embedded with a nanopore; 3) making a polymerase with strand displacement activity extend, by using the second strand as a template, the first primer, wherein under the action of an electric field force, the guide sequence is captured by the nanopore on the membrane and passes through the nanopore, and as the extension proceeds, the first strand is obtained by displacement and passes through the nanopore; and 4) detecting an electric signal change generated when the first strand passes through the nanopore in the extension process, and determining sequence information of the first strand of the target polynucleotide double strands.

(57) 摘要: 一种纳米孔测序方法和试剂盒。所述方法包括: 1) 提供测序文库, 包括靶多核苷酸双链, 靶多核苷酸双链包括第一链和第二链, 第一链的5'端与第二链的3'端包括非配对的第一单链区, 分别含有引导序列和第二引物配对区; 2) 将第一引物与测序文库进行孵育以形成测序复合物, 所述第一引物具有3'自由端, 且通过5'端附着在嵌有纳米孔的膜上; 3) 使具有链置换活性的聚合酶以第二链为模板、延伸第一引物, 在电场力作用下, 引导序列被膜上的纳米孔捕获且穿过纳米孔, 随着延伸进行, 第一链被置换出, 并穿过纳米孔; 4) 检测延伸过程中第一链穿过纳米孔时产生的电信号变化, 确定靶多核苷酸双链的第一链的序列信息。

WO 2024/124567 A1

LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE,
PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

- (84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区
保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,
NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚
(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR,
HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO,
PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN,
TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

纳米孔测序方法和试剂盒

技术领域

本发明属于生物技术领域，具体而言，本发明提供了一种纳米孔测序方法和试剂盒。

5 背景技术

纳米孔测序技术是一种单分子水平检测技术，具有测序速度快、测序读长长、直接测序、通量高、成本低、体积小和便携带等优势。在纳米孔测序过程中，单个纳米孔镶嵌在绝缘防渗膜上，形成一个稳定的离子电流通道，在电压的作用下单链核酸分子穿过纳米孔，从而使通过纳米孔的离子电流减小。由于单链核酸分子上不同碱基的分子结构与体积大小不同，使得通过纳米孔的电流展现出对应于碱基序列的差异。利用算法解析电流变化信号，便可对穿孔的单链核酸序列实时读取。但是不加控制的单链核酸在穿过纳米孔时，由于速度过快，使得产生的电信号难以解析。同时，在正常测序过程中，双链核酸需要先转换为单链核酸才能通过纳米孔，进而完成测序。

因此现有技术中开发了不同的策略，以相对稳定的速度控制待测靶双链核酸转换为单链核酸，进而使单链核酸以相对稳定的速度穿过纳米孔，完成测序。

专利公开文本 CN105209634A 和 CN106460061A 公开了如下的测序技术路线。(1) 使用 Y 型测序接头复合物，其中接头的顶链由“引导序列+解旋酶结合位点+限位序列 (spacer) +与底链互补的序列”组成，接头的底链由“与顶链互补的序列+与拘束序列 (tether) 互补的序列”组成，顶链和底链退火为测序接头，解旋酶结合于接头中顶链的“解旋酶结合位点”，并停滞在限位序列处；(2) 把待测核酸与 Y 型测序接头复合物进行连接，获得测序文库；(3) 把测序文库、拘束序列 (tether) 和测序缓冲液加入到嵌有纳米孔的测序流体槽 (flow cell) 中，拘束序列将测序文库结合在镶嵌纳米孔蛋白的高分子膜上；(4) 在测序文库未被纳米孔捕获时，由于限位序列的存在，解旋酶无法解旋核酸双链，当测序文库被纳米孔捕获时，在电场力作用下，解旋酶移动并穿过限位序列，以相对稳定的速度进行核酸双链的解旋，实现测序。此项技术路线的缺点是：(1) 所采用的 Y 型测序接头复合物是解旋酶-核酸复合物，接头复合物构建流程复杂、产率低；(2) 采用 Y 型测序接头复合物构建的测序文库，需要同时保持解旋酶的生化活性及核酸的完整性，保存条件严苛，难以长期保存，须尽快进行测序。

35 美国授权专利 US10480027B2 公开了如下的测序技术路线。(1) 提供

一种聚合酶-核酸复合物，其包含链置换聚合酶和环状核酸模板，并提供核酸合成所需的组分，由此聚合产生新合成链。(2) 随着时间的推移，新合成链通过纳米孔，通过测量电流变化确定新生链的序列。专利公开文本 CN113366120A 也公开了类似的技术路线。这类技术路线的缺点是：在 DNA 合成的新生链被纳米孔捕获前，新生链的合成是一直进行的、不受控制地持续合成，新生链易形成复杂的二级结构，难以被纳米孔捕获，完成测序。#

因此，本领域中需要改进纳米孔测序技术。

发明内容

10 本发明的目标在于至少部分地解决或改进纳米孔测序技术中如下的一项或多项问题：测序接头复合物构建流程复杂、产率低、保存条件严苛、难以长期保存；使用聚合酶合成的新生链在通过纳米孔前容易形成二级结构；测序系统复杂度高。

15 因此，在第一方面，本发明提出了一种纳米孔测序方法，所述方法包括：

1) 提供测序文库，所述测序文库包括靶多核苷酸双链，所述靶多核苷酸双链包括第一链和第二链，所述第一链的 5'端与所述第二链的 3'端包括非配对的第一单链区，在所述第一链的第一单链区 5'端含有引导序列，在所述第二链的第一单链区 3'端含有第二引物配对区；

20 2) 将第一引物与所述测序文库进行孵育以形成测序复合物，其中，所述第一引物与所述第二引物配对区通过碱基互补配对原则进行结合，所述第一引物具有 3'自由端，且所述复合物通过所述第一引物的 5'端附着在嵌有纳米孔的膜上；

25 3) 使具有链置换活性的聚合酶以第二链为模板、延伸所述第一引物，在电场力作用下，所述引导序列被膜上的纳米孔捕获且穿过纳米孔，随着延伸的进行，所述第一链被置换出，并穿过纳米孔；

4) 检测延伸过程中所述第一链穿过纳米孔时产生的电信号变化，确定所述靶多核苷酸双链的第一链的序列信息。

30 在一个优选的实施方案中，在 1) 中，所述第一链的 3'端与所述第二链的 5'端序列完全互补配对形成配对区。

在一个优选的实施方案中，在 1) 中，所述靶多核苷酸双链进一步包括：所述第一链的 3'端与所述第二链的 5'端包括非配对的第二单链区，在所述第一链的第二单链区 3'端包括第一引物配对区。

35 在一个优选的实施方案中，在 2) 中，将第一引物、第二引物与所述测序文库进行孵育以形成测序复合物，其中，所述第一引物与所述第二引物配对区通过碱基互补配对原则进行结合，所述第二引物与所述第一引物配对区通过碱基互补配对原则进行结合，且所述复合物通过所述第一引物

和/或所述第二引物的 5'端固定在嵌有纳米孔的膜上。

5 在一个优选的实施方案中,所述方法进一步包括:5)聚合酶以所述第一链为模板延伸所述第二引物,使得所述第一链以逆电场方向退出膜上的纳米孔,检测所述第一链退出纳米孔时产生的电信号变化,再次确定所述靶多核苷酸双链的第一链的序列信息。

在一个优选的实施方案中,所述第二链的 5'端含有引导序列。

在一个优选的实施方案中,在 1)中,所述靶多核苷酸双链进一步包括:所述第一链的 3'末端和所述第二链的 5'末端相连接,使得所述靶多核苷酸双链在该末端具有发夹结构。

10 在一个优选的实施方案中,所述方法进一步包括 5)延伸至所述发卡结构后,聚合酶以所述第一链为模板继续进行延伸,使得所述第一链以逆电场方向退出膜上的纳米孔,检测所述第一链退出纳米孔时产生的电信号变化,再次确定所述靶多核苷酸双链的第一链的序列信息。

15 在某些实施方案中,所述具有链置换活性的聚合酶为具有耐盐性的聚合酶。

在某些实施方案中,具有链置换活性的聚合酶是 DNA 聚合酶或 RNA 聚合酶,如 Bst DNA 聚合酶、SD DNA 聚合酶、phi29 DNA 聚合酶、Bsu Large Fragment DNA 聚合酶、Klenow Fragment DNA 聚合酶、T3 RNA 聚合酶、T7 RNA 聚合酶、SP6 RNA 聚合酶、E. coli RNA 聚合酶或其任意组合;或者所述聚合酶是无链置换活性聚合酶经过改造后具有链置换活性的聚合酶,如 T4 DNA 聚合酶、T7 DNA 聚合酶、DNA 聚合酶 I 或其任意组合。

25 在一个实施方案中,通过多核苷酸双链上连接 Y 型接头制备靶多核苷酸双链,所述 Y 型接头包括引导序列和引物配对区,在与多核苷酸双链连接后使得获得的靶多核苷酸第一链的 5'端含有引导序列,第二链的 3'端包括第二引物配对区。

在一个实施方案中,所述引物为核酸单链,优选长度小于 80 个核苷酸,例如小于 70、60 或 50 个核苷酸。

30 在一个实施方案中,所述引物的 5'端连接有疏水性分子,优选为选自以下任意一种或多种:脂质、脂肪酸、甾醇、碳纳米管、多肽、蛋白质和/或氨基酸,如胆固醇、棕榈酸酯或生育酚。

在一个实施方案中,所述引导序列包含多核苷酸或多个 iSpC3。优选地,所述多核苷酸为同聚多核苷酸。

在一个实施方案中,所述引导序列长度可以是 10-50 个核苷酸或 iSpC3,例如 20、30 或 40 个核苷酸或 iSpC3。

35 在某些实施方案中,所述纳米孔是跨膜蛋白孔或固态孔。

在某些实施方案中,所述跨膜蛋白孔选自溶血素、MspA、MspB、MspC、MspD、FraC、ClyA、PA63、CsgG、CsgD、XcpQ、SP1、phi29 连接器蛋白(phi29 connector)、InvG、GspD 或其任意组合。

在某些实施方案中，所述纳米孔还连接有另外的多肽，所述另外的多肽选自标签、酶切位点、信号肽或导肽、可检测的标记或其任意组合。

在某些实施方案中，所述膜是两亲性膜（例如磷脂双分子层）、高分子聚合物膜（例如两嵌段共聚物 di-block、三嵌段共聚物 tri-block）或其任意组合。

在某些实施方案中，所述引导序列的 3' 端连接有抑制聚合酶链置换聚合活性的抑制区段。

在某些实施方案中，所述抑制区段是 GC 富含基序、人工修饰核苷酸、其他抑制分子或其任意组合。

在某些实施方案中，所述人工修饰核苷酸是 LNA、PNA、BNA 或其任意组合。

在某些实施方案中，所述人工修饰核苷酸是 LNA，其个数为 2-10 个，优选 4-8 个。

在某些实施方案中，所述方法在如下的缓冲液或测序缓冲液中进行：磷酸二氢根-磷酸氢根缓冲体系、碳酸-碳酸氢钠缓冲体系、Tris-HCl 缓冲体系、HEPES 缓冲体系、MOPS 缓冲体系或其任意组合。

在某些实施方案中，所述反应缓冲液或测序缓冲液含有 NTP、dNTP、ddNTP 或其任意组合。

在某些实施方案中，所述反应缓冲液或测序缓冲液含有 K⁺、Na⁺ 或其任意组合。

在某些实施方案中，所述反应缓冲液或测序缓冲液含有 Mg²⁺、Mo²⁺、Cu²⁺、Fe²⁺、Zn²⁺、Ca²⁺、Pb²⁺、Cd²⁺ 或其任意组合。

在某些实施方案中，所述反应缓冲液或测序缓冲液含有增强聚合酶延伸反应常用的添加剂或辅助试剂，如二甲基亚砷（DMSO）、甘油、甲酰胺、牛血清白蛋白（BSA）、硫酸铵（(NH₄)₂SO₄）、聚乙二醇（PEG）、明胶、非离子型去污剂（如 Tween 20, Triton X-100）、N,N,N-三甲基甘氨酸（甜菜碱）、单链核酸结合蛋白或其任意组合。

在某些实施方案中，对膜两侧施加电压以形成电场力。在某些实施方案中，所述电压是 10 mV 以上，优选 50 mV-250 mV 的电压。

在第二方面，本发明提供了一种试剂盒，包括：

用于与核苷酸双链连接的 Y 型接头，所述 Y 型接头两条链上分别包括引导序列和引物配对区，在与核苷酸双链连接后使得获得的靶多核苷酸第一链的 5' 端含有引导序列，第二链的 3' 端包括引物配对区；

纳米孔；

膜；

引物，所述引物与所述引物配对区互补，所述引物的 5' 端具有固定部件，用于附着在膜上；

具有链置换活性的聚合酶；

进行聚合反应的缓冲体系。

在某些实施方案中，所述纳米孔嵌入所述膜中。

在某些实施方案中，所述引导序列的3'端连接有抑制聚合酶链置换聚合活性的抑制区段。

5 在某些实施方案中，所述抑制区段为GC富含基序或人工修饰核苷酸。

在某些实施方案中，所述人工修饰核苷酸是LNA、PNA、BNA或其任意组合。

在某些实施方案中，所述人工修饰核苷酸是LNA，其个数为2-10个，优选4-8个。

10 在某些实施方案中，所述引物为核酸单链，优选长度小于80个核苷酸，例如小于70、60或50个核苷酸。

在某些实施方案中，所述引物5'端连接有疏水性分子，优选为选自以下任意一种或多种：脂质、脂肪酸、甾醇、碳纳米管、多肽、蛋白质和/或氨基酸，如胆固醇、棕榈酸酯或生育酚。

15 在某些实施方案中，所述引导序列包含多核苷酸或iSpC3。

在某些实施方案中，所述引导序列长度可以是10-50，例如20、30或40个核苷酸或iSpC3。

在某些实施方案中，所述具有链置换活性的聚合酶为DNA聚合酶或RNA聚合酶。

20 在某些实施方案中，所述具有链置换活性的聚合酶为耐盐聚合酶。

在某些实施方案中，所述聚合酶为无链置换活性聚合酶经过改造后具有链置换活性的聚合酶。

在某些实施方案中，所述具有链置换活性的聚合酶为DNA聚合酶或RNA聚合酶，例如Bst DNA聚合酶、SD DNA聚合酶、phi29 DNA聚合酶、Bsu Large Fragment DNA聚合酶、Klenow Fragment DNA聚合酶、T3 RNA聚合酶、T7 RNA聚合酶、SP6 RNA聚合酶、E. coli RNA聚合酶或其任意组合；或者所述聚合酶是无链置换活性聚合酶经过改造后具有链置换活性的聚合酶，例如T4 DNA聚合酶、T7 DNA聚合酶、DNA聚合酶I或其任意组合。

30 在某些实施方案中，所述纳米孔是跨膜蛋白孔或固态孔。

在某些实施方案中，所述跨膜蛋白孔选自溶血素、MspA、MspB、MspC、MspD、FraC、ClyA、PA63、CsgG、CsgD、XcpQ、SP1、Phi29连接器蛋白、InvG、GspD或其任意组合。

在某些实施方案中，所述纳米孔还连接有另外的多肽，所述另外的多肽选自标签、酶切位点、信号肽或导肽、可检测的标记或其任意组合。

35 在某些实施方案中，所述膜是两亲性膜、高分子聚合物膜或其任意组合。

在某些实施方案中，所述膜是磷脂双分子层、两嵌段共聚物或三嵌段

共聚物。

在某些实施方案中，所述进行聚合反应的缓冲体系是磷酸二氢根-磷酸氢根缓冲体系、碳酸-碳酸氢钠缓冲体系、Tris-HCl 缓冲体系、HEPES 缓冲体系、MOPS 缓冲体系或其任意组合。

5 在某些实施方案中，所述进行聚合反应的缓冲体系含有 NTP、dNTP、ddNTP 或其任意组合。

在某些实施方案中，所述进行聚合反应的缓冲体系含有增强聚合酶延伸反应常用的添加剂或辅助试剂，如二甲基亚砜 (DMSO)、甘油、甲酰胺、牛血清白蛋白 (BSA)、硫酸铵 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、聚乙二醇 (PEG)、
10 明胶、非离子型去污剂 (如 Tween 20, Triton X-100)、N,N,N-三甲基甘氨酸 (甜菜碱)、单链核酸结合蛋白或其任意组合。

在第三方面，本发明提供了本发明第二方面的试剂盒在高通量测序中的应用，所述高通量测序优选为纳米孔测序。

本发明的优点在于如下的一项或多项：本发明的测序文库和测序接头
15 构成简单、测序文库构建流程简便，并且测序文库可以长期保存。本发明方法由具有链置换活性的聚合酶以相对稳定的速度打开双链、合成新生链，因此测序链的穿孔速度相对稳定。本发明方法在测序文库被纳米孔捕获之后，才会持续进行 DNA 合成、产生新生链。因此，可以避免“在测序文库被纳米孔捕获之前，由于新生链的持续合成，产生复杂的二级结构，进
20 而导致不能正常测序”的问题。

附图说明

为了更清楚地说明本发明具体实施方式或现有技术中的技术方案，下面将对具体实施方式或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍，
25 显而易见地，下面描述中的附图是本发明的一些实施方式，对于本领域普通技术人员来讲，在不付出创造性劳动的前提下，还可以根据这些附图获得其他的附图。

图 1 示出了根据本发明一个实施方案的纳米孔测序方法示意图。

图 2 示出了根据本发明另一个实施方案的纳米孔测序方法示意图。

图 3 示出了根据本发明再一个实施方案的纳米孔测序方法示意图。

30 图 4 示出了实施例 1 和实施例 2 的实验示意图，(a) 多聚核苷酸 A 链和 B 链退火为 Y 型核酸双链体结构，(b) A 链含有 2 个 LNA、4 个 LNA、8 个 LNA (加粗黑色线段表示)。

图 5 示出了实施例 1 和实施例 2 的 Y 型核酸双链体退火产物电泳图。
泳道 1-4 分别为 SEQ.1+ SEQ.2 (Y-0LNA)、SEQ.4+ SEQ.2 (Y-2LNA)、
35 SEQ.5+ SEQ.2 (Y-4LNA)、SEQ.6+ SEQ.2 (Y-8LNA) 的退火产物，箭头标示 Y 型核酸双链体；泳道 5-9 分别为 SEQ.1、SEQ.4、SEQ.5、SEQ.6、SEQ.2；泳道 10 为 DNA 分子量标准。

图 6 示出了实施例 1 筛选具有链置换活性且耐盐的聚合酶。

图 7 示出了实施例 2 检测非模板链中修饰核苷酸抑制聚合酶链置换聚合活性。Y-0LNA 的非模板链中含 0 个 LNA，Y-2LNA 的非模板链中含 2 个 LNA，Y-4LNA 的非模板链中含 4 个 LNA，Y-8LNA 的非模板链中含 8 个 LNA。

图 8 示出了实施例 3 测序文库构建示意图，(a)测序接头示意图，(b)测序文库示意图。

图 9 示出了实施例 3 测序文库电泳胶图。

图 10 示出了实施例 4 测序复合物示意图。

图 11 示出了实施例 4 纳米孔测序典型的待测靶多核苷酸的电流信号图。

图 12 示出了实施例中使用的 iSp18 的具体结构。

图 13 示出了实施例中使用的 iSpC3 的具体结构。

具体实施方式

为了使本发明的上述以及其他特征和优点更加清楚，下面结合附图进一步描述本发明。应当理解，本文给出的具体实施例是出于向本领域技术人员解释的目的，仅是示例性的，而非限制性的。对于本领域的普通技术人员而言，可以根据具体情况理解术语在本发明中的具体含义，除非另有明确的限定。此外，在不相互矛盾的情况下，本领域的技术人员可以将本说明书中描述的不同实施例或示例以及不同实施例或示例的特征进行结合和组合。

图 1 展示了本发明的纳米孔测序方法的一个示例性过程。Y 型双链测序接头（在图中为六边形圈出的结构）由顶链和底链退火形成，Y 型双链测序接头与靶多核苷酸双链的一端连接，进而构建为测序文库。构建完成的测序文库可以参照常规双链多核苷酸的方法长期保存。构建完成的测序文库由 A 链和 B 链组成，其中 B 链为测序链，A 链为测序链的互补链。A 链 3' 末端能够与引物 C 链互补配对；B 链 5' 末端为引导序列（在图中以黑色虚线表示，参照专利公开文本 CN 103733063A），与引导序列 3' 端相连接的是抑制区段（在图中以加粗黑色线段表示），抑制区段能够抑制聚合酶的链置换聚合活性。抑制区段的具体形式不受限制，只要能够抑制聚合酶的链置换聚合活性的分子均可以。例如，抑制区段可以是具有更强结合力的 GC 富含基序、人工修饰核苷酸（如 LNA、PNA、BNA）或其他抑制分子等。引导序列与抑制区段均在 B 链上。整个测序过程如下：（1）将测序文库（A 链和 B 链）、引物（C 链），以及具有链置换活性的聚合酶（在图中以椭圆表示）混匀孵育；C 链结合于 A 链 3' 末端，具有链置换活性的聚合酶结合于靶多核苷酸上，进而形成测序复合物。（2）具有链置换活性的聚合酶以 A 链为模板、C 链为引物，利用测序缓冲液中的必要组分，如 pH 缓冲体系、dNTP、Mg²⁺ 等，启动链置换的聚合反应。以 A 链为

模板、置换 B 链、并延伸 C 链，直至聚合酶的链置换聚合活性被抑制区段所抑制。由于 C 链 5' 末端连接胆固醇等疏水性分子(在图中以圆形表示)，因此，测序复合物在胆固醇等疏水性分子作用下结合在纳米孔附近的膜材料上(在图中以方块表示膜，中间通道表示纳米孔，参照专利公开文本 CN 103733063A)。引物 5' 端还可以连接其他疏水性分子，例如脂质、脂肪酸、甾醇、碳纳米管、多肽、蛋白质和/或氨基酸，如棕榈酸酯、生育酚。引物也可以含有多种天然或非天然修饰核苷酸。施加测序电压后，在电场力作用下，测序链 B 链 5' 末端的引导序列被纳米孔捕获，穿过纳米孔(在图中以向下箭头表示)。(3) 在电场力作用下，抑制区段穿过纳米孔。具有链置换活性的聚合酶以稳定的速度，以 A 链为模板、置换 B 链、并延伸 C 链。(4) B 链以相对稳定的速度被置换出，并以相对稳定的速度穿过纳米孔，实现稳定测序。(5) C 链延伸至 A 链末端，形成新的双链体，被置换出的 B 链则完全穿过纳米孔，完成测序。

图 2 展示了本发明的纳米孔测序方法的另一个示例性流程。Y 型双链测序接头由顶链和底链退火形成，Y 型双链测序接头 1 与靶多核苷酸双链的一端连接，Y 型双链测序接头 2 与靶多核苷酸双链的另一端连接，进而构建为测序文库。Y 接头 1 与 Y 接头 2 的具体序列不受限制，它们也可以相同，也可以不同。构建完成的测序文库可以参照常規双链多核苷酸的方法长期保存。测序文库由 A 链和 B 链组成，其中 B 链为测序链，A 链为测序链的互补链。A 链的 3' 末端能够与引物 C 链互补配对，5' 末端为引导序列 1 (在图中以黑色虚线表示)，与引导序列 1 的 3' 端相连接的是抑制区段 1 (在图中以加粗黑色线段表示)，抑制区段 1 能够抑制聚合酶的链置换聚合活性。抑制区段 1 的具体形式不受限制，只要能够抑制聚合酶的链置换聚合活性的分子均可以。例如，抑制区段 1 可以是具有更强结合力的 GC 富含基序、人工修饰核苷酸(如 LNA、PNA、BNA)或其他抑制分子等。引导序列 1 与抑制区段 1 均在 A 链上。同样的，B 链的 3' 末端能够与引物 C' 链互补配对，5' 末端为引导序列 2，与引导序列 2 的 3' 端相连接的是抑制区段 2 (在图中以加粗黑色线段表示)，抑制区段 2 能够抑制聚合酶的链置换聚合活性。抑制区段 2 的具体形式不受限制，只要能够抑制聚合酶的链置换聚合活性的分子均可以。例如，抑制区段 2 可以是具有更强结合力的 GC 富含基序、人工修饰核苷酸(如 LNA、PNA、BNA)，或其他抑制分子等。引导序列 2 与抑制区段 2 均在 B 链上。整个测序过程如下：(1) 将测序文库(A 链和 B 链)与引物(C 链和 C' 链)，以及具有链置换活性的聚合酶(在图中以椭圆表示)混匀孵育；C 链与 A 链 3' 端互补配对，C' 链与 B 链 3' 端互补配对；具有链置换活性的聚合酶结合于靶多核苷酸上，进而形成测序复合物。(2) 在靶多核苷酸双链的一端，具有链置换活性的聚合酶，以 A 链为模板、C 链为引物，利用测序缓冲液中的必要组分，如 pH 缓冲体系、dNTP、Mg²⁺等，启动链置换聚合反应，

以 A 链为模板、置换 B 链、并延伸 C 链，直至聚合酶的链置换聚合活性被抑制区段 2 所抑制。同样的，在靶多核苷酸双链的另一端，具有链置换活性的聚合酶，以 B 链为模板、C' 链为引物，利用测序缓冲液中的必要组分，如 pH 缓冲体系、dNTP、Mg²⁺ 等，启动链置换聚合反应，以 B 链为模板、置换 A 链、并延伸 C' 链，直至聚合酶的链置换聚合活性被抑制区段 1 所抑制。由于 C 链和 C' 链 5' 末端连接胆固醇等疏水性分子（在图中以圆形表示），因此，测序复合物在胆固醇等疏水性分子作用下结合在纳米孔附近的膜材料上（在图中以方块表示膜，中间通道表示纳米孔）。施加测序电压后，在电场力作用下，测序链 B 链 5' 末端的引导序列 2 被纳米孔捕获，穿过纳米孔（在图中以向下箭头表示）。（3）在电场力作用下，B 链的抑制区段 2 穿过纳米孔。具有链置换活性的聚合酶以稳定的速度，以 A 链为模板、置换 B 链、并延伸 C 链。（4）B 链以相对稳定的速度被置换出，并以相对稳定的速度穿过纳米孔，实现稳定测序。（5）C 链延伸至 A 链末端，形成新的核酸双链体，而被置换出的 B 链穿过纳米孔直至遇到另一端的聚合酶，聚合酶利用测序缓冲液中的必要组分，如 pH 缓冲体系、dNTP、Mg²⁺ 等，启动聚合反应，以 B 链为模板、延伸 C' 链。（6）随着 C' 链的延伸，逆电场力方向，B 链以相对稳定的速度从纳米孔中拔出（在图中以向上箭头表示）。（7）C' 链延伸至 B 链 5' 末端，形成新的核酸双链体，B 链也被完全从纳米孔中拔出。整个过程对同一条 B 链进行了两次测序。

图 3 展示了本发明的纳米孔测序方法的再一个示例性流程。Y 型双链测序接头由顶链和底链退火形成，发卡型接头由一条单链退火形成，靶多核苷酸双链一端连接 Y 型双链测序接头，另一端为发卡结构，例如通过连接发卡型接头形成发卡结构，进而构建为测序文库。构建完成的测序文库可以参照常规双链多核苷酸的方法长期保存。构建完成的测序文库由 A 链和 B 链组成，其中 B 链为测序链，A 链为测序链的互补链。A 链 3' 末端与引物 C 链互补配对；B 链 5' 末端为引导序列（在图中以黑色虚线表示），与引导序列 3' 端相连接的是抑制区段（在图中以加粗黑色线段表示），抑制区段能够抑制聚合酶的链置换聚合活性。抑制区段的具体形式不受限制，只要能够抑制聚合酶的链置换聚合活性的分子均可以。例如，抑制区段可以是具有更强结合力的 GC 富含基序、人工修饰核苷酸（如 LNA、PNA、BNA），或其他抑制分子等。引导序列与抑制区段均在 B 链上。整个测序过程如下：（1）将测序文库（A 链和 B 链）、引物（C 链），以及具有链置换活性的聚合酶（在图中以椭圆表示）混匀孵育；C 链结合于 A 链 3' 末端，具有链置换活性的聚合酶结合于靶多核苷酸上，进而形成待测序复合物。（2）具有链置换活性的聚合酶以 A 链为模板、C 链为引物，利用测序缓冲液中的必要组分，如 pH 缓冲体系、dNTP、Mg²⁺ 等，启动链置换聚合反应。以 A 链为模板、置换 B 链、并延伸 C 链，直至聚合酶的链

置换聚合活性被抑制区段所抑制。由于 C 链 5' 末端连接胆固醇等疏水性分子（在图中以圆形表示），因此，测序复合物在胆固醇等疏水性分子作用下结合在纳米孔附近的膜材料上（在图中以方块表示膜，中间通道表示纳米孔），施加测序电压后，在电场力作用下，测序链 B 链 5' 末端的引导序列被纳米孔捕获，穿过纳米孔（在图中以向下箭头表示）。（3）在电场力作用下，抑制区段穿过纳米孔。具有链置换活性的聚合酶以稳定的速度，以 A 链为模板、置换 B 链、并延伸 C 链。（4）B 链以相对稳定的速度被置换出，并以相对稳定的速度穿过纳米孔，实现稳定测序。（5）C 链延伸至 A 链末端，发卡结构被打开，聚合酶以原发夹结构序列和 B 链为模板、继续延伸 C 链。随着 C 链延伸，逆电场力方向，B 链以相对稳定的速度从纳米孔中拔出（在图中以向上箭头表示）。（6）C 链延伸至 B 链末端，形成新的核酸双链体，B 链也被完全从纳米孔中拔出。整个过程对同一条 B 链进行了两次测序。

在本发明中，所述具有链置换活性的聚合酶可以选自 DNA 聚合酶或 RNA 聚合酶，例如 Bst DNA 聚合酶、SD DNA 聚合酶、phi29 DNA 聚合酶、Bsu Large Fragment DNA 聚合酶、Klenow Fragment DNA 聚合酶、T3 RNA 聚合酶、T7 RNA 聚合酶、SP6 RNA 聚合酶、E. coli RNA 聚合酶或其任意组合；或者所述聚合酶是无链置换活性聚合酶经过改造后具有链置换活性的聚合酶，例如 T4 DNA 聚合酶、T7 DNA 聚合酶、DNA 聚合酶 I 或其任意组合。

实施例一：筛选具有链置换活性的耐盐聚合酶。

在图 4 中的 (a) 示出了实施例 1 的实验示意图。多聚核苷酸 SEQ.1 (A 链) 和 SEQ.2 (B 链) 退火为 Y 型核酸双链体结构，命名为 Y-0LNA；SEQ.3 (C 链) 长度为 15 nt，5' 末端带有 CY3 荧光修饰（星形符号表示），且与 SEQ.2 (B 链) 的 3' 末端互补配对；聚合酶（椭圆符号表示）结合核酸复合物。图 13 示出了其中 iSpC3 的具体结构。在反应缓冲液中，聚合酶以 B 链为模板、延伸 C 链；如果聚合酶没有活性，则 C 链不能延伸，仍为 15 nt；如果聚合酶没有链置换聚合活性，则 A 链不能被置换，只能延伸 C 链到 21 nt；如果聚合酶具有链置换聚合活性，则 A 链可以被完全置换，延伸 C 链到 48 nt；通过电泳检测 C 链长度。

1、Y 型核酸双链体退火。

1) 按照生产商说明将 SEQ.1、SEQ.2、SEQ.3 分别用 TE 缓冲液 (pH = 8) 溶解成终浓度 100 μ M 的母液。

2) 将 SEQ.1 和 SEQ.2 退火为 Y 型核酸双链体，命名为 Y-0LNA。退火流程为 95°C 孵育 5 分钟，0.1°C/s 的降温速度降至 25°C，继续孵育 30 分钟。退火反应体系见表 1。

表 1 Y 型核酸双链体退火反应体系

试剂	体积
----	----

100 μ M SEQ.1	10 μ L
100 μ M SEQ.2	10 μ L
TE 缓冲液 (pH=8)	80 μ L
总体积	100 μL

3) 多聚核苷酸 SEQ.1 作为 A 链, 与作为 B 链的 SEQ.2 退火。多聚核苷酸和退火产物进行 15%TBE 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 200V 电泳 1h。电泳结果如图 5 所示, 泳道 1 为 SEQ.1+ SEQ.2 (Y-0LNA) 退火产物, 箭头标示 Y 型核酸双链体, 泳道 5 为 SEQ.1, 泳道 9 为 SEQ.2, 泳道 10 为 DNA 分子量标准 (Thermo Scientific, SM1313)。上述结果表明: SEQ.1 与 SEQ.2 能够形成符合预期的 Y 型核酸双链体。

2、筛选具有链置换活性的耐盐聚合酶。

1) 如图 4 中的 (a) 所示, 将 SEQ.1 与 SEQ.2 (A 链+B 链) 的退火产物 Y-0LNA, 5' 末端带有 CY3 荧光修饰 SEQ.3 (C 链), 具有链置换活性的聚合酶, 含有高浓度盐离子的反应缓冲液混合, 30°C 条件下孵育 1 小时。测试的具有链置换活性的聚合酶分别为: BST+ (ArcticZymes Technologies, 71502-201); SD+ (ArcticZymes Technologies, 71501-201); Klenow Fragment (NEB, M0212S); Bsu Large Fragment (NEB, M0330S); phi29 (NEB, M0269S)。反应缓冲液分别为: 反应缓冲液 1 (终浓度: 0.15 M KCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM dNTP, pH=7.90); 反应缓冲液 2 (终浓度: 0.30 M KCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM dNTP, pH=8.10)。聚合酶反应体系见表 2。

表 2 聚合酶反应体系

试剂	体积
10 μ M Y-0LNA	1 μ L
10 μ M SEQ.3	1 μ L
聚合酶	0.2 μ L
2 \times 反应缓冲液	5 μ L
H ₂ O	2.8 μ L
总体积	10 μL

2) 取 10 μ L 反应产物与 10 μ L 2 \times 上样缓冲液 (Invitrogen, AM8546G) 混匀, 95°C 处理 10 分钟。样品进行 20% TBU 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 200V 电泳 1h, 电泳结束后检测 CY3 荧光。电泳结果如图 6 所示, 泳道 1 为 5' 末端带有 CY3 荧光修饰 SEQ.3, 作为阴性对照 (NC); 泳道 2-3 为聚合酶 BST+、泳道 4-5 为聚合酶 SD+、泳道 6-7 为聚合酶 Klenow Fragment、泳道 8-9 为聚合酶 Bsu Large Fragment、泳道 10-11 为聚合酶 phi29, 在 0.15 M KCl 和 0.30 M KCl 条件下的链置换聚合反应产物。C 链延伸到 48 nt 用 C-48 nt 标示电泳位置, C 链未延伸用 C 标示电泳位置。

3) 图 6 所示结果表明: 聚合酶 BST+、聚合酶 SD+、聚合酶 Klenow Fragment、聚合酶 Bsu Large Fragment 在 0.15 M KCl 和 0.30 M KCl 的高盐条件下均有链置换聚合活性; 聚合酶 phi29 在 0.15 M KCl 的高盐条件下有链置换聚合活性, 而在 0.30 M KCl 的高盐条件下几乎没有链置换聚合活性。

5 实施例二: 检测非模板链中修饰核苷酸 LNA 抑制聚合酶链置换聚合活性。

在图 4 中的 (b) 示出了实施例 2 的实验示意图。多聚核苷酸 SEQ.4、SEQ.5、SEQ.6 分别含有 2 个 LNA、4 个 LNA、8 个 LNA (加粗黑色线段表示), 作为 A 链, 分别和 SEQ.2 (B 链) 退火为 Y 型核酸双链体结构, 分别命名为 Y-2LNA、Y-4LNA、Y-8LNA; SEQ.3 (C 链) 长度为 15 nt, 5' 末端带有 CY3 荧光修饰 (星形符号表示), 且与 SEQ.2 (B 链) 的 3' 末端互补配对; 具有链置换活性的聚合酶 (椭圆符号表示) 结合核酸复合物。在反应缓冲液中, 聚合酶以 B 链为模板、延伸 C 链; 如果聚合酶没有活性, 则 C 链不能延伸, 仍为 15 nt; 如果 SEQ.4、或 SEQ.5、或 SEQ.6 中含有的 2 个 LNA、或 4 个 LNA、或 8 个 LNA 能够抑制聚合酶的链置换聚合活性, 则 A 链不能被置换, 只能延伸 C 链到 21nt; 如果 SEQ.4、或 SEQ.5、或 SEQ.6 中含有的 2 个 LNA、或 4 个 LNA、或 8 个 LNA 不能抑制聚合酶的链置换聚合活性, 则 A 链可以被完全置换, 延伸 C 链到 48 nt; 通过电泳检测 C 链长度。

10 1、Y 型核酸双链体退火。

1) 按照生产商说明将 SEQ.1、SEQ.2、SEQ.3、SEQ.4、SEQ.5、SEQ.6 分别用 TE 缓冲液 (pH=8) 溶解成终浓度 100 μ M 的母液。

2) 将 SEQ.1、SEQ.4、SEQ.5、SEQ.6 均单独与 SEQ.2 退火为 Y 型核酸双链体, 退火产物分别命名为 Y-0LNA、Y-2LNA、Y-4LNA、Y-8LNA; Y-0LNA 作为不含 LNA 的对照组。退火流程为 95 $^{\circ}$ C 孵育 5 分钟, 0.1 $^{\circ}$ C/s 的降温速度降至 25 $^{\circ}$ C, 继续孵育 30 分钟。退火反应体系见表 3。

表 3 Y 型核酸双链体退火反应体系

试剂	体积
100 μ M SEQ.1/SEQ.4/SEQ.5/SEQ.6	10 μ L
100 μ M SEQ.2	10 μ L
TE 缓冲液 (pH=8)	80 μ L
总体积	100 μ L

3) 多聚核苷酸和退火产物进行 15% TBE 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 200V 电泳 1h。电泳结果如图 5 所示, 泳道 1-4 分别为 SEQ.1+ SEQ.2 (Y-0LNA)、SEQ.4+ SEQ.2 (Y-2LNA)、SEQ.5+ SEQ.2 (Y-4LNA)、SEQ.6+ SEQ.2 (Y-8LNA) 的退火产物, 箭头标示 Y 型核酸双链体, 泳道 5-9 分别为 SEQ.1、SEQ.4、SEQ.5、SEQ.6、SEQ.2, 泳道 10 为 DNA 分子量标准 (Thermo Scientific, SM1313)。上述结果表明: SEQ.1 与 SEQ.2、

SEQ.4 与 SEQ.2、SEQ.5 与 SEQ.2、SEQ.6 与 SEQ.2 均能形成符合预期的 Y 型核酸双链体。

2、检测非模板链中修饰核苷酸 LNA 抑制聚合酶链置换聚合活性。

1) 如图 4 中的 (b) 所示, 把 SEQ.1 与 SEQ.2 (A 链+B 链) 的退火产物 Y-0LNA (作为不含 LNA 的对照组)、或 SEQ.4 与 SEQ.2 (A 链+B 链) 的退火产物 Y-2LNA、或 SEQ.5 与 SEQ.2 (A 链+B 链) 的退火产物 Y-4LNA、或 SEQ.6 与 SEQ.2 (A 链+B 链) 的退火产物 Y-8LNA, 5' 末端带有 CY3 荧光修饰 SEQ.3 (C 链), 具有链置换活性的聚合酶, 含有高浓度盐离子的反应缓冲液混合, 30°C 条件下孵育 1 小时。测试的具有链置换活性的聚合酶分别为: BST+ (ArcticZymes Technologies, 71502-201); Klenow Fragment (NEB, M0212S); Bsu Large Fragment (NEB, M0330S)。反应缓冲液分别为: 反应缓冲液 2 (终浓度: 0.30 M KCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM dNTP, pH=8.10)。聚合酶反应体系见表 4。

表 4 聚合酶反应体系

试剂	体积
10 μM Y-0LNA/ Y-2LNA/ Y-4LNA/ Y-8LNA	1 μL
10 μM SEQ.3	1 μL
聚合酶	0.2 μL
2×反应缓冲液	5 μL
H ₂ O	2.8 μL
总体积	10 μL

15

2) 取 10 μL 反应产物与 10 μL 2×上样缓冲液 (Invitrogen, AM8546G) 混匀, 95°C 处理 10 分钟。样品进行 20% TBU 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 200V 电泳 1h, 电泳结束后检测 CY3 荧光。电泳结果如图 7 所示, 泳道 1-4 为聚合酶 BST+, 泳道 6-9 为聚合酶 Bsu Large Fragment、泳道 11-14 为聚合酶 Klenow Fragment, 在 0.30 M KCl 条件下的链置换聚合反应产物; 泳道 5、10、15 为 5' 末端带有 CY3 荧光修饰 SEQ.3, 作为阴性对照 (NC)。C 链延伸到 48 nt 用 C-48 nt 标示电泳位置, C 链延伸到 21 nt 用 C-21 nt 标示电泳位置, C 链未延伸用 C 标示电泳位置。

图 7 所示结果表明: 在 0.30 M KCl 的高盐条件下, 非模板链中 4 个或 8 个 LNA 能够很好地抑制聚合酶 BST+、聚合酶 Klenow Fragment、聚合酶 Bsu Large Fragment 的链置换聚合活性; 非模板链中 2 个 LNA 能够部分抑制聚合酶 BST+、聚合酶 Klenow Fragment、聚合酶 Bsu Large Fragment 的链置换聚合活性。

实施例三: 构建测序文库。

图 8 示出了实施例 3 测序文库构建示意图。(a) 测序接头示意图。顶链 (SEQ.7、SEQ.8、SEQ.9) 由 A、B、C 三部分组成, A 为引导序列, 由

30

30 个 iSpC3 组成（在图中以黑色虚线表示）；B 为能够抑制聚合酶链置换聚合活性的区段（抑制区段），分别为 2 个、4 个、8 个 LNA 修饰核酸（在图中以加粗黑色线段表示）；C 为与底链互补配对的 DNA，且 3' 端有突出的 T。底链（SEQ.10）的 5' 端有磷酸基团修饰，由 D、E 两部分组成，D 为与顶链 B 和 C 互补配对的序列，E 为与引物（SEQ.11）互补配对的序列。图 12 示出了其中 iSp18 的具体结构。顶链和底链按照 1:1 的比例退火为 Y 型双链测序接头。各接头标记如下：SEQ.7 与 SEQ.10 退火接头标记为 Adaptor-2LNA，SEQ.8 与 SEQ.10 退火接头标记为 Adaptor-4LNA，SEQ.9 与 SEQ.10 退火接头标记为 Adaptor-8LNA。（b）测序文库示意图。待测靶多核苷酸（pUC57 质粒酶切线性化双链 DNA）经过末端修复和加 A 后与 Y 型双链测序接头连接，经过磁珠纯化后得到待测序文库。

1、Y 型双链测序接头退火。

1) 按照生产商说明将 SEQ.7、SEQ.8、SEQ.9、SEQ.10 分别用 TE 缓冲液（pH=8）溶解成终浓度 100 μ M 的母液。

2) 如图 8 所示，将 SEQ.7、SEQ.8、SEQ.9 均单独与 SEQ.10 退火为 Y 型双链测序接头，获得的退火产物分别命名为 Adaptor-2LNA、Adaptor-4LNA、Adaptor-8LNA。退火流程为 95 $^{\circ}$ C 孵育 5 分钟，0.1 $^{\circ}$ C/s 的降温速度降至 25 $^{\circ}$ C，继续孵育 30 分钟。退火反应体系见表 5。

表 5 Y 型双链测序接头退火反应体系

试剂	体积
100 μ M SEQ.7/SEQ.8/SEQ.9	10 μ L
100 μ M SEQ.10	10 μ L
TE 缓冲液（pH=8）	80 μ L
总体积	100 μL

2、Y 型双链测序接头和待测 DNA 连接为测序文库。

1) 按照生产商说明用限制性内切酶 EcoR I-HF（NEB, R3101）和 Hind III-HF（NEB, R3104）将 pUC57 质粒（SEQ.12）进行酶切，反应条件为 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 分钟。酶切反应体系见表 6。

表 6 酶切反应体系

试剂	质量/体积
pUC57 质粒	5 μ g
rCutSmart TM Buffer	5 μ L
EcoR I-HF	1 μ L
Hind III-HF	1 μ L
H ₂ O	补至 50 μ L
总体积	50 μL

2) 按照生产商说明用 AMPure XP beads（Beckman Coulter, A63882）进行酶切产物的纯化，并使用 Qubit dsDNA HS 试剂盒（ThermoFisher，

Q32854) 测定产物浓度。

3) 按照生产商说明用 NEBNext FFPE DNA Repair Mix (NEB, M6630) 和 NEBNext Ultra II End repair / dA-tailing Module (NEB, E7546) 对酶切纯化产物进行末端修复和加 A。反应条件为 20°C 孵育 5 分钟, 65°C 孵育 5 分钟。末端修复和加 A 反应体系见表 7。

表 7 末端修复和加 A 反应体系

试剂	质量/体积
酶切纯化产物	1 μ g
NEBNext FFPE DNA Repair Buffer	3.5 μ L
NEBNext FFPE DNA Repair Mix	2 μ L
Ultra II End-prep reaction buffer	3.5 μ L
Ultra II End-prep enzyme mix	3 μ L
H ₂ O	补至 60 μ L
总体积	60 μL

4) 按照生产商说明用 AMPure XP beads (Beckman Coulter, A63882) 对末端修复和加 A 产物进行纯化, 并使用 Qubit dsDNA HS 试剂盒 (Thermofisher, Q32854) 测定产物浓度。

5) 按照生产商说明用 NEBNext Quick Ligation Module (NEB, E6056) 对纯化产物进行接头连接反应, 反应条件为 25°C 孵育 10 分钟。连接反应体系见表 8。

表 8 连接反应体系

试剂	体积
末端修复和加 A 纯化产物	60 μ L
10 μ M Adaptor-2LNA/ Adaptor-4LNA/ Adaptor-8LNA	3 μ L
NEBNext Quick Ligation Reaction Buffer	25 μ L
Quick T4 DNA Ligase	10 μ L
H ₂ O	补至 100 μ L
总体积	100 μL

6) 按照生产商说明用 AMPure XP beads (Beckman Coulter, A63882) 对连接接头后的产物进行纯化, 并使用 Qubit dsDNA HS 试剂盒 (Thermofisher, Q32854) 测定产物浓度。得到如图 8 所示的测序文库。

7) 测序文库进行 6% TBE 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 200V 电泳 2h。电泳结果如图 9 所示, 泳道 1 为连接前的待测靶多核苷酸, 即 pUC57 质粒酶切线性化双链 DNA, 泳道 2-4 分别为含 2 个、4 个、8 个 LNA 修饰核酸的测序接头与待测靶多核苷酸连接并纯化后的产物, 标记为 pUC57+Adaptor-2LNA、pUC57+Adaptor-4LNA、pUC57+Adaptor-8LNA。连接好的测序文库用“pUC57+Adaptor”标示电泳位置, 未进行接头连接

的测靶多核苷酸用“pUC57”标示电泳位置。图 9 所示结果表明：3 组测序文库 pUC57+Adaptor-2LNA、pUC57+Adaptor-4LNA、pUC57+Adaptor-8LNA 均构建成功。

实施例四：进行纳米孔测序。

5 1) 把测序文库 pUC57+Adaptor-4LNA 与引物 (SEQ.11)、具有链置换活性的聚合酶 BST+和反应缓冲液, 30°C 条件下孵育 1 小时, 形成如图 10 所示的测序复合物。在图 10 中, 标记为 A 的测序文库与标记为 B 的引物互补配对, 其中引物的 5' 末端有一个胆固醇修饰 (标记为 C), 同时与具有链置换活性的聚合酶 (标记为 D) 孵育结合, 形成测序复合物。反
10 应缓冲液终浓度为 37.5 mM KCl, 12.5 mM Tris-HCl, 2.5 mM MgCl₂, pH=8.10。测序复合物孵育体系见表 9。

表 9 测序复合物孵育反应体系

试剂	体积
100 ng/μL 测序文库	5 μL
1 μM 引物	5 μL
BST+	5 μL
反应缓冲液	5 μL
总体积	20 μL

2) 按照文献 (Ji Z, Guo P. Channel from bacterial virus T7 DNA packaging motor for the differentiation of peptides composed of a mixture of acidic and basic amino acids. Biomaterials. 2019 May 21;214:119222) 所披露的方法搭建基于膜片钳和信号放大器的单通道纳米孔检测系统, 完成单个孔蛋白嵌孔, 把孵育后的测序复合物加入到该单通道体系中, 100 mV 条件下观测并获得电流信号的变化, 测序缓冲液为 0.30 M KCl, 50 mM Tris-HCl, 10
20 mM MgCl₂, 0.5 mM dNTP, pH=8.10, 标记为第一组。

测序结果如图 11 所示, pUC57+Adaptor-4LNA 测序文库有测序信号被捕获, 获得清晰的测序信号电流振幅变化图。在图 11 中, (a) 为纳米孔捕获到测序文库后电流信号变化图。(b) 为 (a) 中方框内信号的放大图。

3) 除使用的测序缓冲液不同外, 完全相同的实验操作步骤进行第二组测试。第二组使用的测序缓冲液为 0.30 M KCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM
25 MgCl₂, pH=8.10, 不含有 dNTP, 则没有捕获到测序信号。测序缓冲液与测序结果见表 10。

表 10 测序缓冲液与测序结果

组别	测序缓冲液	测序结果
第一组	0.30 M KCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 0.5 mM dNTP (pH=8.10)	获得清晰的测序信号电流振幅变化图
第二组	0.30 M KCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , (pH=8.10)	没有捕获到测序信号

表 10 所示结果表明：在测序缓冲液中存在 dNTP 的条件下，可以使用具有链置换活性的聚合酶 BST+和 pUC57+Adaptor-4LNA 测序文库进行测序。证明了本发明的测序方案是可行的。

5 序列表

SEQ.1:

5' XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXGGTTGTTTCTGTTGGTGCTGATATTGC 3'
(X=iSpC3)

10 SEQ.2:

5' GCAATATCAGCACCAACAGAAACAACCTCGGGTCGTAAGAATTCTATT 3'

SEQ.3:

5' CY3-AATAGAATTCTTACG 3'

15

SEQ.4:

5' XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX(LNA_G)(LNA_G)TTGTTTCTGTTGGTGCT
GATATTGC 3' (X=iSpC3)

20 SEQ.5:

5' XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX(LNA_G)(LNA_G)(LNA_T)(LNA_T)GTTTCT
GTTGGTGCTGATATTGC 3' (X=iSpC3)

SEQ.6:

25 5' XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX(LNA_G)(LNA_G)(LNA_T)(LNA_T)(LNA_G)
(LNA_T)(LNA_T)(LNA_T)CTGTTGGTGCTGATATTGC 3' (X=iSpC3)

SEQ.7:

30 5' XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX(LNA_G)(LNA_G)TTGTTTCTGTTGGTGCT
GATATTGCT 3' (X=iSpC3)

SEQ.8:

35 5' XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX(LNA_G)(LNA_G)(LNA_T)(LNA_T)GTTTCT
GTTGGTGCTGATATTGCT 3' (X=iSpC3)

SEQ.9:

5' XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX(LNA_G)(LNA_G)(LNA_T)(LNA_T)(LNA_G)
(LNA_T)(LNA_T)(LNA_T)CTGTTGGTGCTGATATTGCT 3' (X=iSpC3)

40 SEQ.10:

5' Phosphorylation-GCAATATCAGCACCAACAGAAACAACCTTTGAGGCGAGCGGTCAA 3'

SEQ.11:

5' Cholesterol-YTTGACCGCTCGC 3' (Y=iSp18)

SEQ.12:

5' TCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCA
 CAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGT
 5 TGGCGGGTGTCCGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTAAGTGTGAGAGTGCACC
 ATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCCATTC
 GCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCC
 AGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCCA
 GTCACGACGTTGTAACGACGGCCAGTGAATTCGAGCTCGGTACCTCGCGAATGCATCTAG
 10 ATATCGGATCCCGGGCCCGTCGACTGCAGAGGCCTGCATGCAAGCTTGGCGTAATCATGGTC
 ATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCCGGAA
 GCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGC
 TCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACG
 CGCGGGGAGAGGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCG
 15 CTCGGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCA
 CAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGA
 ACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAC
 AAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGT
 TCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGTTACCGGATACCTGT
 20 CCGCCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTT
 CGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGC
 TGCGCCATTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTG
 GCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCT
 TGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTG
 25 AAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGG
 TAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAG
 ATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACACGTTAAGGGATTT
 TGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTA
 AATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAG
 30 GCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAG
 ATA ACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCC
 ACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGA
 AGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTA
 AGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCA
 35 CGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGA
 TCCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAA
 GTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCC
 ATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTAT
 GCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAA
 40 CTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCG
 CTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACCTGATCTTCAGCATCTTTACT
 TTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAA
 GGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATC
 AGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGG

GTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGAC
ATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTC 3'

5 尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例，可以理解的是，上述实施例是示例性的，不能理解为对本发明的限制，本领域的普通技术人员在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。

权利要求书

1、一种纳米孔测序方法，所述方法包括：

1) 提供测序文库，所述测序文库包括靶多核苷酸双链，所述靶多核苷酸双链包括第一链和第二链，所述第一链的5'端与所述第二链的3'端包括非配对的第一单链区，在所述第一链的第一单链区5'端含有引导序列，在所述第二链的第一单链区3'端含有第二引物配对区；

2) 将第一引物与所述测序文库进行孵育以形成测序复合物，其中，所述第一引物与所述第二引物配对区通过碱基互补配对原则进行结合，所述第一引物具有3'自由端，且所述复合物通过所述第一引物的5'端附着在嵌有纳米孔的膜上；

3) 使具有链置换活性的聚合酶以第二链为模板、延伸所述第一引物，在电场力作用下，所述引导序列被膜上的纳米孔捕获且穿过纳米孔，随着延伸进行，所述第一链被置换出，并穿过纳米孔；

4) 检测延伸过程中所述第一链穿过纳米孔时产生的电信号变化，确定所述靶多核苷酸双链的第一链的序列信息。

2、根据权利要求1所述的方法，在1)中，所述第一链的3'端与所述第二链的5'端序列完全互补配对形成配对区。

3、根据权利要求1所述的方法，在1)中，所述靶多核苷酸双链进一步包括：所述第一链的3'端与所述第二链的5'端包括非配对的第二单链区，在所述第一链的第二单链区3'端包括第一引物配对区。

4、根据权利要求3所述的方法，所述方法进一步包括：

在2)中，将第一引物、第二引物与所述测序文库进行孵育以形成测序复合物，其中，所述第一引物与所述第二引物配对区通过碱基互补配对原则进行结合，所述第二引物与所述第一引物配对区通过碱基互补配对原则进行结合，且所述复合物通过所述第一引物和/或所述第二引物的5'端固定在嵌有纳米孔的膜上。

5、根据权利要求4所述的方法，所述方法进一步包括：

5) 聚合酶以所述第一链为模板延伸所述第二引物，使得所述第一链以逆电场方向退出膜上的纳米孔，检测所述第一链退出纳米孔时产生的电信号变化，再次确定所述靶多核苷酸双链的第一链的序列信息。

6、根据权利要求4或5所述的方法，所述第二链的5'端含有引导序列。

7、根据权利要求1所述的方法，在1)中，所述靶多核苷酸双链进一步包括：所述第一链的3'末端和所述第二链的5'末端相连接，使得所述靶多核苷酸双链在该末端具有发夹结构。

8、根据权利要求7所述的方法，所述方法进一步包括：

5) 延伸至所述发卡结构后，聚合酶以所述第一链为模板继续进行延伸，使得所述第一链以逆电场方向退出膜上的纳米孔，检测所述第一链退

出纳米孔时产生的电信号变化，再次确定所述靶多核苷酸双链的第一链的序列信息。

9、根据权利要求 1-8 任一项所述的方法，通过在多核苷酸双链上连接 Y 型接头制备靶多核苷酸双链，所述 Y 型接头两条链上分别包括引导序列和引物配对区，在与多核苷酸双链连接后使得获得的靶多核苷酸第一链的 5' 端含有引导序列，第二链的 3' 端包括第二引物配对区。

10、根据权利要求 1-8 任一项所述的方法，所述引物的长度小于 80、70、60 或 50 个核苷酸。

11、根据权利要求 1-8 任一项所述的方法，所述引物的 5' 端连接有疏水性分子。

12、根据权利要求 11 所述的方法，所述疏水性分子选自以下任意一种或多种：脂质、脂肪酸、甾醇、碳纳米管、多肽、蛋白质和/或氨基酸。

13、根据权利要求 1-8 任一项所述的方法，所述引导序列包含多核苷酸或多个 iSpC3。

14、根据权利要求 1-8 任一项所述的方法，所述引导序列长度是 10-50 个核苷酸或 iSpC3。

15、根据权利要求 1-8 任一项所述的方法，所述引导序列的 3' 端连接有抑制聚合酶链置换聚合活性的抑制区段。

16、根据权利要求 15 所述的方法，所述抑制区段为 GC 富含基序或人工修饰核苷酸。

17、根据权利要求 16 所述的方法，所述人工修饰核苷酸是 LNA、PNA、BNA 或其任意组合。

18、根据权利要求 17 所述的方法，所述人工修饰核苷酸是 LNA，其个数为 2-10 个，优选 4-8 个。

19、根据权利要求 1-8 任一项所述的方法，所述具有链置换活性的聚合酶为 DNA 聚合酶或 RNA 聚合酶。

20、根据权利要求 19 所述的方法，所述具有链置换活性的聚合酶为耐盐的 DNA 聚合酶或 RNA 聚合酶。

21、根据权利要求 19 或 20 所述的方法，所述具有链置换活性的聚合酶为：Bst DNA 聚合酶、SD DNA 聚合酶、phi29 DNA 聚合酶、Bsu Large Fragment DNA 聚合酶、Klenow Fragment DNA 聚合酶、T3 RNA 聚合酶、T7 RNA 聚合酶、SP6 RNA 聚合酶、E. coli RNA 聚合酶或其任意组合。

22、根据权利要求 19 或 20 所述的方法，所述聚合酶为无链置换活性聚合酶经过改造后具有链置换活性的聚合酶。

23、根据权利要求 22 所述的方法，所述聚合酶为经过改造后具有链置换活性的 T4 DNA 聚合酶、T7 DNA 聚合酶、DNA 聚合酶 I 或其任意组合。

24、根据权利要求 1-8 任一项所述的方法，所述纳米孔是跨膜蛋白孔

或固态孔。

25、根据权利要求 24 所述的方法,所述跨膜蛋白孔选自溶血素、MspA、MspB、MspC、MspD、FraC、ClyA、PA63、CsgG、CsgD、XcpQ、SP1、phi29 连接器蛋白、InvG、GspD 或其任意组合。

5 26、根据权利要求 1-8 任一项所述的方法,所述纳米孔还连接有另外的多肽,所述另外的多肽选自标签、酶切位点、信号肽或导肽、可检测的标记或其任意组合。

27、根据权利要求 1-8 任一项所述的方法,所述膜是两亲性膜、高分子聚合物膜或其任意组合。

10 28、根据权利要求 27 所述的方法,所述膜是磷脂双分子层、两嵌段共聚物或三嵌段共聚物。

29、根据权利要求 1-8 任一项所述的方法,所述方法在如下的缓冲液或测序缓冲液中进行:磷酸二氢根-磷酸氢根缓冲体系、碳酸-碳酸氢钠缓冲体系、Tris-HCl 缓冲体系、HEPES 缓冲体系、MOPS 缓冲体系或其任意组合。

15 30、根据权利要求 29 所述的方法,所述反应缓冲液或测序缓冲液含有增强聚合酶延伸反应的添加剂或辅助试剂。

31、根据权利要求 30 所述的方法,所述添加剂或辅助试剂选自二甲基亚砜、甘油、甲酰胺、牛血清白蛋白、硫酸铵、聚乙二醇、明胶、非离子型去污剂、N,N,N-三甲基甘氨酸、单链核酸结合蛋白或其任意组合。

32、一种试剂盒,所述试剂盒包括:

用于与核苷酸双链连接的 Y 型接头,所述 Y 型接头两条链上分别包括引导序列和引物配对区,在与核苷酸双链连接后使得获得的靶多核苷酸第一链的 5'端含有引导序列,第二链的 3'端包括引物配对区;

25 纳米孔;

膜;

引物,所述引物与所述引物配对区互补,所述引物的 5'端具有固定部件,用于附着在膜上;

具有链置换活性的聚合酶;

30 进行聚合反应的缓冲体系。

33、根据权利要求 32 所述的试剂盒,所述纳米孔嵌入所述膜中。

34、根据权利要求 32 或 33 所述的试剂盒,所述引导序列的 3'端连接有抑制聚合酶链置换聚合活性的抑制区段,且所述抑制区段为 GC 富含基序或人工修饰核苷酸。

35 35、根据权利要求 34 的试剂盒,所述人工修饰核苷酸是 LNA、PNA、BNA 或其任意组合;优选为 2-10 个 LNA,更优选为 4-8 个 LNA。

36、根据权利要求 32 或 33 所述的试剂盒,所述引物的长度小于 80、70、60 或 50 个核苷酸,且所述引物的 5'端连接有疏水性分子,所述疏水

性分子选自以下任意一种或多种：脂质、脂肪酸、甾醇、碳纳米管、多肽、蛋白质和/或氨基酸。

37、根据权利要求 32 或 33 所述的试剂盒，所述引导序列包含多核苷酸或多个 iSpC3，且长度是 10-50 个核苷酸或 iSpC3。

5 38、根据权利要求 32 或 33 所述的试剂盒，所述聚合酶为 Bst DNA 聚合酶、SD DNA 聚合酶、phi29 DNA 聚合酶、Bsu Large Fragment DNA 聚合酶、Klenow Fragment DNA 聚合酶、T3 RNA 聚合酶、T7 RNA 聚合酶、SP6 RNA 聚合酶、E. coli RNA 聚合酶或其任意组合，或所述聚合酶为经改造后具有链置换活性的 T4 DNA 聚合酶、T7 DNA 聚合酶、DNA 聚合酶 I
10 或其任意组合。

39、根据权利要求 32 或 33 所述的试剂盒，所述纳米孔是跨膜蛋白孔或固态孔。

40、根据权利要求 39 所述的试剂盒，所述跨膜蛋白孔选自溶血素、MspA、MspB、MspC、MspD、FraC、ClyA、PA63、CsgG、CsgD、XcpQ、
15 SP1、phi29 连接器蛋白、InvG、GspD 或其任意组合。

41、根据权利要求 32 或 33 所述的试剂盒，所述膜是两亲性膜、高分子聚合物膜或其任意组合。

42、根据权利要求 41 所述的试剂盒，所述膜是磷脂双分子层、两嵌段共聚物或三嵌段共聚物。

20 43、根据权利要求 32 或 33 所述的试剂盒，所述进行聚合反应的缓冲体系是磷酸二氢根-磷酸氢根缓冲体系、碳酸-碳酸氢钠缓冲体系、Tris-HCl 缓冲体系、HEPES 缓冲体系、MOPS 缓冲体系或其任意组合。

44、根据权利要求 32 或 33 所述的试剂盒，所述进行聚合反应的缓冲体系含有增强聚合酶延伸反应的添加剂或辅助试剂，且所述添加剂或
25 辅助试剂选自二甲基亚砜、甘油、甲酰胺、牛血清白蛋白、硫酸铵、聚乙二醇、明胶、非离子型去污剂、N,N,N-三甲基甘氨酸、单链核酸结合蛋白或其任意组合。

45、根据权利要求 32-44 任一项所述的试剂盒在高通量测序中的应用。

46、根据权利要求 45 所述的应用，所述高通量测序为纳米孔测序。

30

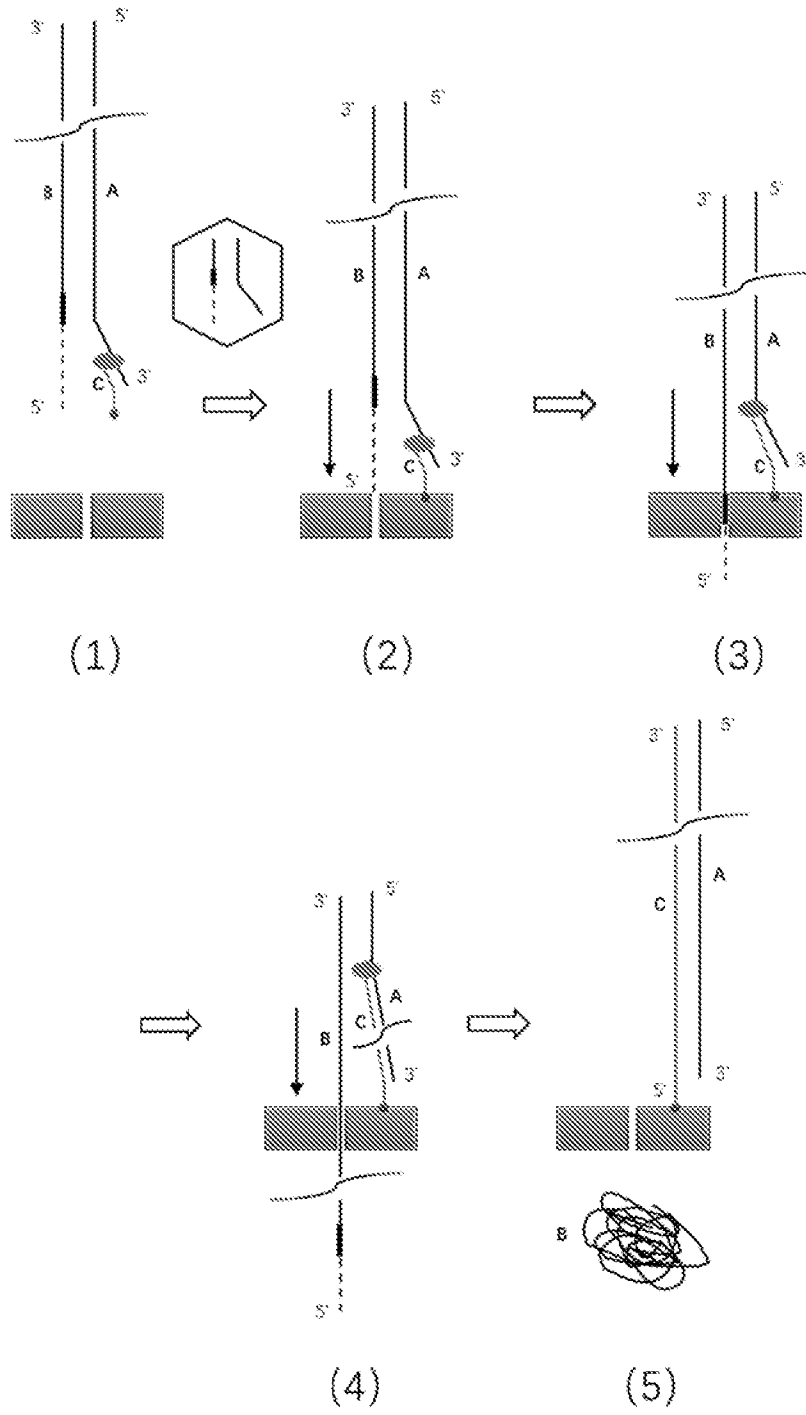


图 1

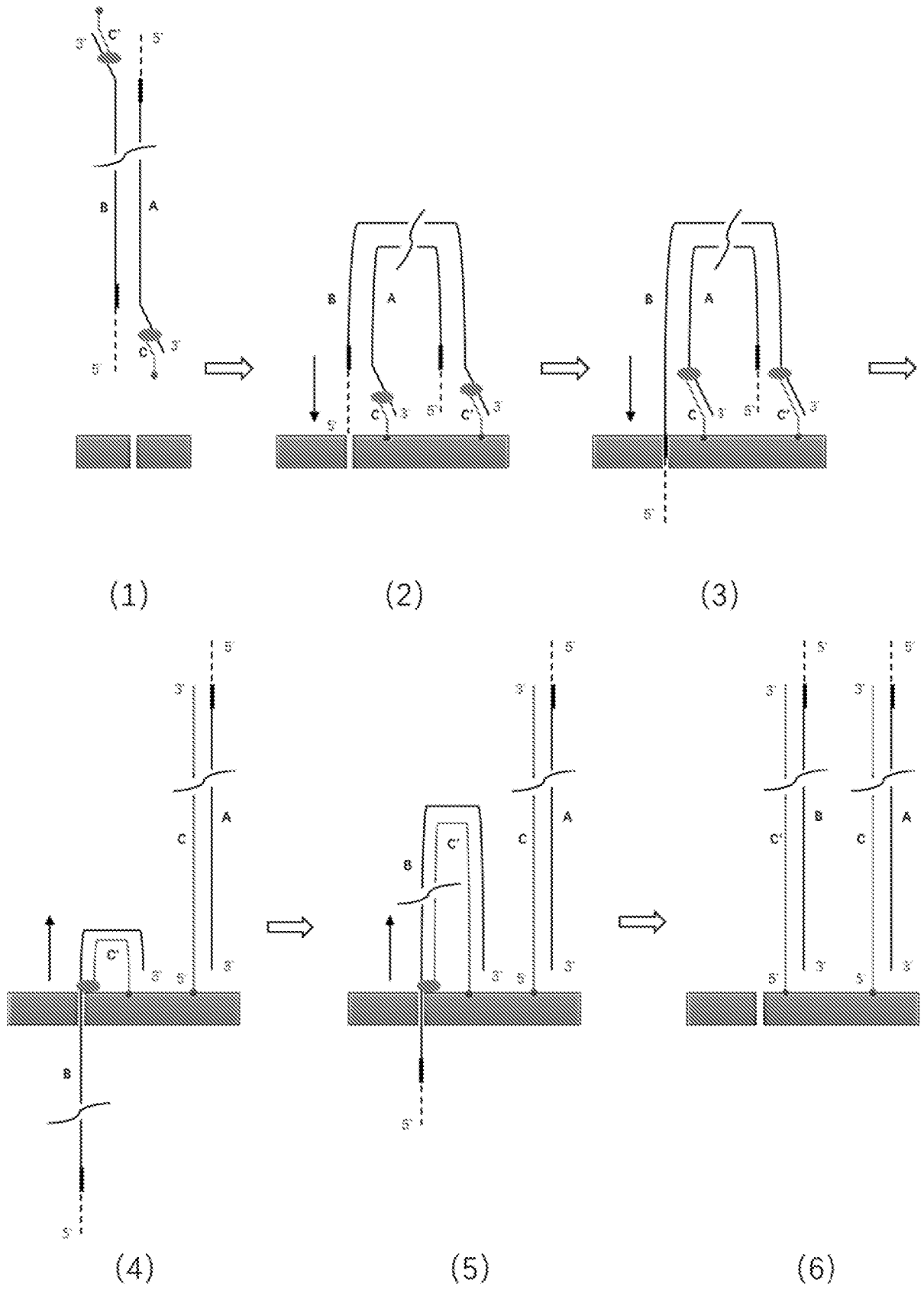


图 2

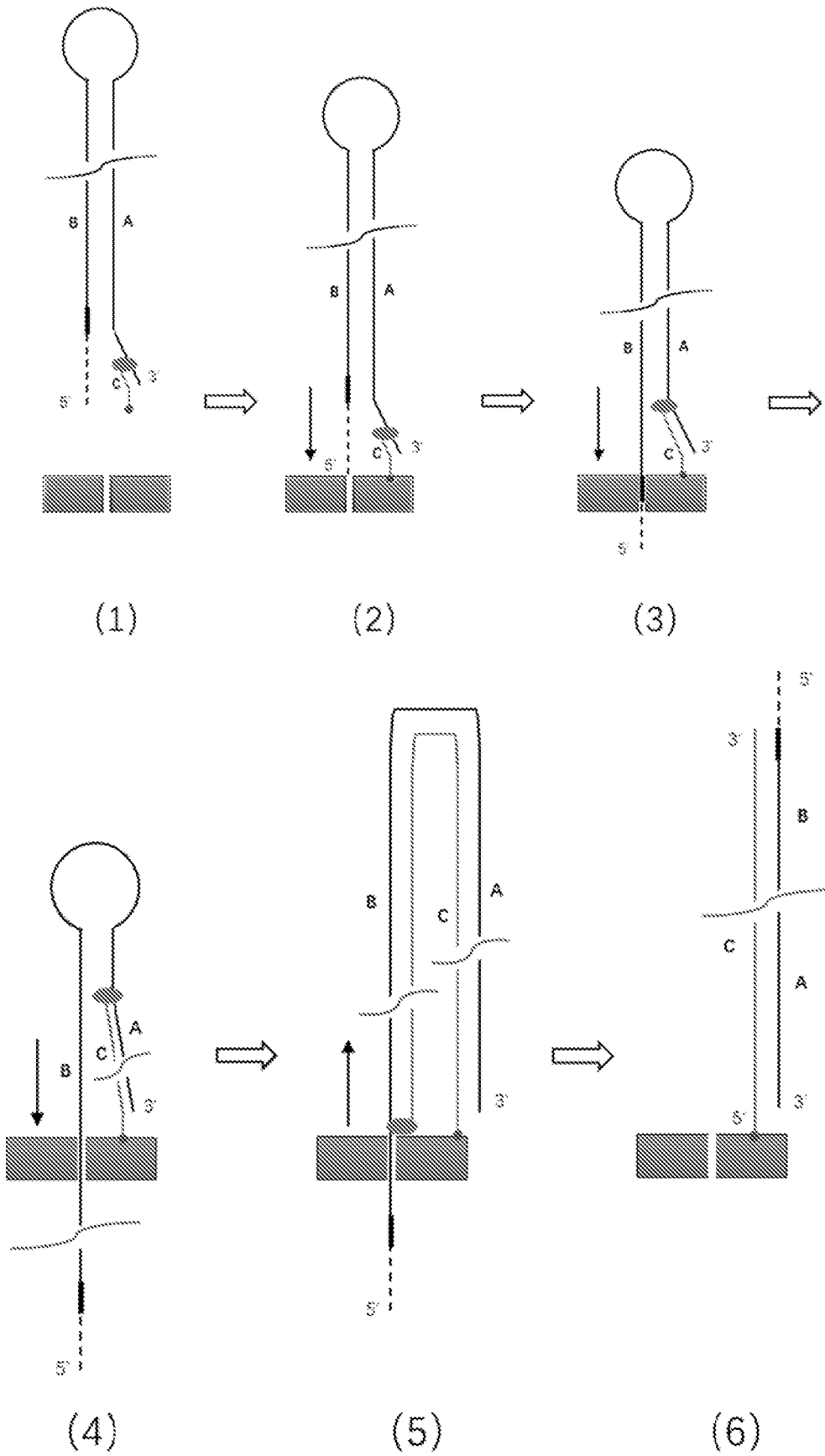


图 3

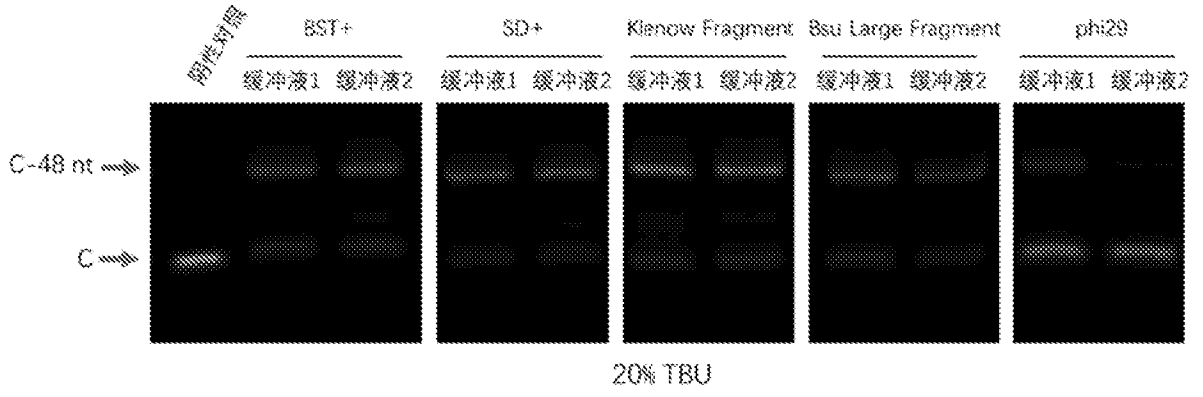


图 6

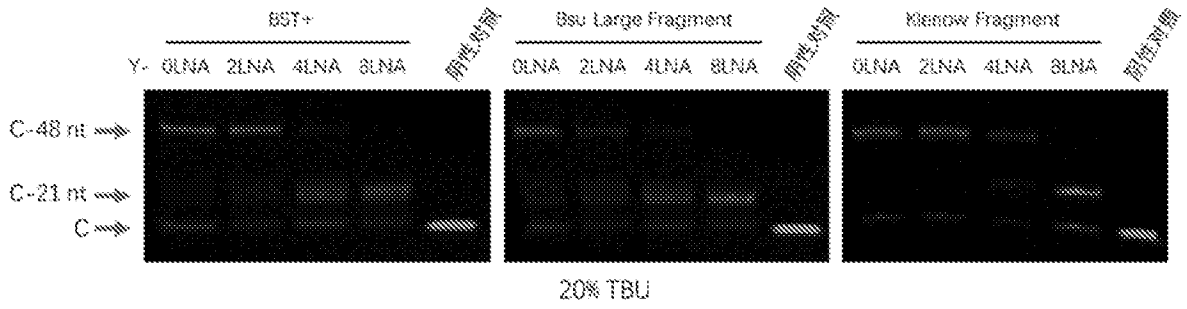


图 7

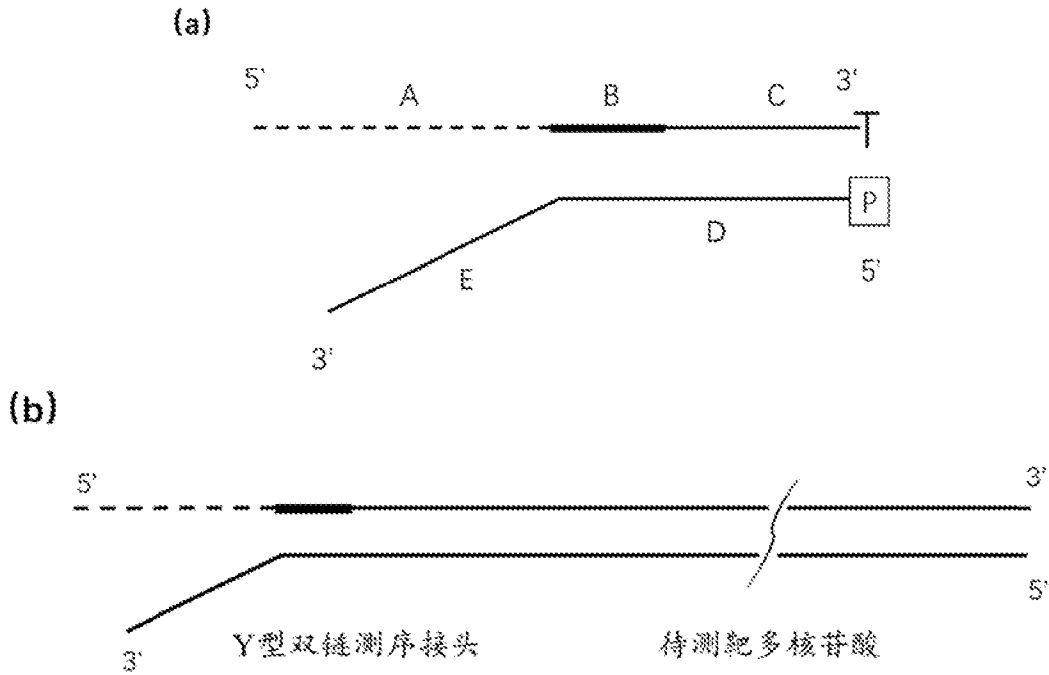


图 8

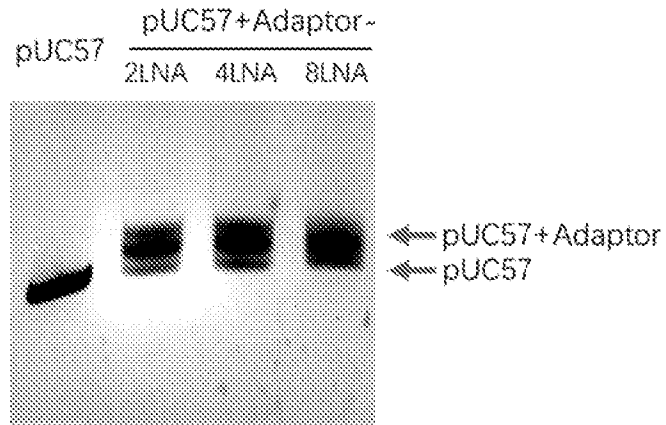


图 9

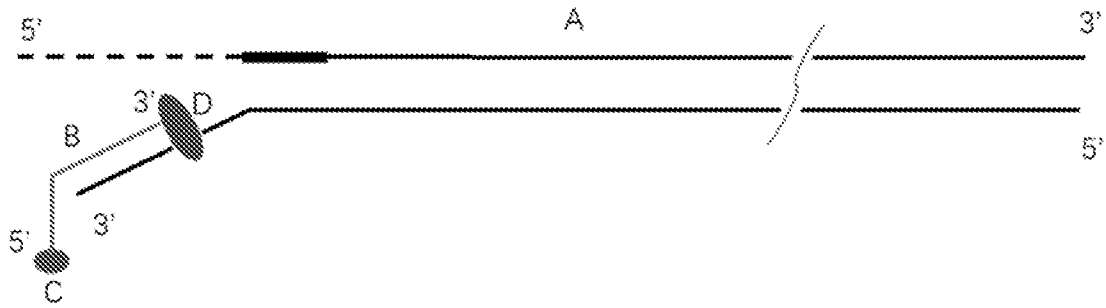


图 10

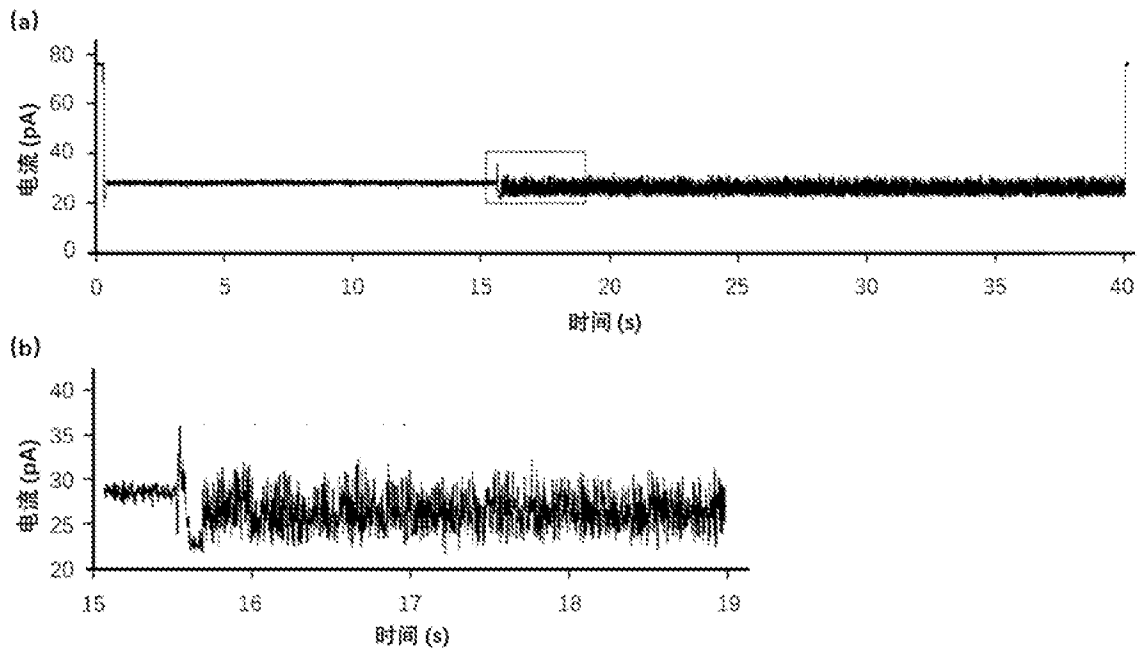


图 11

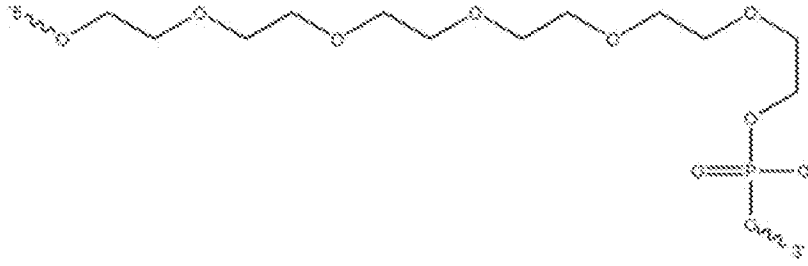


图 12

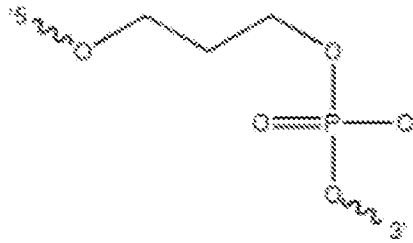


图 13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/139739

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q1/68(2018.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC: C12Q Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNTXT, ENTXT, ENTXTC, CNKI, 万方数据库, WANFANG DATABASE, ISI Web of Science, Baidu, Bing; Y衔接子, Y型, Y-shape, 纳米孔, 测序, 纳米测序, nanosequencing, 捕获, 单链区, single strand, 胆固醇, cholesterol, 接头, 连接子, adaptor, linker, 链置换, strand displacing polymerase, 锚, tether, 膜, membrane, 孔, pore, nanopore, 前导, 前导序列, 引导, leader, 延伸, enlogation, 抑制, 阻止, inhibit, prevent, 发夹, hairpin		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 103827320 A (OXFORD NANOPORE TECHNOLOGIES LTD.) 28 May 2014 (2014-05-28) description, paragraphs 123-132, embodiment 3, and figure 10	1-46
Y	CN 104039979 A (OXFORD NANOPORE TECHNOLOGIES LTD.) 10 September 2014 (2014-09-10) description, paragraph 18	1-46
Y	US 2021363577 A1 (OXFORD NANOPORE TECHNOLOGIES LTD.) 25 November 2021 (2021-11-25) description, paragraphs 8-18, 23, 46-47, and 88-90	2-6, 9-31
Y	CN 109266537 A (SHOUDU BIOTECH (SUZHOU) CO., LTD. et al.) 25 January 2019 (2019-01-25) description, paragraphs 7-13	1-46
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 01 September 2023		Date of mailing of the international search report 08 September 2023
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/139739

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2019352709 A1 (OXFORD NANOPORE TECHNOLOGIES LTD.) 21 November 2019 (2019-11-21) description, paragraphs 7-67, 72, and 101-106	2-6, 9-31
A	CN 108138227 A (ILLUMINA, INC.) 08 June 2018 (2018-06-08) description, paragraphs 8-29	1-46
A	WO 2022243692 A1 (OXFORD NANOPORE TECHNOLOGIES PLC) 24 November 2022 (2022-11-24) description, paragraphs 6-44 and 89-105	1-46
A	WANG, Yunhao et al. "Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications" <i>Nature Biotechnology</i> , Vol. 39, 08 November 2021 (2021-11-08), pages 1348-1365	1-46
A	张皓博 等 (ZHANG, Haobo et al.). "纳米孔测序技术在疾病检测中的研究进展 (Research Progress on Nanopore Sequencing Technology in Disease Detection)" <i>中国动物检疫 (China Animal Health Inspection)</i> , Vol. 38,, No. 6, 31 December 2021 (2021-12-31), pages 82-89	1-46

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/139739

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	103827320	A	28 May 2014	US	2016362739	A1	15 December 2016
				IN	DE N2014A		05 June 2015
				US	2020239950	A1	30 July 2020
				US	11261487	B2	01 March 2022
				US	2020024655	A1	23 January 2020
				US	11168363	B2	09 November 2021
				AU	2012288629	A1	06 March 2014
				AU	2012288629	B2	02 February 2017
				WO	2013014451	A1	31 January 2013
				US	2022127669	A1	28 April 2022
				CA	2843136	A1	31 January 2013
				CA	2843136	C	29 December 2020
				BR	112014001699	A2	13 June 2017
				JP	2014531196	A	27 November 2014
				JP	6298404	B2	20 March 2018
				US	2018291441	A1	11 October 2018
				US	10597713	B2	24 March 2020
				EP	2737084	A1	04 June 2014
				EP	2737084	B1	18 October 2017
				US	2015152492	A1	04 June 2015
				US	9957560	B2	01 May 2018
				KR	20140050067	A	28 April 2014
				US	2016281159	A1	29 September 2016
				US	10851409	B2	01 December 2020
<hr/>							
CN	104039979	A	10 September 2014	WO	2013057495	A2	25 April 2013
				WO	2013057495	A3	22 August 2013
				JP	2014534812	A	25 December 2014
				JP	6226869	B2	08 November 2017
				US	2022372568	A1	24 November 2022
				KR	20140090633	A	17 July 2014
				AU	2012324639	A1	22 May 2014
				AU	2012324639	B2	16 November 2017
				EP	2768977	A2	27 August 2014
				EP	2768977	B1	23 September 2015
				US	2018030530	A1	01 February 2018
				US	2018216175	A9	02 August 2018
				US	10724087	B2	28 July 2020
				US	2014255921	A1	11 September 2014
				US	9758823	B2	12 September 2017
				EP	2987870	A1	24 February 2016
				EP	2987870	B1	19 February 2020
				US	2021172011	A1	10 June 2021
				US	11634763	B2	25 April 2023
				CA	2852812	A1	25 April 2013
				BR	112014009579	A2	13 June 2017
				BR	112014009579	B1	22 June 2021
<hr/>							
US	2021363577	A1	25 November 2021	None			
<hr/>							
CN	109266537	A	25 January 2019	None			
<hr/>							
US	2019352709	A1	21 November 2019	US	11466317	B2	11 October 2022
				WO	2018100370	A1	07 June 2018

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/139739

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
				EP 3548636 A1	09 October 2019
				EP 3548636 B1	09 August 2023
				JP 2020500528 A	16 January 2020
				JP 7055805 B2	18 April 2022
				US 2023084931 A1	16 March 2023
				CA 3044351 A1	07 June 2018
				GB 201620450 D0	18 January 2017
				AU 2017367238 A1	13 June 2019
				AU 2017367238 A8	18 July 2019
				AU 2017367238 B2	21 October 2021
-----	-----	-----	-----	-----	-----
CN	108138227	A	08 June 2018	ES 2799074 T3	14 December 2020
				BR 112017024118 A2	31 July 2018
				US 2016319345 A1	03 November 2016
				US 10844428 B2	24 November 2020
				MX 2017013775 A	15 August 2018
				SG 10202006185 QA	29 July 2020
				KR 20180020137 A	27 February 2018
				KR 102091312 B1	19 March 2020
				AU 2016256351 A1	09 November 2017
				AU 2016256351 B2	18 July 2019
				SG 11201708859 XA	29 November 2017
				ZA 201707231 B	24 February 2021
				IL 294600 A	01 September 2022
				EP 3736341 A1	11 November 2020
				EP 3736341 B1	23 August 2023
				IL 285319 A	30 September 2021
				IL 285319 B	01 October 2022
				IL 285319 B2	01 February 2023
				HK 1244513 A1	10 August 2018
				RU 2017137401 A	28 May 2019
				RU 2017137401 A3	25 October 2019
				AU 2019250200 A1	07 November 2019
				AU 2019250200 B2	14 October 2021
				CA 3109403 A1	03 November 2016
				WO 2016176091 A1	03 November 2016
				WO 2016176091 A8	21 December 2017
				CA 2983935 A1	03 November 2016
				CA 2983935 C	20 April 2021
				DK 3289097 T3	02 June 2020
				JP 2018514207 A	07 June 2018
				JP 6685324 B2	22 April 2020
				NZ 736609 A	26 June 2020
				IL 255187 A0	31 December 2017
				IL 255187 B	31 October 2021
				EP 3289097 A1	07 March 2018
				EP 3289097 B1	18 March 2020
				AU 2022200179 A1	10 February 2022
				US 2021108262 A1	15 April 2021
-----	-----	-----	-----	-----	-----
WO	2022243692	A1	24 November 2022	None	
-----	-----	-----	-----	-----	-----

A. 主题的分类 C12Q1/68(2018.01) i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) IPC: C12Q 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNTXT, ENTXT, ENTXTC, CNKI, 万方数据库, ISI Web of Science, Baidu, Bing: Y衔接子, Y型, Y-shape, 纳米孔, 测序, 纳米测序, nanosequencing, 捕获, 单链区, single strand, 胆固醇, cholesterol, 接头, 连接子, adaptor, linker, 链置换, strand displacing polymerase, 锚, tether, 膜, membrane, 孔, pore, nanopore, 前导, 前导序列, 引导, leader, 延伸, enlogation, 抑制, 阻止, inhibit, prevent, 发夹, hairpin		
C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	CN 103827320 A (牛津纳米孔技术有限公司) 2014年5月28日 (2014 - 05 - 28) 说明书第123-132段, 实施例3, 图10	1-46
Y	CN 104039979 A (牛津纳米孔技术公司) 2014年9月10日 (2014 - 09 - 10) 说明书第18段	1-46
Y	US 2021363577 A1 (OXFORD NANOPORE TECHNOLOGIES LIMITED) 2021年11月25日 (2021 - 11 - 25) 说明书第8-18、23、46-47、88-90段	2-6, 9-31
Y	CN 109266537 A (首德生物科技(苏州)有限公司 等) 2019年1月25日 (2019 - 01 - 25) 说明书第7-13段	1-46
Y	US 2019352709 A1 (OXFORD NANOPORE TECHNOLOGIES LIMITED) 2019年11月21日 (2019 - 11 - 21) 说明书第7-67、72、101-106段	2-6, 9-31
<input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “D” 申请人在国际申请中引证的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期	2023年9月1日	国际检索报告邮寄日期 2023年9月8日
ISA/CN的名称和邮寄地址	中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	授权官员 武雪梅 电话号码 (+86) 010-53961961

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 108138227 A (亿明达股份有限公司) 2018年6月8日 (2018 - 06 - 08) 说明书第8-29段	1-46
A	WO 2022243692 A1 (OXFORD NANOPORE TECHNOLOGIES PLC) 2022年11月24日 (2022 - 11 - 24) 说明书第6-44、89-105段	1-46
A	WANG, Y.H. 等. "Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications" Nature Biotechnology, 第39卷, 2021年11月8日 (2021 - 11 - 08), 第1348-1365页	1-46
A	张皓博 等. "纳米孔测序技术在疾病检测中的研究进展" 中国动物检疫, 第38卷, 第6期, 2021年12月31日 (2021 - 12 - 31), 第82-89页	1-46

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/139739

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	103827320	A	2014年5月28日	US	2016362739	A1	2016年12月15日
				IN	221	DEN2 014A	2015年6月5日
				US	2020239950	A1	2020年7月30日
				US	11261487	B2	2022年3月1日
				US	2020024655	A1	2020年1月23日
				US	11168363	B2	2021年11月9日
				AU	2012288629	A1	2014年3月6日
				AU	2012288629	B2	2017年2月2日
				WO	2013014451	A1	2013年1月31日
				US	2022127669	A1	2022年4月28日
				CA	2843136	A1	2013年1月31日
				CA	2843136	C	2020年12月29日
				BR	112014001699	A2	2017年6月13日
				JP	2014531196	A	2014年11月27日
				JP	6298404	B2	2018年3月20日
				US	2018291441	A1	2018年10月11日
				US	10597713	B2	2020年3月24日
				EP	2737084	A1	2014年6月4日
				EP	2737084	B1	2017年10月18日
				US	2015152492	A1	2015年6月4日
US	9957560	B2	2018年5月1日				
KR	20140050067	A	2014年4月28日				
US	2016281159	A1	2016年9月29日				
US	10851409	B2	2020年12月1日				
CN	104039979	A	2014年9月10日	WO	2013057495	A2	2013年4月25日
				WO	2013057495	A3	2013年8月22日
				JP	2014534812	A	2014年12月25日
				JP	6226869	B2	2017年11月8日
				US	2022372568	A1	2022年11月24日
				KR	20140090633	A	2014年7月17日
				AU	2012324639	A1	2014年5月22日
				AU	2012324639	B2	2017年11月16日
				EP	2768977	A2	2014年8月27日
				EP	2768977	B1	2015年9月23日
				US	2018030530	A1	2018年2月1日
				US	2018216175	A9	2018年8月2日
				US	10724087	B2	2020年7月28日
				US	2014255921	A1	2014年9月11日
				US	9758823	B2	2017年9月12日
				EP	2987870	A1	2016年2月24日
				EP	2987870	B1	2020年2月19日
				US	2021172011	A1	2021年6月10日
				US	11634763	B2	2023年4月25日
				CA	2852812	A1	2013年4月25日
BR	112014009579	A2	2017年6月13日				
BR	112014009579	B1	2021年6月22日				
US	2021363577	A1	2021年11月25日	无			
CN	109266537	A	2019年1月25日	无			
US	2019352709	A1	2019年11月21日	US	11466317	B2	2022年10月11日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/139739

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利		公布日 (年/月/日)	
				WO	2018100370	A1	2018年6月7日
				EP	3548636	A1	2019年10月9日
				EP	3548636	B1	2023年8月9日
				JP	2020500528	A	2020年1月16日
				JP	7055805	B2	2022年4月18日
				US	2023084931	A1	2023年3月16日
				CA	3044351	A1	2018年6月7日
				GB	201620450	D0	2017年1月18日
				AU	2017367238	A1	2019年6月13日
				AU	2017367238	A8	2019年7月18日
				AU	2017367238	B2	2021年10月21日
CN	108138227	A	2018年6月8日	ES	2799074	T3	2020年12月14日
				BR	112017024118	A2	2018年7月31日
				US	2016319345	A1	2016年11月3日
				US	10844428	B2	2020年11月24日
				MX	2017013775	A	2018年8月15日
				SG	10202006185	QA	2020年7月29日
				KR	20180020137	A	2018年2月27日
				KR	102091312	B1	2020年3月19日
				AU	2016256351	A1	2017年11月9日
				AU	2016256351	B2	2019年7月18日
				SG	11201708859	XA	2017年11月29日
				ZA	201707231	B	2021年2月24日
				IL	294600	A	2022年9月1日
				EP	3736341	A1	2020年11月11日
				EP	3736341	B1	2023年8月23日
				IL	285319	A	2021年9月30日
				IL	285319	B	2022年10月1日
				IL	285319	B2	2023年2月1日
				HK	1244513	A1	2018年8月10日
				RU	2017137401	A	2019年5月28日
				RU	2017137401	A3	2019年10月25日
				AU	2019250200	A1	2019年11月7日
				AU	2019250200	B2	2021年10月14日
				CA	3109403	A1	2016年11月3日
				WO	2016176091	A1	2016年11月3日
				WO	2016176091	A8	2017年12月21日
				CA	2983935	A1	2016年11月3日
				CA	2983935	C	2021年4月20日
				DK	3289097	T3	2020年6月2日
				JP	2018514207	A	2018年6月7日
				JP	6685324	B2	2020年4月22日
				NZ	736609	A	2020年6月26日
				IL	255187	A0	2017年12月31日
				IL	255187	B	2021年10月31日
				EP	3289097	A1	2018年3月7日
				EP	3289097	B1	2020年3月18日
				AU	2022200179	A1	2022年2月10日
				US	2021108262	A1	2021年4月15日
WO	2022243692	A1	2022年11月24日	无			