

(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
2018 年 6 月 21 日 (21.06.2018)



(10) 国际公布号
WO 2018/107350 A1

(51) 国际专利分类号:
C12Q 1/68 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2016/109597

(22) 国际申请日: 2016 年 12 月 13 日 (13.12.2016)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 深圳华大基因研究院(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: 刘二凯(LIU, Erkai); 中国广东省深圳市
盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083
(CN)。 徐崇钧(XU, Chongjun); 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)。

(74) 代理人: 深圳鼎合诚知识产权代理有限公司
(DHC IP ATTORNEYS); 中国广东省深圳福

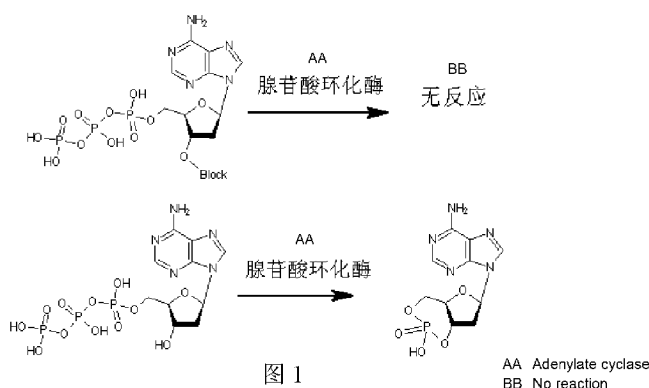
田区金田路与福华路交汇处现代商务大
厦2201, Guangdong 518048 (CN)。

(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,
CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS,
JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR,
LS, LU, LY, MA, MD, ME, 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, SM,
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, 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, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,
NA, RW, 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, 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)。

(54) Title: METHOD FOR PURIFYING REVERSIBLY BLOCKED DEOXYRIBONUCLEOTIDE TRIPHOSPHATE AND SE-
QUENCING METHOD

(54) 发明名称: 提纯可逆阻断脱氧核糖核苷三磷酸的方法和测序方法



(57) Abstract: Disclosed in the present invention are a method for purifying a reversibly blocked deoxyribonucleotide triphosphate and a sequencing method, the method for purifying a reversibly blocked deoxyribonucleotide triphosphate comprising: using an adenylate cyclase to treat a 3' reversibly blocked dATP, and/or using guanylate cyclase to treat a 3' reversibly blocked dGTP. When used in sequencing, a reversibly blocked dNTP which has been treated may lead to lower phase shifting, especially for a pre-determined phase, so as to improve sequencing quality.

(57) 摘要: 本发明公开了一种提纯可逆阻断脱氧核糖核苷三磷酸的方法和测序方法, 其中提纯可逆阻断脱氧核糖核苷三磷酸的方法包括: 使用腺苷酸环化酶处理3'可逆阻断的dATP, 和/或使用鸟苷酸环化酶处理3'可逆阻断的dGTP。经过处理的可逆阻断dNTP用于测序, 能够带来更低的移相, 尤其是预定相, 提高了测序质量。

本国际公布：

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

提纯可逆阻断脱氧核糖核苷三磷酸的方法和测序方法

技术领域

本发明涉及测序技术领域，尤其涉及一种提纯可逆阻断脱氧核糖核苷三磷酸的方法和测序方法。

背景技术

近年来，在基因测序技术领域，与其它测序方法相比，边合成边测序（sequencing by synthesis, SBS）的测序方法以其通量高、价格低而获得青睐。在这一测序方法中，3'可逆阻断的dNTP是测序的中心也是测序成本最主要和最影响测序质量的一环。在加入每个3'可逆阻断的dNTP后，3'阻断基团的存在阻止其它核苷酸加入合成的链中。在去除阻断基团后，恢复天然游离的3'羟基基团用于加入下一个核苷酸。但是如果由于合成或者存储等步骤导致非常少量的3'阻断基团脱落，就会增加测序的定相（Phasing）和预定相（Prephasing），所谓“定相（Phasing）”是指SBS中的现象，该现象由3'阻断基团和荧光基团的不完全除去引起，不能通过聚合酶在给定的测序循环中将DNA链的一部分完全并入到合成链中。“预定相（Prephasing）”是由在不存在有效的3'阻断基团的情况下，核苷酸并入所引起的，并且该并入事件预先进行了1个循环。这使测序过程移相发生的更严重、更快，从而降低读长，增加错误率，降低测序质量。这在不同的测序平台上都有体现。

为了提高3'阻断基团的稳定性，Illumina公司在专利申请WO2014139596A1中对阻断基团做了很多改性，利用其测序平台的定相和预定相来评判阻断基团的优劣。一般，可逆阻断的dNTP在合成之后，用高效液相色谱（HPLC）进行纯化，以及用核磁共振、质谱等表征其纯度。HPLC纯化可逆阻断的dNTP存在以下不足：依靠极性分离阻断的dNTP和未阻断的dNTP，差异太小，分离困难；

即使能分离开，在含有痕量未阻断的dNTP时，效率也较低而不能有效去除。

未阻断的dNTP来源包括可逆阻断的dNTP降解和合成步骤中引入两种可能性。不管哪一种在纯化步骤中如果未能得到完全的分离，测序的结果将会受到不同程度的影响，未阻断的浓度越高移相越快，测序结果越差。

发明内容

本发明提供一种提纯可逆阻断脱氧核糖核苷三磷酸的方法和测序方法，经过处理的可逆阻断 dNTP 用于测序，能够带来更低的移相，尤其是预定相，提高了测序质量。

根据本发明的第一方面，本发明提供一种提纯可逆阻断脱氧核糖核苷三磷酸的方法，该方法包括：使用腺苷酸环化酶处理 3'可逆阻断的 dATP，和/或使用鸟苷酸环化酶处理 3'可逆阻断的 dGTP。

进一步地，在 37°C 下进行上述处理。

进一步地，上述处理时间是 10 分钟以上。

进一步地，在含有 10mM Mg^{2+} 和 100mM NaCl 的 200mM Tris 缓冲液中进行上述处理。

进一步地，上述方法还包括：对处理后的产物进行过滤以去除至少部分蛋白。

进一步地，上述蛋白包括分子量大于 1 万的蛋白。

根据本发明的第二方面，本发明提供一种测序方法，该方法是边合成边测序方法，包括使可逆阻断脱氧核糖核苷三磷酸加入合成的链中，其中上述可逆阻断脱氧核糖核苷三磷酸中包括使用腺苷酸环化酶处理过的 3'可逆阻断的 dATP，和/或使用鸟苷酸环化酶处理过的 3'可逆阻断的 dGTP。

进一步地，上述方法还包括在使可逆阻断脱氧核糖核苷三磷酸加入合成的

链中之前，使用腺苷酸环化酶处理 3'可逆阻断的 dATP，和/或使用鸟苷酸环化酶处理 3'可逆阻断的 dGTP。

进一步地，在 37°C 下进行上述处理。

进一步地，还包括：对处理后的产物进行过滤以去除至少部分蛋白。

本发明将环化酶（腺苷酸环化酶和鸟苷酸环化酶）应用于测序技术领域，用于提纯可逆阻断脱氧核糖核苷三磷酸。由于环化酶只能使用未阻断的 dNTP，有非常高的特异性，能够使未阻断的 dNTP 在总 dNTP 的比例更低，甚至常规手段无法检测。另外，本发明在环化酶处理之后，仅需要过滤蛋白即可将 dNTP 用于测序，环化的脱氧核糖核苷（cdNMP）并不对测序产生任何影响。

附图说明

图1是阻断和非阻断的 dATP 在腺苷酸环化酶处理后的反应结果，其中 Block 表示 3'阻断基团。

图2是阻断和非阻断的 dGTP 在鸟苷酸环化酶处理后的反应结果，其中 Block 表示 3'阻断基团。

具体实施方式

下面通过具体实施方式结合附图对本发明作进一步详细说明。

在 3'可逆阻断的 dNTP 中，大部分 dNTP 都带有 3'阻断基团，然而仍有少量的 dNTP 不带 3'阻断基团，这些未阻断的 dNTP 会使测序结果受到不同程度的影响，未阻断的浓度越高移相越快，测序结果越差。

本发明实施例的提纯可逆阻断脱氧核糖核苷三磷酸的方法，其基本方案是：使用腺苷酸环化酶处理 3'可逆阻断的 dATP，和/或使用鸟苷酸环化酶处理 3'可逆阻断的 dGTP。

如图 1 所示, 带有 3'阻断基团 (Block) 的 dATP (三磷酸脱氧腺苷) 在腺苷酸环化酶的作用下, 不能发生环化反应; 而不带 3'阻断基团的 dATP 在腺苷酸环化酶的作用下, 发生环化生成环化的脱氧腺苷酸 (cdAMP)。

如图 2 所示, 带有 3'阻断基团 (Block) 的 dGTP (三磷酸脱氧鸟苷) 在鸟苷酸环化酶的作用下, 不能发生环化反应; 而不带 3'阻断基团的 dGTP 在鸟苷酸环化酶的作用下, 发生环化生成环化的脱氧鸟苷酸 (cdGMP)。

本发明实施例中, 阻断基团可以是任何本领域中用于阻断 dNTP 的 3'羟基的基团, 典型单非限定性的包括叠氮亚甲基。其它的可用阻断基团还包括例如国际申请 WO2014139596A1 中公开的那些阻断基团。本发明对阻断基团的种类没有特别限定, 根据本发明的原理, 任何本领域中用于阻断 dNTP 的 3'羟基的基团都可以作为本发明中的阻断基团。

本发明实施例中, 待纯化的 3'可逆阻断的 dATP 或 3'可逆阻断的 dGTP, 可以是 HPLC 纯化过的, 也可以是采用其它方法纯化过的, 甚至是合成后尚未纯化的, 本发明对此没有特别限定。

本发明实施例中, 腺苷酸环化酶或鸟苷酸环化酶, 可以是市售的酶, 也可以是通过酶工程等方法获得的酶, 并且也包括任何改造过的仍然具有腺苷酸环化酶或鸟苷酸环化酶活性的酶, 还包括任何具有腺苷酸环化酶或鸟苷酸环化酶活性同时具有其它酶活性的酶。就是说, 在本发明中, 腺苷酸环化酶或鸟苷酸环化酶采用广义的概念。

本发明方法产生的环化的脱氧腺苷酸和脱氧鸟苷酸不能在 SBS 测序中并入合成的链中, 因此有效地降低了测序过程中的预定相现象。同时, 环化的脱氧腺苷酸和脱氧鸟苷酸也不会对测序过程造成负面影响。

本发明实施例中, 腺苷酸环化酶或鸟苷酸环化酶在各自适宜的酶反应温度下进行反应, 优选在各自的最适反应温度下进行反应。在本发明的一个实施例中, 在 37°C 下进行反应, 反应时间可以是 1 分钟以上, 优选 10 分钟以上, 例

如 20 分钟、30 分钟、60 分钟等。

本发明实施例中，酶反应缓冲液可以是任何适于腺苷酸环化酶或鸟苷酸环化酶反应的缓冲液。在本发明的一个实施例中，在含有 10mM Mg^{2+} 和 100mM NaCl 的 200mM Tris 缓冲液中进行反应，能取得明显优异的效果。

本发明实施例中，优选地，对处理后的产物进行过滤以去除至少部分蛋白，尤其是分子量大于 1 万的蛋白。过滤处理可以使用合适的滤膜。通过过滤处理去除大分子蛋白，能够有效避免大分子蛋白对后续测序反应的影响。通过过滤处理后的产物可以直接用于测序反应中，当然也可以根据需要进行合适的稀释或浓缩，甚至是其它纯化处理等。

在本发明的一个实施例中，腺苷酸环化酶（ADCY2）在大肠杆菌中合成并提纯表征之后，在含有 10mM Mg^{2+} 和 100mM NaCl 的 200mM Tris 缓冲液中，加入要纯化的 3'可逆阻断的 dATP，加入腺苷酸环化酶，37℃孵育一定时间，过滤分子量大于 1 万的蛋白，通过测序平台验证腺苷酸环化酶处理的 3'可逆阻断的 dATP 有更低的预定相。调节 Mg^{2+} 的浓度和腺苷酸环化酶的浓度以改变 dATP 的 K_m 值能够达到更好的纯化效果。

本发明实施例还提供一种测序方法，该方法是边合成边测序方法，包括使可逆阻断脱氧核糖核苷三磷酸加入合成的链中，其中可逆阻断脱氧核糖核苷三磷酸中包括使用腺苷酸环化酶处理过的 3'可逆阻断的 dATP，和/或使用鸟苷酸环化酶处理过的 3'可逆阻断的 dGTP。

边合成边测序方法，是测序领域中已知的测序方法，本发明不在赘述。本发明与现有边合成边测序方法的关键不同就在于，本发明使用腺苷酸环化酶处理过的 3'可逆阻断的 dATP，和/或使用鸟苷酸环化酶处理过的 3'可逆阻断的 dGTP，代替或者至少部分代替现有的 3'可逆阻断的 dATP 和/或 3'可逆阻断的 dGTP，尤其是仅经过 HPLC 纯化的 3'可逆阻断的 dATP 和/或 3'可逆阻断的 dGTP。

本发明实施例的测序方法中使用的 3'可逆阻断的 dATP 和/或 3'可逆阻断的

dGTP 可以是预先处理备用的，也可以是在测序之前临时制备的。在临时制备的情况下，本发明实施例的测序方法，可以认为还包括：在使可逆阻断脱氧核糖核苷三磷酸加入合成的链中之前，使用腺苷酸环化酶处理 3'可逆阻断的 dATP，和/或使用鸟苷酸环化酶处理 3'可逆阻断的 dGTP。

本发明将环化酶（腺苷酸环化酶和鸟苷酸环化酶）应用于测序技术领域，用于提纯可逆阻断脱氧核糖核苷三磷酸。由于环化酶只能使用未阻断的 dNTP，有非常高的特异性，能够使未阻断的 dNTP 在总 dNTP 的比例更低，甚至常规手段无法检测。另外，本发明在环化酶处理之后，仅需要过滤蛋白即可将 dNTP 用于测序，环化的脱氧核糖核苷（cdNMP）并不对测序产生任何影响。

以下通过实施例详细说明本发明的技术方案和效果，应当理解，实施例意在用于示例性的说明本发明，并不构成对本发明保护范围的限制。

实施例 1 鸟苷酸环化酶的表达纯化

鸟苷酸环化酶采用 DNA 2.0 的 Electra™ Cloning Reagents Kit 试剂盒进行表达载体的构建，利用 His 标签进行 Ni 柱亲和纯化。

纯化后的鸟苷酸环化酶进行相关的纯度检测，利用浓缩胶为 5%、分离胶为 12%的 SDS-PAGE 进行电泳检测。纯化后的鸟苷酸环化酶纯度能达到 95%以上。

实施例 2 鸟苷酸环化酶的活性检测

鸟苷酸环化酶活性检测采用检测产物 HPLC 检测，定义酶与底物于 37°C 反应 10min 环化 10nmol dGTP 为一个酶活单位，且聚合活性达标。

于 96 孔板中按下表 1 加入反应液。

表 1

组分	体积
10×反应缓冲液	2.5μl
10mM dGTP	2.5μl

适当稀释的酶液	1 μ l
H ₂ O	至25 μ l

37°C孵育10min, 10mM EDTA终止反应后, 混匀, 利用HPLC测定其中dGTP转化为环状dGTP(鸟嘌呤单磷酸核苷酸)的产率。

结果显示: 鸟苷酸环化酶利用上述检测方法其在37°C反应10min环化dGTP的量大于10nmol。表明鸟苷酸环化酶活性正常。

实施例3 鸟苷酸环化酶处理3'可逆阻断的dGTP以及处理后3'可逆阻断的dGTP在测序中的表现

对3'可逆阻断的dGTP进行鸟苷酸环化酶处理, 在一定量的3'可逆阻断的dGTP中加入鸟苷酸环化酶缓冲液(含有10mM Mg²⁺和100mM NaCl的200mM Tris缓冲液)和鸟苷酸环化酶, 37°C孵育10分钟, 分别将处理过的和未处理过的3'可逆阻断的dGTP配置成BGISEQ-500或者Illumina测序平台的测序试剂, 测序20个碱基的长度, 对比其中鸟嘌呤的预定相值。如表2所示。

表2

平台	未处理的预定相值	处理过的预定相值
BGISEQ-500	0.11	0.07
HISEQ-2500	0.15	0.10

结论: 鸟苷酸环化酶能降低测序试剂中由3'可逆阻断的dGTP未完全阻断所带来的预定相, 从而提高测序质量。

以上内容是结合具体的实施方式对本发明所作的进一步详细说明, 不能认定本发明的具体实施只局限于这些说明。对于本发明所属技术领域的普通技术人员来说, 在不脱离本发明构思的前提下, 还可以做出若干简单推演或替换, 都应当视为属于本发明的保护范围。

权 利 要 求 书

1. 一种提纯可逆阻断脱氧核糖核苷三磷酸的方法，其特征在于，所述方法包括：使用腺苷酸环化酶处理 3'可逆阻断的 dATP，和/或使用鸟苷酸环化酶处理 3'可逆阻断的 dGTP。

2. 根据权利要求 1 所述的提纯可逆阻断脱氧核糖核苷三磷酸的方法，其特征在于，在 37°C 下进行所述处理。

3. 根据权利要求 2 所述的提纯可逆阻断脱氧核糖核苷三磷酸的方法，其特征在于，所述处理时间是 10 分钟以上。

4. 根据权利要求 1-3 任一项所述的提纯可逆阻断脱氧核糖核苷三磷酸的方法，其特征在于，在含有 10mM Mg^{2+} 和 100mM NaCl 的 200mM Tris 缓冲液中进行所述处理。

5. 根据权利要求 1-3 任一项所述的提纯可逆阻断脱氧核糖核苷三磷酸的方法，其特征在于，所述方法还包括：对处理后的产物进行过滤以去除至少部分蛋白。

6. 根据权利要求 5 所述的提纯可逆阻断脱氧核糖核苷三磷酸的方法，其特征在于，所述蛋白包括分子量大于 1 万的蛋白。

7. 一种测序方法，其特征在于，所述方法是边合成边测序方法，包括使可逆阻断脱氧核糖核苷三磷酸加入合成的链中，其中所述可逆阻断脱氧核糖核苷三磷酸中包括使用腺苷酸环化酶处理过的 3'可逆阻断的 dATP，和/或使用鸟苷酸环化酶处理过的 3'可逆阻断的 dGTP。

8. 根据权利要求 7 所述的测序方法，其特征在于，所述方法还包括在使可逆阻断脱氧核糖核苷三磷酸加入合成的链之前，使用腺苷酸环化酶处理 3'可逆阻断的 dATP，和/或使用鸟苷酸环化酶处理 3'可逆阻断的 dGTP。

9. 根据权利要求 8 所述的测序方法，其特征在于，在 37°C 下进行所述处理。

10. 根据权利要求 8 或 9 所述的测序方法，其特征在于，还包括：对处理后

的产物进行过滤以去除至少部分蛋白。

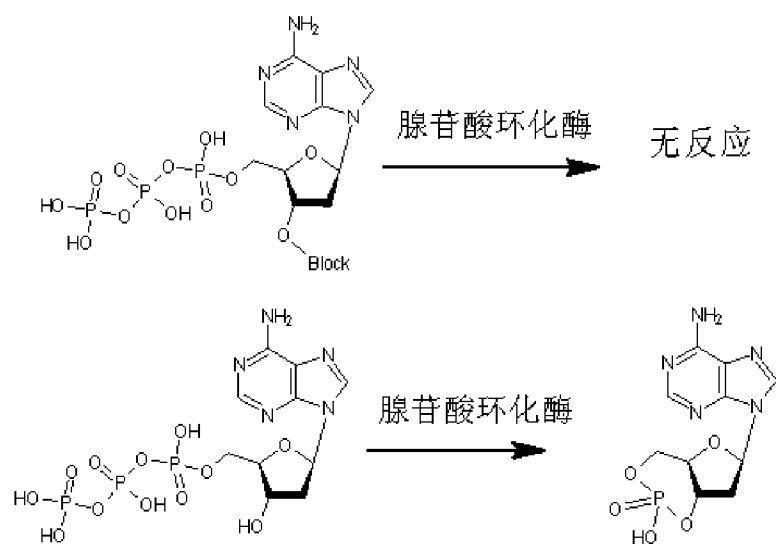


图 1

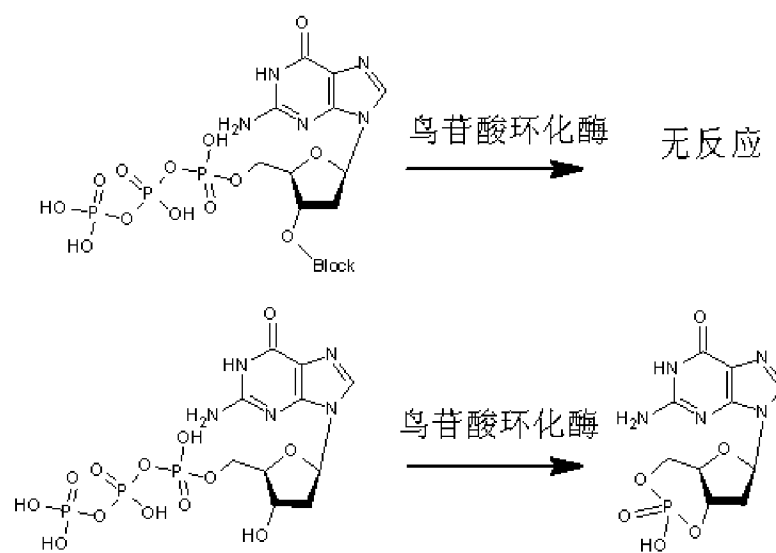


图 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/109597

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/68 (2006.01) 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)

C12Q1 /-

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)

CNABS, CNKI, CAPLUS, EPODOC, DWPI: 环化, 可逆阻断, 环化酶, 脱氧核糖核酸三磷酸, 边合成边测序, sbs, dntp, sequencing and synthesis, cyclase, reverse block

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	汤道年等, "四色荧光标记二硫键可逆终端的合成及在 DNA 合成测序中的应用", 高等学校化学学报, 35(11), 30 November 2014 (30.11.2014), pages 2346-2352, (TANG, Daonian et al., "Synthesis and Application of Four Fluorescence Labeled Nucleotides Through Disulfide as Reversible Terminators in DNA Sequencing by Synthesis", CHEMICAL JOURNAL OF CHINESE UNIVERSITIES)	1-10
A	WO 2014139596 A1 (ILLUMINA CAMBRIDGE LTD.), 18 September 2014 (18.09.2014), the whole document	1-10
A	CN 101942000 A (CHINA HYK GENE TECHNOLOGY CO., LTD.), 12 January 2011 (12.01.2011), the whole document	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search .201.0 (0)	Date of mailing of the international search report 12 September 2017
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer WANG, Shaohua Telephone No. (86-10) 62086353

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2016/109597

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2014139596 A1	18 September 2014	US 9593373 B2	14 March 2017
		US 2017166961 A1	15 June 2017
		AU 2013382358 A1	17 September 2015
		CA 2903095 A1	18 September 2014
		HK 1220463 A1	05 May 2017
		JP 2016512206 A	25 April 2016
		CN 105377869 A	02 March 2016
		AU 2013382358 B2	12 January 2017
		US 2016002721 A1	07 January 2016
		KR 20150132474 A	25 November 2015
		EP 2970356 A1	20 January 2016
CN 101942000 A	12 January 2011	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2016/109597

A. 主题的分类 C12Q 1/68(2006.01) 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) C12Q1/- 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)) CNABS, CNKI, CAPLUS, EPODOC, DWPI; 环化, 可逆阻断, 环化酶, 脱氧核糖核酸三磷酸, 边合成边测序, sbs, dntp, sequencing and synthesis, cyclase, reverse block														
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>汤道年等. "四色荧光标记二硫键可逆终端的合成及在DNA合成测序中的应用" 高等学校化学学报, 第35卷, 第11期, 2014年 11月 30日 (2014 - 11 - 30), 第2346-2352页</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2014139596 A1 (ILLUMINA CAMBRIDGE LTD) 2014年 9月 18日 (2014 - 09 - 18) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 101942000 A (深圳华因康基因科技有限公司) 2011年 1月 12日 (2011 - 01 - 12) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	汤道年等. "四色荧光标记二硫键可逆终端的合成及在DNA合成测序中的应用" 高等学校化学学报, 第35卷, 第11期, 2014年 11月 30日 (2014 - 11 - 30), 第2346-2352页	1-10	A	WO 2014139596 A1 (ILLUMINA CAMBRIDGE LTD) 2014年 9月 18日 (2014 - 09 - 18) 全文	1-10	A	CN 101942000 A (深圳华因康基因科技有限公司) 2011年 1月 12日 (2011 - 01 - 12) 全文	1-10
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求												
A	汤道年等. "四色荧光标记二硫键可逆终端的合成及在DNA合成测序中的应用" 高等学校化学学报, 第35卷, 第11期, 2014年 11月 30日 (2014 - 11 - 30), 第2346-2352页	1-10												
A	WO 2014139596 A1 (ILLUMINA CAMBRIDGE LTD) 2014年 9月 18日 (2014 - 09 - 18) 全文	1-10												
A	CN 101942000 A (深圳华因康基因科技有限公司) 2011年 1月 12日 (2011 - 01 - 12) 全文	1-10												
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 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 "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 . 201.0(0)		国际检索报告邮寄日期 2017年 9月 12日												
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		授权官员 王少华 电话号码 (86-10)62086353												

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/109597

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	2014139596	A1	2014年 9月 18日	US	9593373	B2	2017年 3月 14日
				US	2017166961	A1	2017年 6月 15日
				AU	2013382358	A1	2015年 9月 17日
				CA	2903095	A1	2014年 9月 18日
				HK	1220463	A1	2017年 5月 5日
				JP	2016512206	A	2016年 4月 25日
				CN	105377869	A	2016年 3月 2日
				AU	2013382358	B2	2017年 1月 12日
				US	2016002721	A1	2016年 1月 7日
				KR	20150132474	A	2015年 11月 25日
				EP	2970356	A1	2016年 1月 20日
CN	101942000	A	2011年 1月 12日	无			