(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
2009 年5 月28 日 (28.05.2009)

PCT

(10) 国际公布号
WO 2009/065355 A1

(51) 国际专利分类号:
C12Q 1/68 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2008/073092

(22) 国际申请日: 2008 年11 月17 日 (17.11.2008)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
200710170507.1
2007 年11 月16 日 (16.11.2007) CN

(71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): **深圳华因康基因科技有限公司(HYK GENE TECHNOLOGY CO., LTD.)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区高新科技园南区留创大厦21楼, Guangdong 518057 (CN)。

(72) 发明人; 及

(75) 发明人/申请人 (仅对美国): **邵志峰(SHAO, Zhifeng)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区高新科技园南区留创大厦21楼, Guangdong 518057 (CN)。 **盛司潼(SHENG, Sitong)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区高新科技园南区留创大厦21楼, Guangdong 518057 (CN)。

(74) 代理人: 北京英赛嘉华知识产权代理有限责任公司(INSIGHT INTELLECTUAL PROPERTY LIMITED); 中国北京市海淀区知春路甲48号盈都大厦A座19A、19B, Beijing 100098 (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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:
— 包括国际检索报告。

(54) **Title:** DNA SEQUENCING METHOD AND SYSTEM

(54) **发明名称:** DNA测序方法及系统

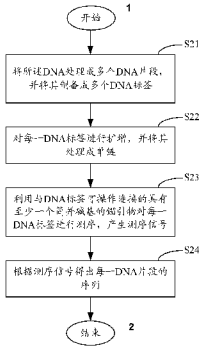


图 2 / Fig. 2

1 START
S21 THE DNA IS TREATED INTO A VARIETY OF DNA FRAGMENTS, AND PREPARED INTO A VARIETY OF DNA SIGNATURES
S22 EACH OF DNA SIGNATURES IS AMPLIFIED AND TREATED INTO THE SINGLE STRAND
S23 EACH OF DNA SIGNATURES IS SEQUENCED BY USING THE ANCHOR PRIMERS WHICH CAN OPERATIONALLY LINK WITH THE DNA SIGNATURE AND HAVE AT LEAST ONE DEGENERATE BASE, AND THEREFORE THE SEQUENCING SIGNAL IS GENERATED
S24 ACCORDING TO THE SEQUENCING SIGNAL, DETERMINE THE SEQUENCE OF EACH OF DNA FRAGMENTS
2 END

(57) Abstract: The invention provides a DNA sequencing method and system. The said DNA sequencing method comprises the steps below: A. The DNA is treated into a variety of DNA fragments, and prepared into a variety of DNA signatures; B. Each of DNA signatures is amplified and treated into the single strand; C. Each of DNA signatures is sequenced by using the anchor primers which can operationally link with the DNA signature and have at least one degenerate base, and therefore the sequencing signal is generated; D. According to the sequencing signal, determine the sequence of each of DNA fragments. The said DNA sequencing system comprises a manufacture unit, an amplification unit, a sequencing reaction unit and a signal treatment unit of short signatures. During the DNA sequencing, the DNA signature is sequenced by using the anchor primers which have at least one degenerate base. Consequently, the invention method prolongs the length range capable of direct-sequencing the short DNA signature. The invention can sequence the shorter and the longer DNA signatures, and broaden the application range of DNA sequencing.

[见续页]

WO 2009/065355 A1

(57) 摘要：

本发明提供了一种 DNA 测序方法及系统。所述 DNA 测序方法包括以下步骤：A.将所述 DNA 处理成多个 DNA 片段，并将其制备成多个 DNA 标签；B.对每一 DNA 标签进行扩增，并将其处理成单链；C.利用与 DNA 标签可操作连接的、具有至少一个简并碱基的锚引物对每一 DNA 标签进行测序，并产生测序信号；D.根据测序信号得出每一 DNA 片段的序列。所述 DNA 测序系统包括短标签制备单元、扩增单元、测序反应单元和信号处理单元。本发明在进行 DNA 测序的过程中，利用具有至少一个简并碱基的锚引物对 DNA 标签进行测序，因此延长了能直接测定的短 DNA 标签的长度，对于较短和较长的 DNA 标签的序列都能进行测定，扩大了 DNA 测序的应用范围。

DNA 测序方法及系统

技术领域

本发明涉及基因工程领域，更具体地说，涉及一种DNA测序方法及系统。

背景技术

随着已完成测序的基因组数量的增加，需要分析基因组序列所编码的大量信息，以及由散布于基因组中的不同序列元件控制及参与的生物功能。在功能基因组研究中发展起来的方法，主要包括以下两种：基因芯片技术、基于分离得到的DNA序列进行定量分析。

基因芯片技术中的常用手段是寡核苷酸阵列，其通过在载体表面固定代表基因组序列不同区域的寡核苷酸，然后按比例进行杂交，从而显示目标序列的相对丰度。寡核苷酸阵列的主要优势是相对便捷的操作，且具有进行大量平行操作的能力。但是基因芯片无法同时大量地分析组织或细胞内基因组表达的状况，而且由于芯片技术需要准备基因探针，所以可能漏掉那些未知的、表达丰度不高却可能是很重要的调节基因，另外其交叉杂交现象也会影响测序的正确率。

目前一般采用的方法是基于分离得到的DNA序列进行定量分析。在这类方法中，最初采用的是SAGE（Serial analysis of gene expression，基因表达连续性分析），该技术是以测序为基础分析特定组织或细胞类型中的基因群体表达状态。而现阶段主要采用MPSS（massively parallel signature sequencing，大规模平行信号测序），该技术是对SAGE的改进，其测序过程如附图1所示，包括以下步骤：在步骤S11中，通过随机超声破碎和分子生物学方法将DNA制备成DNA标签；在步骤S12中，将DNA标签通过水油乳液PCR（Polymerase Chain Reaction，聚合酶链反应）扩增方法制备成附着于微珠上的DNA标签，并将微珠通过凝胶包埋在玻片表面，形成一层密排微珠；在步骤S13中，通过联接法对微珠上的DNA标签进行平行测序，首先将单链DNA与测序锚引物杂交，然后通过连接酶与四色荧光标记的寡核苷酸连接进行碱基选择，此过程产生测序信号，在该步骤中所采用的测序锚引物为固定的锚引物，通过联接反应能够辨认的碱基一般在7个以内；在步骤S14中，采集测序信号，并进行数据处理以读出DNA标签的序列，其中正确连接的碱基通过荧光标记进行成像读取。

在该现有技术中，由于所使用的测序锚引物所能检测的碱基一般在从锚引物往外的7个碱基以内，所以只能测长度较短的DNA标签，但所测序列长度较小（例如小于14）时，将短标签回帖到基因组序列库时则无法进行数据比

对，因此导致所测序列信息无法得到有效的应用。另外，微珠的固定方式是通过凝胶包埋在玻片表面，在这种处理方式下微珠密度不能太高，这就使得通量和反应效率都难以得到突破。此外，采用四色荧光标记时，不同颜色本身的信号强弱存在差异，可能存在被背景色掩盖的情况，导致测序结果出现偏差。

因此需要一种新的DNA测序方法，能够扩大DNA测序的应用范围，也能进一步提高通量、反应效率和准确率。

发明内容

本发明的目的之一在于提供一种DNA测序方法，旨在扩大DNA测序的应用范围。

为了实现发明目的，所述DNA测序方法包括以下步骤:

A.将所述DNA处理成多个DNA片段，并将其制备成多个DNA标签;

B.对每一DNA标签进行扩增，并将其处理成单链;

C.利用与DNA标签可操作连接的、具有至少一个简并碱基的锚引物对每一DNA标签进行测序，并产生测序信号;

D.根据测序信号得出每一DNA片段的序列。

其中所述步骤A中将所述DNA处理成多个DNA片段的方式包括：物理破碎，或DNA酶切等。

其中所述步骤A中将DNA片段制备成多个DNA标签的过程包括：在DNA片段的两端分别添加一接头序列，生成DNA标签，所述接头序列包含与锚引物中通用序列互补的序列，以及扩增引物的序列。

在本发明的一个方面中，所述扩增引物可以是聚合酶链反应引物。

其中所述接头序列中还可进一步包含II型限制酶位点，用于通过酶切将DNA片段处理成同样长度的DNA标签。

其中所述接头序列中还可进一步包含用于对所述测序信号进行归一化处理的锚引物序列，即归一化锚引物。

在本发明的一个方面中，所述步骤B中的扩增可以利用聚合酶链反应。

其中所述步骤B包括:

B1.将所述DNA标签中接头序列所包含的聚合酶链反应引物固定于载体表面;

B2.把与所述载体相关联的聚合酶链反应体系分隔成独立的反应室，每个反应室中包含一个独立的DNA标签;

B3.在所述反应室中进行聚合酶链反应，产生DNA标签的多个拷贝;

B4.将得到的DNA标签处理成单链。

所述步骤B1包括：将所述聚合酶链反应引物的5’端通过共价连接或生物素结合的方式固定于载体表面。

其中所述步骤B1中的载体包括：玻片或微珠等。

其中所述反应室可以是皮升级反应室等。

其中当所述载体是玻片，则所述步骤B2包括：将软性材料制成的、带有皮升体积小孔的罩具覆盖在玻片表面，将聚合酶链反应体系分割形成皮升级反应室。

其中当所述载体是微珠时，则所述步骤B2包括：将微珠分散进聚合酶链反应体系，再将聚合酶链反应体系置入油性液体中混合形成悬浮的皮升级反应滴，每个皮升级反应滴均作为一个独立的皮升级反应室。

其中所述步骤B3之后进一步包括对微珠进行富集的过程，包括：

对结合于微珠上的DNA标签进行氨基化修饰；

将微珠通过氨基结合方式共价固定连接到载物片的水平表面，形成富集阵列。

其中所述步骤C包括：

C1.将具有K个简并碱基的测序锚引物与固定于载体表面的DNA标签进行杂交，其中K为正整数；

C2.所述测序锚引物通过K个简并碱基沿着DNA标签进行延伸，并在延伸过程中产生测序信号。

其中所述步骤C之前还包括：通过对多聚寡核苷酸进行人工合成的方式，将所述测序锚引物合成为具有K个简并碱基的测序锚引物。

其中所述步骤C2的同时还包括以下步骤：C2’.利用接头序列中的归一化锚引物进行联接反应，产生归一化信号。

其中所述步骤C2还包括采取重叠性测序机制，即：使用带有两端固定的测序锚引物的微珠，分别从DNA标签的两端进行测序并从两个方向读出序列。

其中所述步骤C2还包括采用II型内切酶步移机制，即：利用DNA标签中接头序列具有的II型酶切位点，将部分已完成测序的DNA标签切割下来，并将新的接头序列连接到II型酶切位点以产生一条新的DNA标签，再从新的接头序列开始进行测序，从而得到所述DNA标签中剩余区域的序列结果。

其中具有K个简并碱基的测序锚引物包括：延长引物或聚合酶延展引物。

其中当所述具有K个简并碱基的测序锚引物是延长引物时，步骤C2包括：所述延长引物与末端有荧光标记的简并多聚物进行联接反应，从而沿着DNA标签进行延伸，并在延伸过程中产生测序信号。

其中所述简并多聚物的荧光标记方式包括：进行四色荧光标记，或进行双色荧光标记。

其中当所述具有K个简并碱基的测序锚引物是聚合酶延展引物时，步骤C2包括：将DNA聚合酶、核苷酸、带标记（生物素标记或荧光标记）的核苷酸加入，使得聚合酶延展引物的3’端沿着DNA标签进行延伸，并在延伸过程中产生测序信号。

其中当所述具有K个简并碱基的测序锚引物是聚合酶延展引物时，步骤C2之后进一步包括：去除从聚合酶延展引物延伸得到的DNA链。

其中所述去除从聚合酶延展引物延伸得到的DNA链的方式包括：变性，或通过核酸外切酶消化，或通过伴随有酶切的变性。

其中所述步骤D包括：

D1.通过光学成像对所述测序信号进行采集；

D2.读出不同测序信号对应的不同碱基，即所述DNA片段的序列。

其中步骤D1还包括：通过光学成像对所述测序信号及归一化信号同时进行采集，并利用所述归一化信号对各次反应所得的测序信号进行归一化处理。

为了更好的实现发明目的，本发明还提供了一种DNA测序系统，包括：

短标签制备单元，用于将所述DNA处理成多个DNA片段，并将其制备成多个DNA标签；

扩增单元，与短标签制备单元相连，用于对每一DNA标签进行扩增；

测序反应单元，与扩增单元相连，利用与DNA标签可操作连接的、具有至少一个简并碱基的锚引物对每一DNA标签进行测序，并产生测序信号；

信号处理单元，与测序反应单元相连，根据测序信号得出每一DNA片段的序列。

其中测序反应单元包括：

反应腔，其一侧内壁上设置载体，所述载体表面固定多个DNA标签，并接收测序反应试剂以对所述DNA标签进行测序，从而产生测序信号；

试剂入口和试剂出口，分别设于反应腔另一侧内壁的两端，分别用于供所述测序反应试剂流入反应腔中和从反应腔中流出。

其中信号处理单元包括：

数据采集模块，用于采集所述测序信号；

数据处理模块，用于根据测序信号读出每一DNA片段的序列。

由上可知，本发明在进行DNA测序的过程中，利用具有至少一个简并碱基的测序锚引物对DNA标签进行测序，因此延长了能直接测定的DNA标签的长度，对于较短和较长的DNA标签的序列都能进行测定，扩大了DNA测序的应用范围。

附图说明

图1是现有技术中采用MPSS技术进行DNA测序的方法流程图；

图2是本发明的一个实施方式中进行DNA测序的方法流程图；

图3是本发明的一个实施方式中基于DNA制备DNA标签的方法流程图；

图4是本发明的一个实施方式中基于DNA制备DNA标签的示意图；

图5是本发明的一个实施方式中通过单分子PCR反应扩增DNA标签的方法流程图；

图6是本发明的一个实施方式中利用具有至少一个简并碱基的测序锚引物对DNA标签进行测序的方法流程图；

图7是本发明的一个实施方式中利用延长引物作为测序锚引物进行测序的示意图；

图8是本发明的另一个实施方式中利用具有至少一个简并碱基的测序锚引物对DNA标签进行测序的方法流程图；

图9是本发明的另一个实施方式中利用延长引物作为测序锚引物进行测序的示意图；

图10是本发明其中一个实施方式中采集测序信号并对其进行数据处理以读出DNA标签的序列的方法流程图；

图11是本发明的一个优选实施方式中的DNA测序方法流程图；

图12是本发明的另一个优选实施方式中DNA测序方法流程图；

图13是本发明的一个实施方式中利用聚合酶延展引物作为测序锚引物进行测序的示意图；

图14是本发明的一个实施例中进行实际测序的成像示意图，其中碱基G在此测试中用Cy3标记的简并多聚物读出；

图15是本发明的一个实施方式中进行DNA测序的系统结构图；

图16是本发明的一个实施方式中信号处理单元的结构图。

为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白，以下结合附图及实施例，对本发明进行进一步详细说明。

具体实施方式

在本发明中，首先基于DNA制备DNA标签并组成DNA标签，然后通过单分子PCR反应扩增所述每一DNA标签，再利用具有至少一个简并碱基的测序锚引物对DNA标签执行测序，并产生测序信号，然后采集测序信号并对其进行数据处理以读出DNA标签的序列。在本发明中，由于利用了具有至少一个简并碱基的测序锚引物对DNA标签进行测序，因此延长了能直接测定的DNA标签的长度，对于较短和较长的DNA标签的序列都能进行测定，从而扩大了DNA测序的应用范围。

图2示出了本发明其中一个实施方式中进行DNA测序的方法流程，具体过程如下：

在步骤S21中，将DNA处理成多个DNA片段，并将其制备成多个DNA标签。该步骤的具体实现过程将在图3和图4中详细阐述。

在步骤S22中，对每一DNA标签进行扩增。该步骤的具体实现过程将在图5中详细阐述。

在步骤S23中，利用与DNA标签可操作连接的具有至少一个简并碱基的锚引物对每一DNA标签进行测序，产生测序信号。该步骤的具体实现过程将在图6、图7、图8、图9中详细阐述。

在步骤S24中，根据测序信号得出每一DNA片段的序列。该步骤的具体实现过程将在图10中详细阐述。

在一个实施方式中，图2中步骤S21基于DNA制备DNA标签的具体过程如图3所示，包括以下步骤：

在步骤S211中，将DNA处理成DNA片段。在本发明中，将DNA处理成DNA片段的方式可有多种，例如通过物理破碎，或进行DNA酶切等。一般地，对于较长的DNA片段，用随机剪切就能使其长度减小到数百碱基对的范围内。但是，对于某些方面的应用，如mRNA作图和图谱，则可以根据需要选择限制酶位点将转化后的DNA切割成具有粘性末端的DNA片段。

在步骤S212中，在DNA片段的两端分别添加一接头序列，生成DNA标签，该接头序列中包含与锚引物中通用序列互补的序列，以及扩增引物的序列。在本发明中，该锚引物用于对DNA片段进行测序，其根据接头序列设计而成，在一个优选实施方式中，将该锚引物称为测序锚引物，包括一段通用序列和至少一个简并碱基，其中通用序列与上述DNA标签中的接头序列互补。关于该测序锚引物，将在后述的图7、图9及实例中进行详细阐述。

在一个优选实施方式中，可将生成的DNA标签汇集在一起，组成一个标签库，便于在后续的测序反应中进行信号采集。

在一个优选实施方式中，接头序列除了包含与测序锚引物中通用序列互补的序列，还包含用于对测序信号进行归一化处理的锚引物序列，称为归一化锚引物。

本发明的扩增引物可有多种，在一个实施方式中该扩增引物是PCR引物。

在一个具体的实施方式中，制备DNA标签的过程如图4所示。

首先，将DNA处理成DNA片段。此阶段需要设计好接头序列，需要说明的是：对于随机切割而成的DNA片段，接头序列被设计为5'端带有6个随机碱

基的突出片段，该突出片段能与3'端带有6个互补碱基的序列进行配对；对于带粘性末端的DNA片段，接头序列被设计成带有可与双链DNA连接的互补末端。在本实施方式中，为了产生同样长度的DNA标签，所设计的第一个接头序列中还包含一种II型限制酶位点（IIs）。

然后，将DNA片段变性为单链，与第一个接头序列连接，从而完成一个联接反应。由于第一个接头序列中包含一种II型限制酶位点，因此通过切割连有第一个接头序列的DNA片段，使其一个小片段与第一个接头序列一起被切割下来，可将连接好的DNA片段处理成同样长度。

DNA片段被固定在第一个接头序列上之后，其自由末端可被修补成钝端，并连接第二个接头序列，这样就产生了共带有两个接头序列的DNA标签。

在一个实施方式中，图2中步骤S22扩增DNA标签的具体过程如图5所示。本发明可采取多种方式扩增DNA标签，而在本实施方式中是采用单分子PCR反应来实现扩增的，因此前述的DNA标签中接头序列所包含的扩增引物是PCR引物。该扩增过程具体包括以下步骤:

在步骤S221中，将DNA标签中接头序列所包含的PCR引物固定于载体表面。本发明所称的载体可有多种，例如玻片、微珠等。在一个优选实施例中，该步骤是将PCR引物的5'端通过共价连接或生物素结合的方式固定到玻片或微珠等载体的表面。

在步骤S222中，把与载体相关联的PCR反应体系分隔成反应室，每个反应室中包含一个独立的DNA标签。本发明所称的PCR反应体系包括引物、聚合酶、DNA标签、dNTP、缓冲液等。上述步骤中的反应室典型的可为皮升级反应室，当然本发明并不限于该方式，例如还可是纳升级反应室等。当前述步骤S221采用不同的载体时，步骤S222构建皮升级反应室的方式有多种。

在上述步骤的一个实例中，当载体是玻片时，构建皮升级反应室的过程为：将软性材料制成的、带有皮升体积小孔的罩具覆盖在玻片表面，从而将PCR反应体系分割形成皮升级反应室。其中，该软性材料可以是聚二甲基硅氧烷橡胶（PDMS），通过光刻（photolithography）技术制成带有皮升体积小孔的罩具。

在上述步骤的另一实例中，载体是微珠，构建皮升级反应室的过程为：将微珠分散进PCR反应体系，再将PCR反应体系置入油性液体中混合形成悬浮的含有微珠的皮升级反应滴，每个皮升级反应滴均作为一个独立的皮升级反应室。

在步骤S223中，在皮升级反应室中进行PCR反应，产生DNA标签的多个拷贝。

在步骤S224中，将得到的所有DNA标签均处理成单链。在一个实施方式中，可通过对DNA标签的碱性变性，得到单链的DNA标签。

应当说明的是，若本发明采用的载体是微珠，则在步骤S223结束之后还包括对微珠进行富集的过程，具体包括：（1）首先对结合于微珠上的DNA标签进行氨基化修饰；（2）然后将微珠通过氨基结合方式共价固定连接到载物片的水平表面，形成富集阵列。其中，载物片是一种用于放置样品的透明材料，例如玻片、塑料、石英等。本发明采用一种胺化学方法将带DNA标签的微珠一步连接在一张特殊修饰的玻片表面，该方法非常有效，填充因子接近可用表面的70%，可以使用过量的微珠而没有重叠的问题，更重要的是，未结合的微珠很容易回收以作为下次实验之用，而不会失去它们的功能。

在上述对微珠进行富集的过程中，步骤（1）对结合于微珠上的DNA标签进行氨基化修饰的方法有多种:

在一个实施方式中，结合在微珠上的DNA可以使用末端脱氧核苷酸转移酶直接跟踪氨基化修饰的核苷酸。氨基化修饰的核苷酸，如aa-dUTP（氨基烯丙基-dUTP）, aa-dCTP（氨基烯丙基dCTP）等，可以单独添加或者和dNTP（脱氧核苷酸）一起添加到末端转移酶跟踪反应中，用来标记DNA分子。可以选择采用的是，去二氧核苷酸也可以以适当比例加入该反应，用以限制尾端长度。

在另一个实施方式中，氨基化修饰的寡核苷酸可以用补骨脂素进行双重标记，可以通过光激励同微珠上配对互补的DNA进行共价固定连接，从而实现对DNA标签的氨基化修饰。

在上述对微珠进行富集的过程中，步骤（2）将微珠通过氨基结合方式共价固定连接到载物片的水平表面，共价连接单元的顶端可以是胺族或者羟基族。该共价固定连接可以通过肼和醛或酮的连接为基础，这种共价固定连接过程可以由包括如下的若干载物片之一的共价连接来实现:

在第一个实例中，载物片表面（玻璃或者聚苯乙烯）通过胺族进行修饰，然后加入EDC（1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺等碳化二亚胺，同羟基族进行配对，组成基础胺族。

在第二个实例中，载物片表面（玻璃）通过硅烷化过程用胺族进行修饰。经过硅烷化的表面包括硅烷层，其中包括带有官能性胺族的硅烷分子。

在第三个实例中，载物片表面（玻璃）由硅烷层进行修饰，而硅烷层有如下官能族之一：醛、环氧、琥珀酰亚胺或者上述官能族的混合物。这些官能族相互作用，这种作用是共价的或者非共价的，是通过没有修饰或者用胺进行了修饰的DNA在微珠或者寡核苷酸上进行的。

在第四个实例中，载物片表面（聚苯乙烯）通过修饰以后包含胺族，并可以通过共价固定连接与氨基化修饰的寡核苷酸或者DNA结合，这种修饰是在微珠上进行的。氨基化修饰的聚苯乙烯表面是通过芬芳族肼合物修饰的，例如SANH（C6-succinimidyl 6-hydrazinonicotinate acetone hydrazone，C6-琥珀酰亚氨基-6-肼烟碱酸丙酮腙）或者SHTH（succinimidyl 4-hydrazidoterephtalate hydrochloride，琥珀 4-酰亚氨基盐酸盐）等芬芳族肼合物。氨基化修饰的DNA或寡核苷酸是醛修饰的，并且该醛化合物还修饰了SFB（C6-succinimidyl 4-formylbenzoate，4-甲酸苯甲酸C6-琥珀酰亚胺酯）。当上述化合物混合时，肼和醛就反应产生了腙。

应当指出的是，本发明并不限于上述的实施方案，其他类似的处理方式均应包含在本发明的保护范围之内。

在一个实施方式中，图2中步骤S23利用具有至少一个简并碱基的测序锚引物对DNA标签进行测序的具体过程如图6所示。

在测序之前，通过对多聚寡核苷酸进行人工合成的方式，将测序锚引物合成为与DNA标签可操作连接的、具有K个简并碱基的测序锚引物，其中K为正整数，一般可设置K的值为1-20。设计思想是，将DNA标签中接头序列的一段互补链作为测序锚引物的通用序列，然后在此通用序列的基础上添加K个简并碱基。在本发明中，上述具有K个简并碱基的测序锚引物可有多种，例如可以是延长引物、聚合酶延展引物等。需要说明的是，本发明所称的延长引物是指利用连接酶通过联接反应进行测序时所使用的测序锚引物，聚合酶延展引物是指利用DNA聚合酶进行测序时所使用的测序锚引物。

在步骤S231中，将上述具有K个简并碱基的测序锚引物与固定于载体表面的DNA标签进行杂交。

在步骤S232中，该测序锚引物通过K个简并碱基沿着DNA标签进行延伸，并在延伸过程中产生测序信号。如前所述，本发明中具有K个简并碱基的测序锚引物有多种，对于不同的种类，步骤S232的具体实现过程存在差异。

在一个实施方式中，该具有K个简并碱基的测序锚引物是延长引物，如图7所示，那么在该步骤S232中，延长引物与末端有荧光标记的简并多聚物进行联接反应，从而沿着DNA标签进行延伸，并在延伸过程中产生测序信号。其中，简并多聚物可包括多种，例如6聚物、7聚物、8聚物、9聚物等。另外，简并多聚物的荧光标记方式有多种，包括生物素标记、荧光标记等，其中荧光标记方式包括进行四色荧光标记，或进行双色荧光标记等。以简并9聚物为例，对荧光标记方式详述如下：（1）若采用四色荧光标记的简并多聚物，可将其中一套用于3’端，另一套用于5’端。此处，首先完成简并多聚物寡核苷酸

连接设计，从而可以读出从延长引物与DNA标签连接处的6到7个碱基，随后使用从延长引物接合处延伸出去的K（例如K=6）个简并碱基。在本实施方式中，这种延长引物的长度是优化的，通过使用带有不同数目简并碱基的延长引物的扫描，总共可以从同一个末端读出多达12个碱基，因此足以应用于更加复杂的测序目标（例如人类基因组序列）的分析。（2）为了进一步改进信号输出的强度，本发明可在每个测序反应中使用一种双色检测法以代替四色检测法。在该方式下，可利用强荧光标记，如Cy3（菁3）、TAMRA（4甲基-罗丹明）、Texas-Red （德州红）或TEX613（德克斯613）等。在一个具体实验中，使用两种标记简并多聚物和两种非标记简并多聚物组成的连接混合物（如Cy3---A，Texas-Red---G，---T，---C），在玻片表面或微珠上的DNA标签的测序信号就可被检测到。随后延长引物与已连接的简并多聚物被移除，再使用相同的延长引物和与刚才标记不同的简并多聚物混合物（如Cy3---T，Texas-Red---C，---A，---G）再进行一次测序，并产生测序信号，两次的连接检测可以产生含有所有四个碱基信息的一整套数据。

在另一实施方式中，若该具有K个简并碱基的测序锚引物是聚合酶延展引物时，那么在该步骤S232中，将DNA聚合酶、核苷酸、带有标记（生物素标记或荧光标记）的核苷酸加入聚合酶延展引物，使得聚合酶延展引物的3’端沿着DNA标签进行延伸，并在延伸过程中产生测序信号。而在此步骤之后，需要去除从聚合酶延展引物延伸得到的DNA链，去除的方式有多种，例如：变性（在低盐缓冲的情况下提高温度），或通过核酸外切酶消化（例如λ核酸外切酶），或通过伴随有酶切的变性（例如dUTP用于延伸混合物时使用的尿嘧啶DNA糖基化酶和DNA糖基化酶，以及核酸内切酶VIII）。

在一个优选实施方式中，为了提高测序精度，上述步骤S232还可采取重叠性测序机制，或采用II型内切酶步移机制进行。具体为：（1）采用重叠性测序机制，即：使用带有两端固定的测序锚引物的微珠，分别从DNA标签的两端进行测序，并从两个方向读出序列；（2）采用II型内切酶步移机制，即：利用DNA标签中接头序列具有的II型酶切位点，将部分已完成测序的DNA标签切割下来，并将新的接头序列连接到II型酶切位点以产生一条新的DNA标签，再从新的接头序列开始进行测序，从而得到所述DNA标签中剩余区域的序列结果。

在另一优选实施方式中，如图8和图9所示，若DNA标签中的接头序列包含归一化锚引物，则在执行步骤S232的同时，利用接头序列中的归一化锚引物和带有标记的寡核苷酸多聚物进行联接反应，产生归一化信号，从而可在后续的数据处理过程中对多次循环反应的效率进行归一，消除每次反应间的差异，从而进一步提高了测序的准确率。

在一个实施方式中，图2中步骤S24采集测序信号并对其进行数据处理以读出DNA标签的序列的具体过程如图10所示，包括以下步骤:

在步骤S241中，通过光学成像对所述测序信号进行采集。

在一个优选实施方式中，若执行前述步骤S232的同时产生了归一化信号，则在执行步骤S241的同时对归一化信号进行采集，并利用该归一化信号对所采集到的测序信号进行归一化处理，从而消除各次反应之间的差异。在本发明的一个实例中，是利用测序信号与归一化信号的比值来实现归一化处理的，例如，测序信号一为X，测序信号二为Y，归一化信号为M，归一化处理后的测序信号则分别为X/M、Y/M。

在步骤S242中，读出不同测序信号对应的不同碱基，即所述DNA标签的序列。本发明是根据碱基互补分辨特性，推断DNA标签中碱基的类型

图11是本发明的一个优选实施方式中的DNA测序方法流程图。该实施方式是本发明的一个优选实施方式，其应用场景是采用延长引物作为测序锚引物，并采用微珠作为载体，具体过程如下:

在步骤S1101中，将DNA处理成DNA片段。

在步骤S1102中，在DNA片段的两端分别添加一接头序列，通过酶切生成同样长度的DNA标签。

在步骤S1103中，将DNA标签中接头序列所包含的PCR引物固定于微珠表面。

在步骤S1104中，将微珠分散进PCR反应体系，再置入油性液体形成皮升级反应滴，作为皮升级反应室。

在步骤S1105中，在皮升级反应室中进行PCR反应，并将PCR反应之后的所有DNA标签均处理成单链，并对微珠进行富集。

在步骤S1106中，将具有K个简并碱基的延长引物与固定于载体表面的DNA标签进行杂交。

在步骤S1107中，延长引物与末端有双色荧光标记的简并多聚物进行联接反应，延伸并产生测序信号。

在步骤S1108中，利用接头序列中的归一化锚引物进行联接反应，产生归一化信号。

在步骤S1109中，通过光学成像对测序信号和归一化信号进行采集，并对测序信号进行归一化处理。

在步骤S1110中，读出不同测序信号对应的不同碱基，即DNA标签的序列。

在图11所示的上述优选实施方式的一个具体实例中:

延长引物与DNA标签进行杂交，即延长引物与DNA标签的锚引物序列直接配对。随后进行的是该延长引物与一套末端有荧光标记的简并九聚物（NNNNNNNNN）进行联接反应。为了读出某一碱基的序列，简并九聚物是由四种九聚物混合而成，这四种九聚物在某个位置的碱基类型X（如NNNXNNNNN，X=A，T，G，C）与标记此九聚物的荧光类型相一致。由于在九聚物中X位置的连接酶的碱基互补分辨特性，能够推断标签序列中碱基的类型。由于延长引物含有K个简并碱基（例如K=1，2，3，4，5，6），就能利用带有不同数量简并碱基的延长引物而用同一套九聚物（如XNNNNNNNNN, X=A，T，C，G）读出DNA标签中的一段序列。或者可以利用延长引物与九聚物的不同组合，来读出同样位置的碱基序列。

本发明采用该方法的首要特点是可以读出DNA标签中更长片断的序列，例如可达13个连续碱基；而在现有技术中，连接酶只对第六或第七个碱基之内的片断具有分辨作用。在本发明中，从两端的每个延长引物位点开始10碱基以上的位点都是可读的碱基，用上述方法可以对DNA标签上的5'或3'端的引物结合位点开始读出20个以上的碱基序列。因此，这种方法完全可用于那些用较长的II型内切酶（如Mme I，EcoP15I）产生的DNA标签序列。此外，本发明也可以设计缺口引物系列，它们含有比短标签序列上引物片断短的锚引物，比如相对于未知标签序列的起始位点后退至-3, -2, -1的位置。利用这种缺口锚引物，就可以仅仅使用一套简并九聚物引物读出DNA标签序列，例如NNNXNNNNN，将第四个位置设计成与此四种引物中的A、T、G、C对应，从而读出DNA标签中的第1至第10个碱基。

图12是本发明的另一个优选实施方式中DNA测序方法流程图。该实施方式是本发明的另一个优选实施方式，其中采用聚合酶延展引物作为测序锚引物，并采用玻片作为载体，具体过程如下:

在步骤S1201中，将DNA处理成DNA片段。

在步骤S1202中，在DNA片段的两端分别添加一接头序列，通过酶切生成同样长度的DNA标签。

在步骤S1203中，将DNA标签中接头序列所包含的PCR引物固定于玻片表面。

在步骤S1204中，将带有皮升体积小孔的罩具覆盖在玻片表面，将PCR反应体系分割形成皮升级反应室。

在步骤S1205中，在皮升级反应室中进行PCR反应。

在步骤S1206中，将具有K个简并碱基的聚合酶延展引物与固定于载体表

面的DNA标签进行杂交。

在步骤S1207中，将DNA聚合酶、核苷酸加入聚合酶延展引物，使得聚合酶延展引物延伸并产生测序信号。

在步骤S1208中，通过光学成像对测序信号进行采集。

在步骤S1209中，读出不同测序信号对应的不同碱基，即DNA标签的序列。

在图12所示的上述优选实施方式的一个实例中，利用聚合酶延展引物作为测序锚引物进行测序的过程如图13所示:

在该实例中，聚合酶延展引物包括同DNA标签中锚引物互补的序列，并且带有K个长度各不相同的简并碱基，在3'端也有特定的碱基（A，T，C，G）。用该聚合酶延展引物同固定在载体（微珠或者玻璃等）的DNA标签进行杂交。

当将DNA聚合酶加入时，同DNA标签进行杂交的引物的3'端则得到延伸。由于DNA聚合酶的选择性，只有在3'端带有同DNA标签互补碱基的引物才能在标签模板上得到延展，并产生信号。将标记的核苷酸混合进延展混合物时，正确延展的DNA标签可以被正确识别，而3'端没有互补碱基的引物就不会被延伸，因此也不会产生信号。

通过碱基特异的原理，3'端有不同碱基的锚引物可以应用到该DNA标签，从而可以基于每个DNA标签上标记的不同信号推测不同DNA标签的序列信息。简并碱基的数量（例如K=1-9）可以决定从DNA标签的锚位点往下数第K+1位处的碱基信息。例如，一个聚合酶延展引物的结构为“锚引物-NNN-A/T/G/C”，那么可以决定从DNA标签的锚位点往下数第4个碱基位的碱基信息，这意味着DNA标签中第4个位置的碱基信息可以读出。

本发明提供了两个实例，详述如下:

实例1是采用延长引物进行DNA测序的情况。在该实例中，所使用的待测DNA是已经处理好的DNA片段，处理成DNA标签后两端带有测序锚引物序列和归一化锚引物序列。

该短DNA标签的序列为：5`-CCACTACACTGGTACTCCTCATCGATGACGTACGACT CGATTACGAATCG CTAGCATTCGGACTCGATACGAAGTCGATCGATGAGA;

其中：CCTCATCGATGACGTACGACT是DNA标签的接头部分，其互补链（5`AGTCGTACGTCATCGATGAGG）即为测序锚引物序列的通用部分序列，而测序锚引物是根据这个通用序列加上不同数目（例如，k=1-9）的简并碱基来设计合成。例如，5`AGTCGTACGTCATCGATGAGGN，含有一个简并碱基;

CGATTACGAATCG为待测DNA的序列;

CGATACGAAGTCGATCGATG为归一化锚引物的序列。

对于这段待测DNA，具体的测序实验操作如下:

（1）DNA标签通过单分子PCR反应，复制多次并固定到微珠表面， 并通过对DNA标签的碱性变性，得到5'端固定于微珠表面的单链DNA。

（2）通过氨基共价结合的方法，将微珠固定到玻璃载物片表面，得到可用来测序的固定于同一平面的DNA标签。

（3）将测序锚引物序列（5`AGTCGTACGTCATCGATGAGGN）、归一化锚引物序列（5`CATCGATCGACTTCGTATCG）与单链DNA在杂交缓冲液（例如，SSC、SSPE）中进行杂交反应，先将体系升温（50℃-80℃），然后缓慢降温，通过退火得到正确配对的模板和两种锚引物。

（4）将反应液置换成联接反应液，加入连接酶、带荧光标记的寡核苷酸多聚物、带荧光标记的归一化多聚物，将温度控制在（20℃-30℃），反应时间为1分钟到30分钟。

（5）将未连接多余反应物清洗掉，置换成清洗缓冲液。

（6）对于微珠进行荧光光学成像，记录所用锚引物和寡核苷酸多聚物所测的DNA序列中所对应的碱基。并同时记录归一化信号的大小。

（7）置换缓冲液，为短链去除加入酶混合物，例如尿嘧啶DNA糖基化酶（UDG）和DNA糖基化酶-裂解酶ENDO VIII的混合物，升温体系到30℃-37℃，反应1-10分钟，在测序锚引物中间的U位置切割。

（8）置换缓冲液为变性缓冲液，升温体系到45℃-65℃，将联接成的短的DNA链去除，将DNA复原成初始待测序的单链状态。

（9）选择不同的锚引物（带有不同简并碱基数目的锚引物，例如5`AGTCGTACGTCATCGATGAGGNN，5`AGTCGTACGTCATCGATGAGGNNN)，并配合以对应不同的位点（位点标记对应于特定的碱基位置和碱基性质，位置1-7，碱基A、T、C、G）的不同多聚寡核苷酸，对于DNA标签上的其他的序列位置的碱基进行同样的反应步骤来读取序列信息。在该实例中，最终读出序列为: CGATTACGAATCG，与原始待测的DNA片段的序列对应一致。

实例2是采用聚合酶延展引物的情况。在该实例中，所使用的待测DNA是已经处理好的DNA片段，处理成DNA标签后两端带有测序锚引物序列和归一化锚引物序列。

该 DNA 标 签 的 序 列 为 : 5`-CCACTACACTGGTACT CCTCATCGATGACGTACGACT CGATTACGAATCG CTAGCATTCGGA

CTCGATACGAAGTCGATCGATGAGA。

其中：5`-CTAGCATTCGGA CTCGATA是DNA标签的接头部分，其互补链（5`-TATCGAGTCCGAATGCTAG）即为测序锚引物序列的通用部分序列，而测序锚引物是根据这个通用序列加上不同数目（例如，k=1-9）的简并碱基和一个3`末端的定位碱基（A/T/C/G）来设计合成。例如，对于检测所测序列中的第三个位置的碱基，一套由四个测序锚引物5`AGTCGTACGTCATCGATGAGGNN（A/T/C/G）组成的系列能用来检测任意；5`-CGATTACGAATCG为待测DNA的序列。

对于这段待测DNA，具体的测序实验操作如下：

（1）DNA标签通过单分子PCR反应，复制多次并固定到微珠表面，并通过对DNA标签的碱性变性，得到5'端固定于微珠表面的单链DNA。

（2）通过氨基共价结合的方法，将微珠固定到玻璃载物片表面，得到可用来测序的固定于同一平面的DNA标签。

（3）将测序锚引物序列（5`-TATCGAGTCCGAATGCTAGNG）单链DNA在杂交缓冲液（例如，SSC、SSPE）中进行杂交反应，先将体系升温（50℃-80℃），然后缓慢降温，通过退火得到正确配对的模板和两种锚引物。

（4）将反应液置换成联接反应液，加入DNA聚合酶、带荧光标记的核苷酸、常规的核苷酸等混合反应体系。将温度控制在（30℃-55℃），反应时间为1分钟到10分钟。

（5）将未多余反应物清洗掉，置换成清洗缓冲液。

（6）对于微珠进行荧光光学成像，记录在测序锚引物末端发生了延伸反应的微珠。由于仅在测序锚引物末端与所测DNA片段正确配对（此例中测序锚引物上的是G，而被测序列上是C）的情况才会有延伸。因此信号记录了测序锚引物末端对应的DNA片段上的序列位置的碱基。如果选择的测序锚引物末端是其他三个碱基，配对不正确，就不会发生延伸反应。这样所测序列位置的碱基可以正确读出。

（7）置换缓冲液，为短链去除加入酶混合物，例如尿嘧啶DNA糖基化酶(UDG)和DNA糖基化酶-裂解酶ENDO VIII的混合物，升温体系到30℃-37℃，反应2-10分钟，在测序锚引物中间的U位置切割。

（8）置换缓冲液为变性缓冲液，升温体系到40℃-65℃，将新合成的DNA链去除掉，将DNA复原成初始待测序的单链状态。

（9）同样方法将末端带有其他三种碱基（T/C/G）的锚引物对DNA片段测序，在四种碱基对应的测序锚引物都检测后，模板序列上对应于测序锚引物末端的碱基可以读出。

（10）选择带有不同简并碱基个数的锚引物（例如，

TATCGAGTCCGAATGCTAGNN（A/T/C/G），TATCGAGTCCGAATGCTAGNNN（A T/C/G）对于模板上的不同碱基位置进行同样的反应步骤来读取序列信息。在该实例中，最终读出序列为：CGATTACGAATCG，与原始待测的短DNA片段的序列对应一致。

图 14是本发明的上述两个实例中进行测序所得到的成像示意图，其中碱基 G 在此测试中用Cy3标记的聚合物读出，样品的密度达到非常高，而且信噪比很好，实验条件为：10x物镜，NA=0.3，100 W 汞灯，CCD 采用 2 秒曝光。

图15示出了本发明的一个实施方式中进行DNA测序的系统结构，包括短标签制备单元10、扩增单元20、测序反应单元30、信号处理单元40。其中：

（1）短标签制备单元10，用于将所述DNA处理成多个DNA片段，并将其制备成多个DNA标签。

（2）扩增单元20，与短标签制备单元10相连，用于扩增每一DNA标签。

（3）测序反应单元30，与扩增单元20相连，利用与DNA标签可操作连接的、具有至少一个简并碱基的锚引物对每一DNA标签进行测序，并产生测序信号。

在一个具体实施方式中，测序反应单元包括：反应腔，其一侧内壁上设置载体，所述载体表面固定多个DNA标签，并接收测序反应试剂以对所述DNA标签进行测序，从而产生测序信号；试剂入口和试剂出口，分别设于反应腔另一侧内壁的两端，分别用于供所述测序反应试剂流入反应腔中和从反应腔中流出。在本发明中，所采用的测序反应试剂包括连接酶和荧光寡核苷酸，或者聚合酶和荧光核苷酸等。

（4）信号处理单元40，与测序反应单元30相连，根据所述测序信号得出每一DNA片段的序列。

在一个具体实施方式中，如图16所示，信号处理单元40包括：数据采集模块41，用于采集前述的测序信号；数据处理模块42，用于根据测序信号读出每一DNA片段的序列。

在一个实施例中，数据采集模块4包括成像器件和读出器。成像器件可采用大规格CCD探头，例如400万到1100万像素的CCD探头，从而可实现高速率数据采集并提高全部数据的通量。

以上所述仅为本发明的较佳实施方式而已，并不用以限制本发明，凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

权利要求:

1、一种DNA测序方法，包括以下步骤:

A.将所述DNA处理成多个DNA片段，并将其制备成多个DNA标签;

B.对每一DNA标签进行扩增，并将其处理成单链;

C.利用与DNA标签可操作连接的、具有至少一个简并碱基的锚引物对每一DNA标签进行测序，并产生测序信号;

D.根据测序信号得出每一DNA片段的序列。

2、根据权利要求1所述的DNA测序方法，其中所述步骤A中将所述DNA处理成多个DNA片段的方式包括：物理破碎，或DNA酶切。

3、根据权利要求1所述的DNA测序方法，其中所述步骤A中将DNA片段制备成多个DNA标签的过程包括:

在DNA片段的两端分别添加一接头序列，生成DNA标签，所述接头序列包含与锚引物中通用序列互补的序列，以及扩增引物的序列。

4、根据权利要求3所述的DNA测序方法，其中所述扩增引物是聚合酶链反应引物。

5、根据权利要求4所述的DNA测序方法，其中所述接头序列中进一步包含II型限制酶位点，用于通过酶切将DNA片段处理成同样长度的DNA标签。

6、根据权利要求5所述的DNA测序方法，其中所述接头序列中进一步包含用于对所述测序信号进行归一化处理的锚引物序列，即归一化锚引物。

7、根据权利要求6所述的DNA测序方法，其中所述步骤B中的扩增是利用聚合酶链反应。

8、根据权利要求7所述的DNA测序方法，其中所述步骤B包括:

B1.将所述DNA标签中接头序列所包含的聚合酶链反应引物固定于载体表面;

B2.把与所述载体相关联的聚合酶链反应体系分隔成独立的反应室，每个反应室中包含一个独立的DNA标签;

B3.在所述反应室中进行聚合酶链反应，产生DNA标签的多个拷贝;

B4.将得到的DNA标签处理成单链。

9、根据权利要求8所述的DNA测序方法，其中所述步骤B1包括:

将所述聚合酶链反应引物的5'端通过共价连接或生物素结合的方式固定于载体表面。

10、根据权利要求9所述的DNA测序方法，其中所述步骤B1中的载体包括:玻片或微珠。

11、根据权利要求10所述的DNA测序方法，其中所述反应室是皮升级反应室。

12、根据权利要求11所述的DNA测序方法，其中当所述载体是玻片，则所述步骤B2包括:

将软性材料制成的、带有皮升体积小孔的罩具覆盖在玻片表面，将聚合酶链反应体系分割形成皮升级反应室。

13、根据权利要求11所述的DNA测序方法，其中所述载体是微珠，则所述步骤B2包括:

将微珠分散进聚合酶链反应体系，再将聚合酶链反应体系置入油性液体中混合形成悬浮的皮升级反应滴，每个皮升级反应滴均作为一个独立的皮升级反应室。

14、根据权利要求13所述的DNA测序方法，其中所述步骤B3之后进一步包括对微珠进行富集的过程，包括:

对结合于微珠上的DNA标签进行氨基化修饰;

将微珠通过氨基结合方式共价固定连接到载物片的水平表面，形成富集阵列。

15、根据权利要求14所述的DNA测序方法，其中所述步骤C包括:

C1.将具有K个简并碱基的锚引物与固定于载体表面的DNA标签进行杂交，其中K为正整数;

C2.所述锚引物通过K个简并碱基沿着DNA标签进行延伸，并在延伸过程中产生测序信号。

16、根据权利要求15所述的DNA测序方法，其中所述步骤C之前还包括:

通过对多聚寡核苷酸进行人工合成的方式，将所述锚引物合成为具有K个简并碱基的锚引物。

17、根据权利要求16所述的DNA测序方法，其中所述步骤C2的同时还包括以下步骤：

C2'.利用接头序列中的归一化锚引物进行联接反应，产生归一化信号。

18、根据权利要求17所述的DNA测序方法，其中所述步骤C2还包括采取重叠性测序机制，即：

使用带有两端固定的锚引物的微珠，分别从DNA标签的两端进行测序，并从两个方向读出序列。

19、根据权利要求17所述的DNA测序方法，其中所述步骤C2还包括采用II型内切酶步移机制，即：

利用DNA标签中接头序列具有的II型酶切位点，将部分已完成测序的DNA标签切割下来，并将新的接头序列连接到II型酶切位点以产生一条新的DNA标签，再从新的接头序列开始进行测序，从而得到所述DNA标签中剩余区域的序列结果。

20、根据权利要求17所述的DNA测序方法，其中所述具有K个简并碱基的锚引物包括：延长引物或聚合酶延展引物。

21、根据权利要求20所述的DNA测序方法，其中当所述具有K个简并碱基的锚引物是延长引物时，步骤C2包括：

所述延长引物与末端带标记的简并多聚物进行联接反应，从而沿着DNA标签进行延伸，并在延伸过程中产生测序信号。

22、根据权利要求21所述的DNA测序方法，其中所述简并多聚物的标记方式包括：生物素标记，或荧光标记。

23、根据权利要求20所述的DNA测序方法，其中当所述具有K个简并碱基的锚引物是聚合酶延展引物时，步骤C2包括：

将DNA聚合酶、带标记的核苷酸加入聚合酶延展引物，使得聚合酶延展引物的3'端沿着DNA标签进行延伸，并在延伸过程中产生测序信号。

24、根据权利要求23所述的DNA测序方法，其中当所述具有K个简并碱基的锚引物是聚合酶延展引物时，步骤C2之后进一步包括:

去除从聚合酶延展引物延伸得到的DNA链。

25、根据权利要求24所述的DNA测序方法，其中所述去除从聚合酶延展引物延伸得到的DNA链的方式包括：变性，或通过核酸外切酶消化，或通过伴随有酶切的变性。

26、根据权利要求25所述的DNA测序方法，其中所述步骤D包括:

D1.通过光学成像对所述测序信号进行采集;

D2.读出不同测序信号对应的不同碱基，即所述DNA片段的序列。

27、根据权利要求26所述的DNA测序方法，其中所述步骤D1还包括：通过光学成像对所述测序信号及归一化信号同时进行采集，并利用所述归一化信号对各次反应所得的测序信号进行归一化处理。

28、一种DNA测序系统，包括:

短标签制备单元，用于将所述DNA处理成多个DNA片段，并将其制备成多个DNA标签;

扩增单元，与短标签制备单元相连，用于对每一DNA标签进行扩增，并将其处理成单链;

测序反应单元，与扩增单元相连，利用与DNA标签可操作连接的、具有至少一个简并碱基的锚引物对每一DNA标签进行测序，并产生测序信号;

信号处理单元，与测序反应单元相连，根据测序信号得出每一DNA片段的序列。

29、根据权利要求28所述的DNA测序系统，其中测序反应单元包括:

反应腔，其一侧内壁上设置载体，所述载体表面固定多个DNA标签，并接收测序反应试剂以对所述DNA标签进行测序，从而产生测序信号;

试剂入口和试剂出口，分别设于反应腔另一侧内壁的两端，分别用于供所述测序反应试剂流入反应腔中和从反应腔中流出。

30、根据权利要求28所述的DNA测序系统，其中信号处理单元包括:

数据采集模块，用于采集所述测序信号;

数据处理模块，用于根据测序信号读出每一DNA片段的序列。

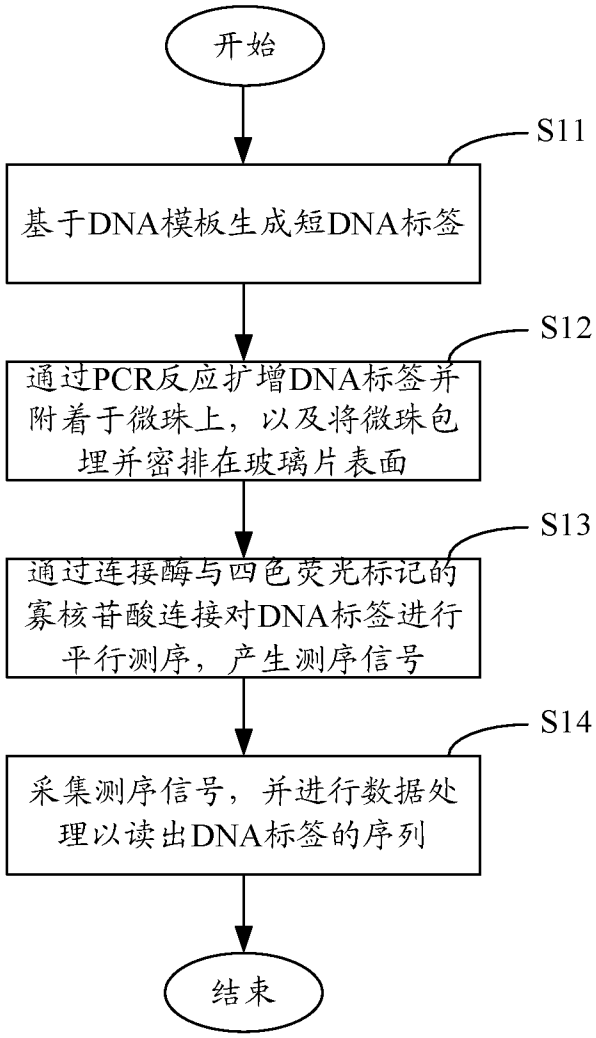

开始
S11
基于DNA模板生成短DNA标签
S12
通过PCR反应扩增DNA标签并附着于微珠上，以及将微珠包埋并密排在玻璃片表面
S13
通过连接酶与四色荧光标记的寡核苷酸连接对DNA标签进行平行测序，产生测序信号
S14
采集测序信号，并进行数据处理以读出DNA标签的序列
结束

图 1

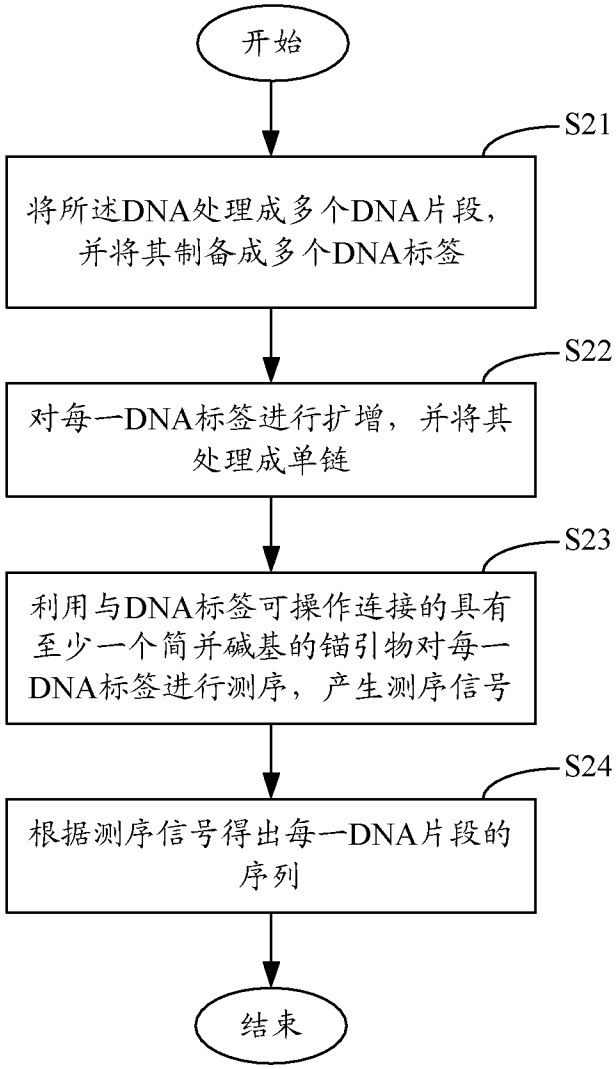

开始
S21
将所述DNA处理成多个DNA片段，并将其制备成多个DNA标签
S22
对每一DNA标签进行扩增，并将其处理成单链
S23
利用与DNA标签可操作连接的具有至少一个简并碱基的锚引物对每一DNA标签进行测序，产生测序信号
S24
根据测序信号得出每一DNA片段的序列
结束

图 2

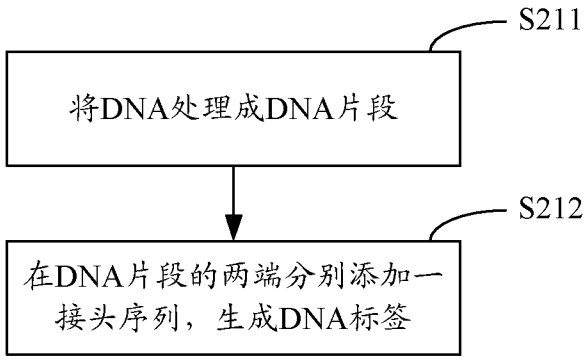

S211
将DNA处理成DNA片段
S212
在DNA片段的两端分别添加一接头序列，生成DNA标签

图 3

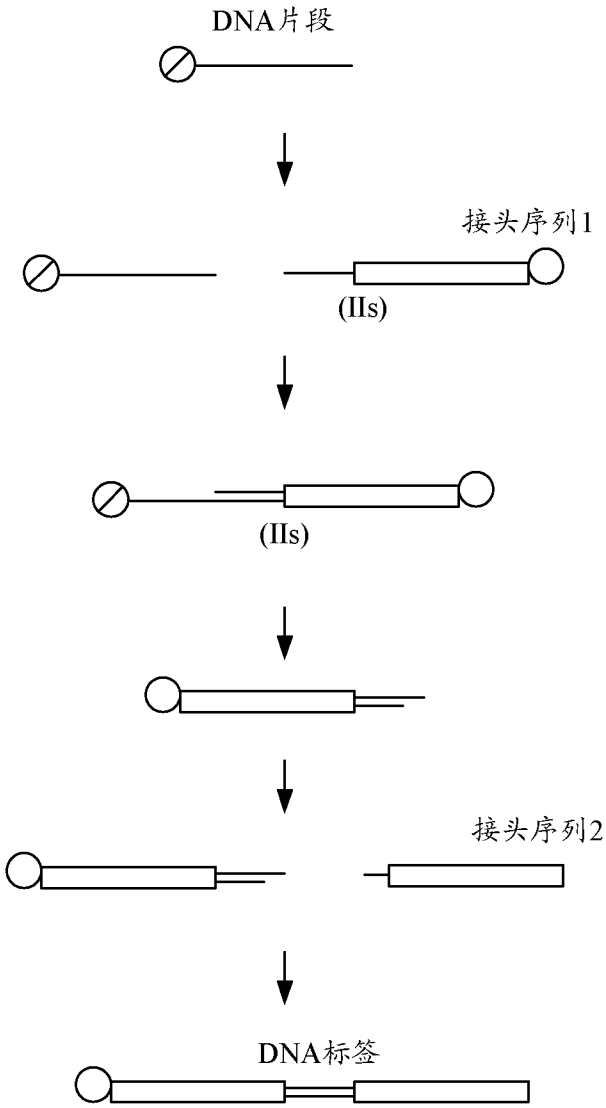

DNA片段
接头序列1
(IIs)
(IIs)
接头序列2
DNA标签

图 4

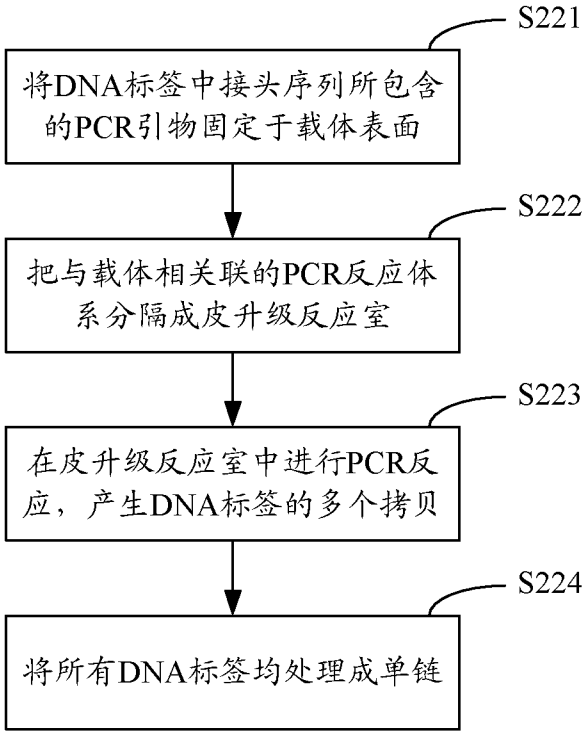

S221
将DNA标签中接头序列所包含的PCR引物固定于载体表面
S222
把与载体相关联的PCR反应体系分隔成皮升级反应室
S223
在皮升级反应室中进行PCR反应，产生DNA标签的多个拷贝
S224
将所有DNA标签均处理成单链

图 5

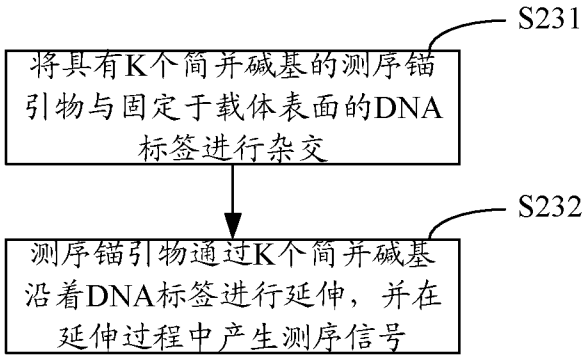

S231
将具有K个简并碱基的测序锚引物与固定于载体表面的DNA标签进行杂交
S232
测序锚引物通过K个简并碱基沿着DNA标签进行延伸，并在延伸过程中产生测序信号

图 6

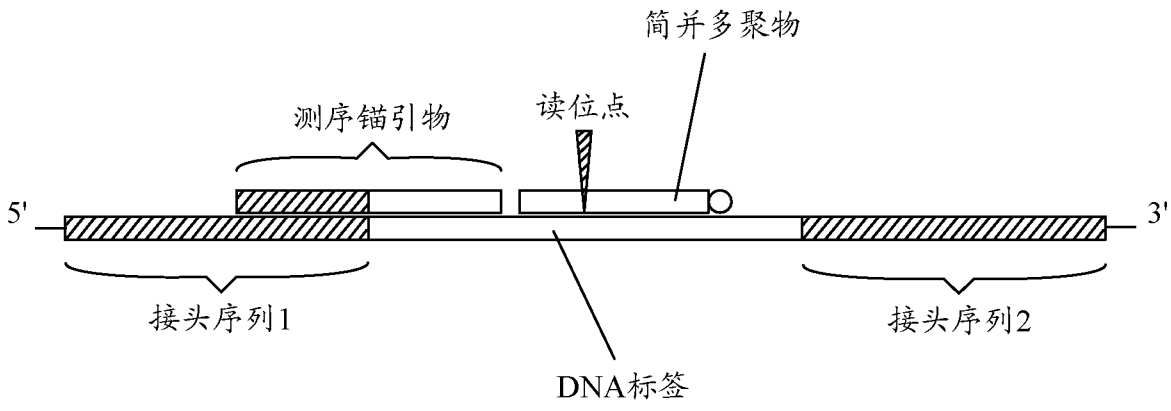

简并多聚物
测序锚引物
读位点
5'
3'
接头序列1
接头序列2
DNA标签

图 7

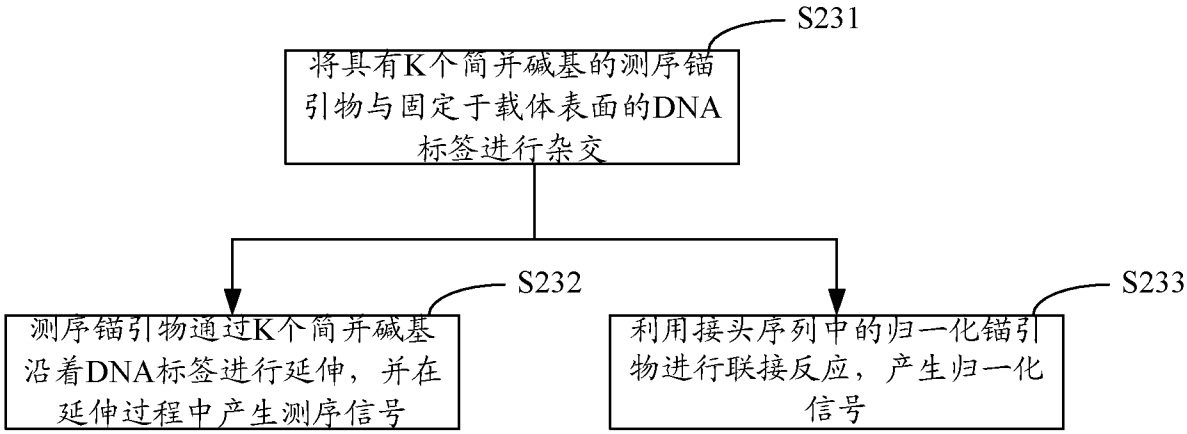

S231
将具有K个简并碱基的测序锚引物与固定于载体表面的DNA标签进行杂交
S232
测序锚引物通过K个简并碱基沿着DNA标签进行延伸，并在延伸过程中产生测序信号
S233
利用接头序列中的归一化锚引物进行联接反应，产生归一化信号

图 8

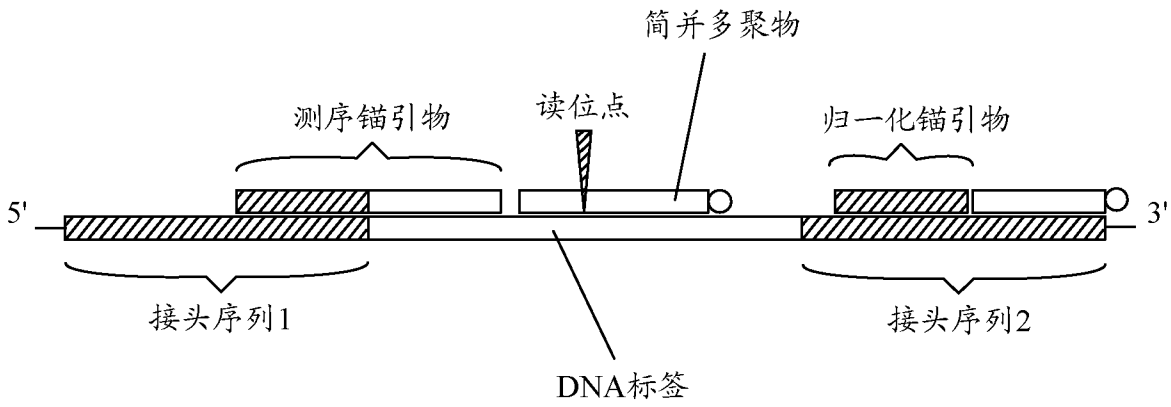

简并多聚物
测序锚引物
读位点
归一化锚引物
5'
3'
接头序列1
接头序列2
DNA标签

图 9

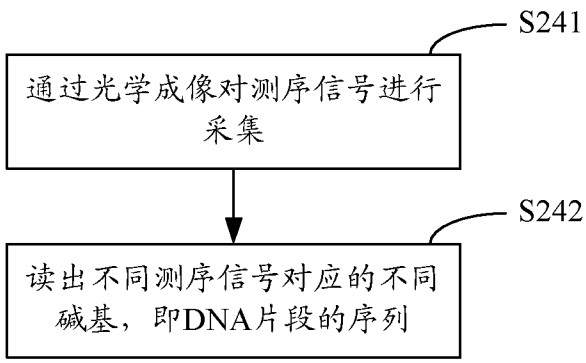

S241
通过光学成像对测序信号进行采集
S242
读出不同测序信号对应的不同碱基，即DNA片段的序列

图 10

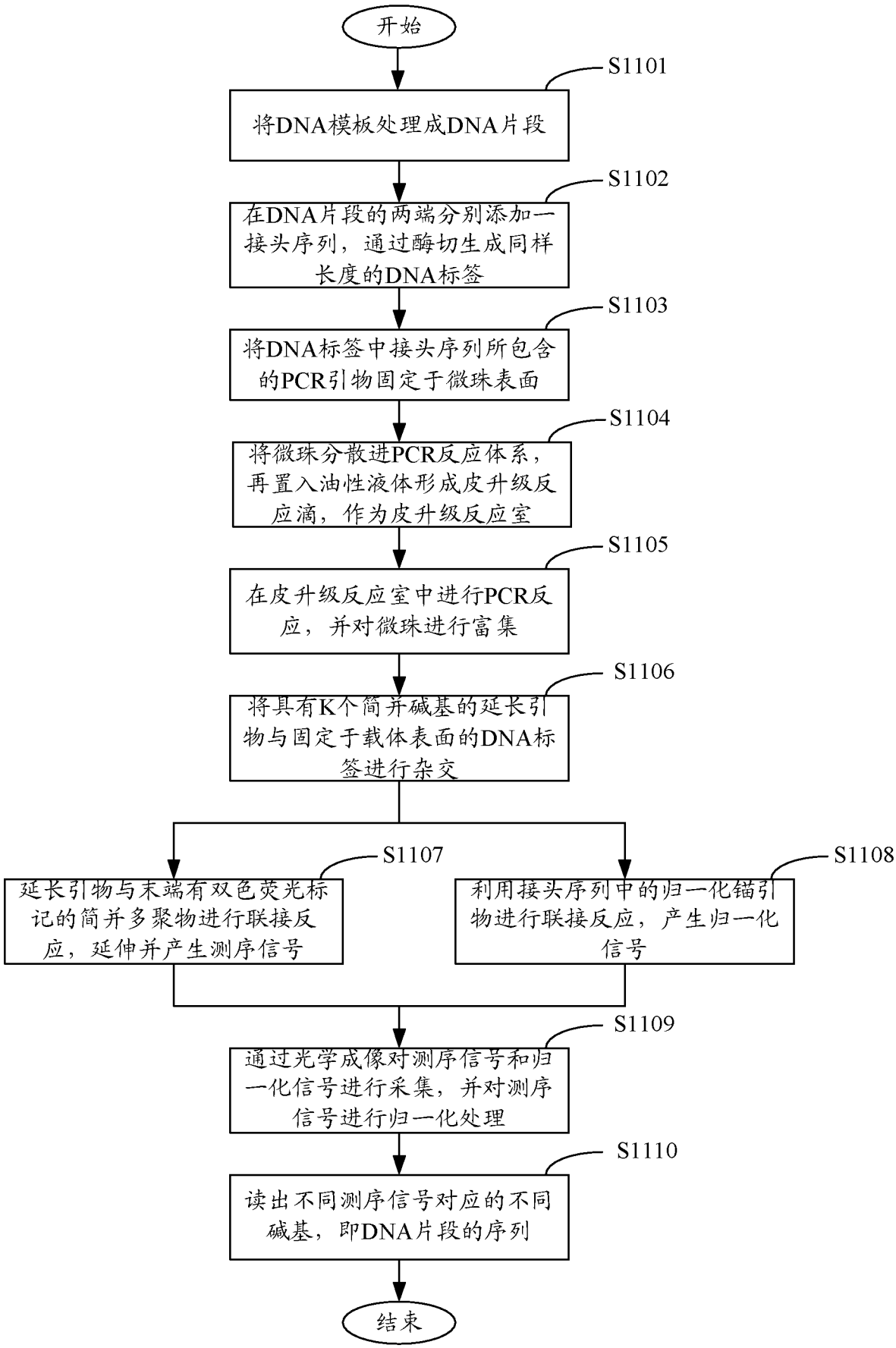

开始
S1101
将DNA模板处理成DNA片段
S1102
在DNA片段的两端分别添加一接头序列，通过酶切生成同样长度的DNA标签
S1103
将DNA标签中接头序列所包含的PCR引物固定于微珠表面
S1104
将微珠分散进PCR反应体系，再置入油性液体形成皮升级反应滴，作为皮升级反应室
S1105
在皮升级反应室中进行PCR反应，并对微珠进行富集
S1106
将具有K个简并碱基的延长引物与固定于载体表面的DNA标签进行杂交
S1107
延长引物与末端有双色荧光标记的简并多聚物进行联接反应，延伸并产生测序信号
S1108
利用接头序列中的归一化锚引物进行联接反应，产生归一化信号
S1109
通过光学成像对测序信号和归一化信号进行采集，并对测序信号进行归一化处理
S1110
读出不同测序信号对应的不同碱基，即DNA片段的序列
结束

图 11

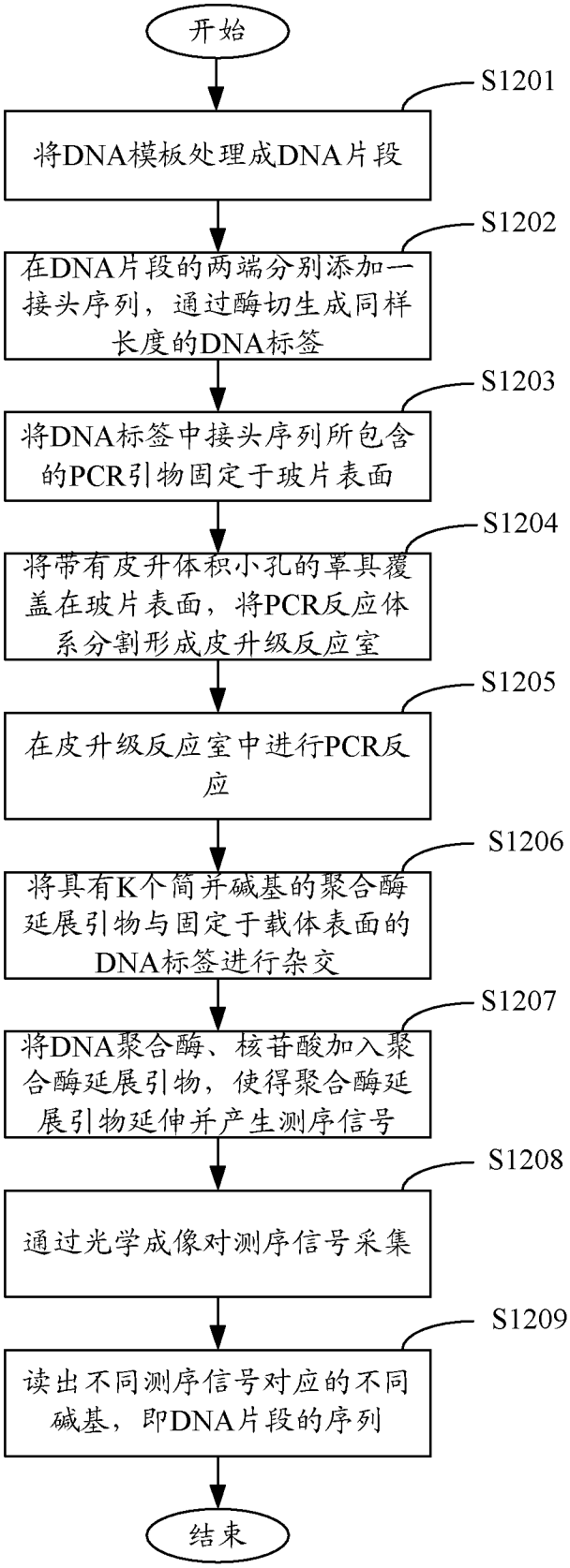

开始
S1201
将DNA模板处理成DNA片段
S1202
在DNA片段的两端分别添加一接头序列，通过酶切生成同样长度的DNA标签
S1203
将DNA标签中接头序列所包含的PCR引物固定于玻片表面
S1204
将带有皮升体积小孔的罩具覆盖在玻片表面，将PCR反应体系分割形成皮升级反应室
S1205
在皮升级反应室中进行PCR反应
S1206
将具有K个简并碱基的聚合酶延展引物与固定于载体表面的DNA标签进行杂交
S1207
将DNA聚合酶、核苷酸加入聚合酶延展引物，使得聚合酶延展引物延伸并产生测序信号
S1208
通过光学成像对测序信号采集
S1209
读出不同测序信号对应的不同碱基，即DNA片段的序列
结束

图 12

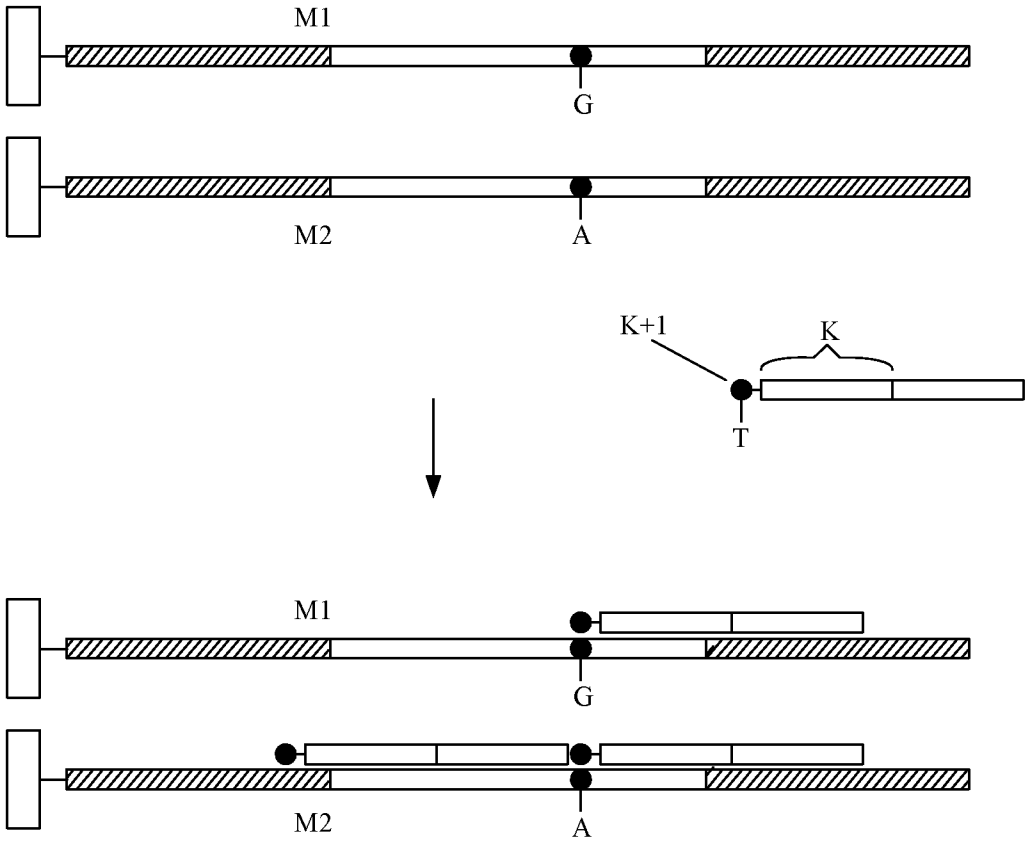


图 13

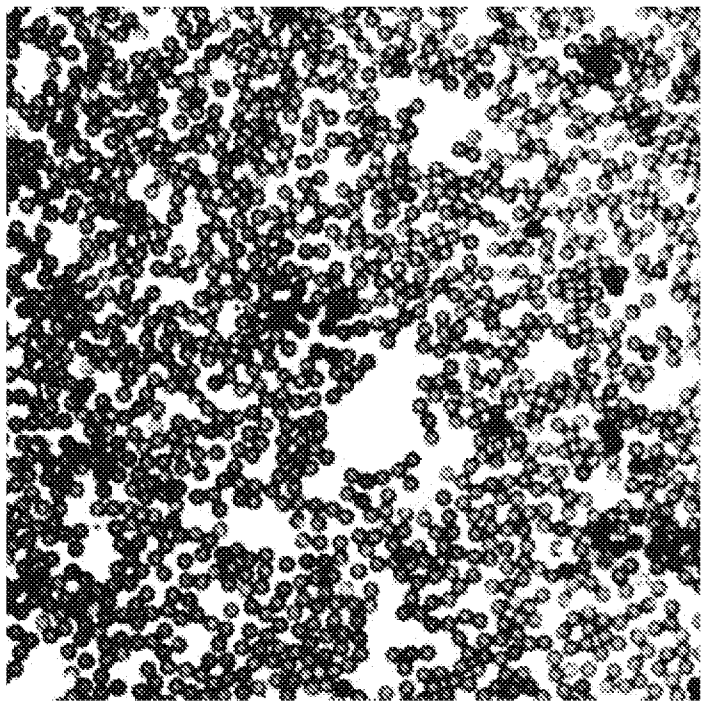


图 14

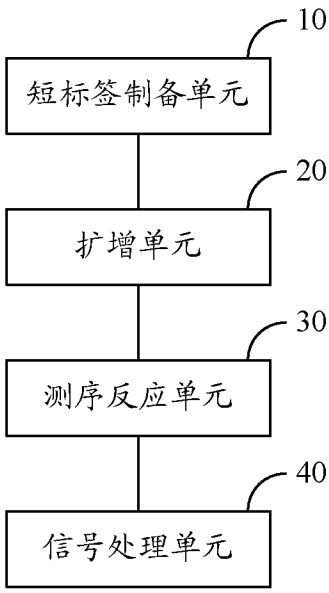

10
短标签制备单元
20
扩增单元
30
测序反应单元
40
信号处理单元

图 15

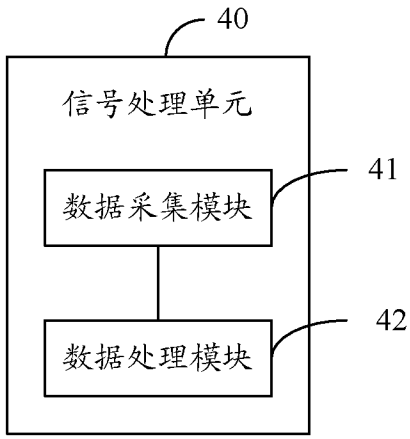

40
信号处理单元
41
数据采集模块
42
数据处理模块

图 16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2008/073092

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/68 (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)

IPC: C12Q1/68; EC: C12Q1/68E4; C12Q1/68A6

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)

WPI; EPODOC; PAJ; BIOSIS; CPRS; CNKI: MPSS，signature?, sequenc+,

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN101189345 A (AGENCOURT BIOSCIENCE CORP [US]]) 28 May 2008 (28.05.2008) see Figure 6	1-30
A	WO9713877 A1 (LYNX THERAPEUTICS INC [US]; ET AL) 17 April 1997 (17.04.1997) see the abstract	1-30
A	Brenner, S ET AL, "Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays". Nature Biotechnology, June 2000, vol.18, No.6, pages 630-634	1-30
A	Hene, L ET AL, "Deep analysis of cellular transcriptomes - LongSAGE versus classic MPSS". BMC Genomics, September 2007, vol. 8, No.333, pages 1-14	1-30

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

"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	Date of mailing of the international search report
10 Feb. 2009(10.02.2009)	**26 Feb. 2009 (26.02.2009)**
Name and mailing address of the ISA/CN The State Intellectual Property Office, the P.R.China 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088 Facsimile No. 86-10-62019451	Authorized officer ZHOU, Yang Telephone No. (86-10)62411041

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2007)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2008/073092

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN101189345 A	28.05.2008	CA2596496 A	10.08.2006
		AU2006210553 A	10.08.2006
		WO2006084132 A	10.08.2006
		EP1844162 A	17.10.2007
		KR20070112785 A	27.11.2007
		US2008003571 A	03.01.2008
		JP2008528040T T	31.07.2008
		EP2003214 A	17.12.2008
WO9713877 A1	17.04.1997	CA2202167 A	25.04.1996
		AU4277896 A	06.05.1996
		WO9641011 A	19.12.1996
		CA2222581 A	19.12.1996
		AU6102096 A	30.12.1996
		AU7717596 A	30.04.1997
		NO971644 A	02.06.1997
		FI971473 A	04.06.1997
		EP0793718 A	10.09.1997
		CZ9700866 A	17.09.1997
		NO975744 A	05.02.1998
		EP0832287 A	01.04.1998
		PL324000 A	27.04.1998
		CZ9703926 A	17.06.1998
		JP10507357T T	21.07.1998
		CN1193357 A	16.09.1998
		JP11507528T T	06.07.1999
		EP0931165 A	28.07.1999
		HU9900910 A	28.07.1999
		AU712929 B	18.11.1999
		AU718357 B	13.04.2000
		US6235475 B	22.05.2001
		US6280935 B	28.08.2001
		HK1015417 A	29.10.2004
		JP2006025801 A	02.02.2006
		DE69534930T T	11.01.2007
		DE69637285T T	10.07.2008

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2008/073092

A. 主题的分类

C12Q1/68 (2006.01) i

按照国际专利分类表(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: C12Q1/68; EC: C12Q1/68E4; C12Q1/68A6

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）)

WPI; EPODOC; PAJ; BIOSIS; CPRS; CNKI: 规模，平行，信号/标签，测序，MPSS，signature?, sequenc+,

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	CN101189345 A（AB 先进基因分析公司） 28. 5 月 2008（28.05.2008）参见图 6	1-30
A	WO9713877 A1 (LYNX THERAPEUTICS INC [US]; ET AL) 17.4 月 1997 (17.04.1997) 参见摘要	1-30
A	Brenner, S ET AL, “Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays”. Nature Biotechnology, 6 月 2000, 18 卷, 6 期, 第 630-634 页	1-30
A	Hene, L ET AL, “Deep analysis of cellular transcriptomes - LongSAGE versus classic MPSS”. BMC Genomics, 9 月 2007, 8 卷, 333 期, 第 1-14 页	1-30

☐ 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

“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	国际检索报告邮寄日期
10.2 月 2009 (10.02.2009)	**26.2 月 2009 (26.02.2009)**
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	受权官员 周洋 电话号码：(86-10) **62411041**

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2008/073092

检索报告中引用的专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN101189345 A	28.5 月 2008	CA2596496 A	10.8 月 2006
		AU2006210553 A	10.8 月 2006
		WO2006084132 A	10.8.月 2006
		EP1844162 A	17.10 月 2007
		KR20070112785 A	27.11 月 2007
		US2008003571 A	3.1 月 2008
		JP2008528040T T	31.7 月 2008
		EP2003214 A	17.12 月 2008
WO9713877 A1	17.4 月 1997	CA2202167 A	25.4 月 1996
		AU4277896 A	6.5 月 1996
		WO9641011 A	19.12 月 1996
		CA2222581 A	19.12 月 1996
		AU6102096 A	30.12 月 1996
		AU7717596 A	30.4 月 1997
		NO971644 A	2.6 月 1997
		FI971473 A	4.6 月 1997
		EP0793718 A	10.9 月 1997
		CZ9700866 A	17.9 月 1997
		NO975744 A	5.2 月 1998
		EP0832287 A	1.4 月 1998
		PL324000 A	27.4 月 1998
		CZ9703926 A	17.6 月 1998
		JP10507357T T	21.7 月 1998
		CN1193357 A	16.9 月 1998
		JP11507528T T	6.7 月 1999
		EP0931165 A	28.7 月 1999
		HU9900910 A	28.7 月 1999
		AU712929 B	18.11 月 1999
		AU718357 B	13.4 月 2000
		US6235475 B	22.5 月 2001
		US6280935 B	28.8 月 2001
		HK1015417 A	29.10 月 2004
		JP2006025801 A	2.2 月 2006
		DE69534930T T	11.1 月 2007
		DE69637285T T	10.7 月 2008