(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 13 日 (13.06.2024)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2024/119413 A1

(51) 国际专利分类号:
C12Q 1/68 (2018.01) *C40B 50/18* (2006.01)
C40B 50/06 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/137336

(22) 国际申请日: 2022 年 12 月 7 日 (07.12.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 深圳华大智造科技股份有限公司 (**MGI TECH CO., LTD.**) [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼及11栋2楼, Guangdong 518083 (CN)。

(72) 发明人: 杨晋 (**YANG, Jin**); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼及11栋2楼, Guangdong 518083 (CN)。 曹硕 (**CAO, Shuo**); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼及11栋2楼, Guangdong 518083 (CN)。 吴慧 (**WU, Hui**); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼及11栋2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及11栋2楼, Guangdong 518083 (CN)。

(74) 代理人: 北京知帆远景知识产权代理有限公司 (**ZHIFAN & PARTNERS**); 中国北京市海淀区阜成路73号裕惠大厦B座805, Beijing 100142 (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, 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))。
— 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(54) **Title:** ONE-STEP METHOD BASED PREPARATION METHOD FOR DOUBLE-NUCLEIC ACID NANOSPHERE

(54) 发明名称: 基于一步法的双核酸纳米球制备方法

(57) **Abstract:** Provided is a double-end cyclization primer which comprises a first nucleic acid single-stranded molecule and a second nucleic acid single-stranded molecule. The 5' end of the first nucleic acid single-stranded molecule is connected to the 5' end of the second nucleic acid single-stranded molecule by means of an adapter. The cyclization primer obtained by connecting the first nucleic acid single-stranded molecule to the second nucleic acid single-stranded molecule by means of the adapter can be complementarily paired with the sequences of the sense and antisense strand tail end adapter parts of a double-stranded nucleic acid template molecule at the same time; a cyclization reaction is carried out; after rolling circle amplification, a sense strand nucleic acid nanosphere and an antisense strand nucleic acid nanosphere can be obtained at the same time, and then the sense and antisense strands can be sequenced; multiple strand displacement amplification reactions are not needed, so that the steps of hybridization, unwinding, and template removal and the like can be omitted, thereby reducing the time for subsequent sequencing.

(57) 摘要: 提出了一种双端环化引物，包括第一核酸单链分子和第二核酸单链分子，第一核酸单链分子的5'端与第二核酸单链分子的5'端通过连接子相连。通过连接子将第一核酸单链分子和第二核酸单链分子连接在一起后所得到的环化引物可同时与双链核酸模板分子的正义链和反义链末端接头部分序列互补配对，进行环化反应，经滚环扩增后，可同时获得正义链核酸纳米球和反义链核酸纳米球，进而可对正义链和反义链进行测序，无需多重链置换扩增反应，能够省去杂交、解链、去掉模板等步骤，为后续的测序缩短了时间。

WO 2024/119413 A1

说 明 书

基于一步法的双核酸纳米球制备方法

技术领域

本发明涉及基因测序领域。具体地，本发明涉及一种基于一步法的双核酸纳米球制备方法。

背景技术

随着测序技术的发展和社会认知度的提高，高通量基因测序已广泛应用于科学研究、精准医学、社会卫生和公共安全等各个领域。近年来，大规模平行测序（MPS）的成本不断下降，2022 年上半年 Ultima Genomics 公司发布的 UG100 测序仪，号称可以实现 SE300 测序，每个 WGS（全基因组测序，100Gb 数据）的测序成本可降低到 100 美元；2022 年 9 月 30 号，美国 Illumina 公司发布了最新款的 NovaSeq X 系列测序仪，可实现 PE150 测序，测序成本可达到 200 美元 WGS。预期在未来 5 年内，主流 MPS 测序平台的测序成本将普遍进入 100 美元每个 WGS 的时代。随着测序成本降低到普通大众可以接受的水平，将显著促进高通量测序在传感染、肿瘤防治、新生儿疾病筛查等方面的应用。

发明内容

本发明旨在至少在一定程度上解决现有技术中存在的技术问题至少之一。

在 WGS 应用当中，双末端测序（Paired-end sequencing，简称为 PE 测序）是非常重要的测序技术手段，通过该技术，可以在短读长测序下，获得 DNA 链 5’和 3’末端的序列信息，因这两个末端的序列信息具有配对的特征，可以确认来自于同一条 DNA 链，对于基因组组装以及变异检测（如插入/缺失）等方面具有重要意义。同时，通过双末端测序，也可以实现一次测序即获取更多序列信息，有助于缩短测序时间，降低测序成本。

目前市面上的 MPS 测序仪产品中，主流的双末端测序技术包括以下几种：

1、Illumina 公司（如图 1 所示）：在完成单末端测序以后，对单末端测序链（记为 Read1）进行延伸；随后洗去测序链，以模板链与芯片表面的另一种引物（记为 P5’）结合，并从 P5’引物开始延伸获得模板链的互补链，再通过洗去模板链，只保留 P5’延伸链，以它作为双末端模板链，杂交引物后进行双末端测序（记为 Read2）。对于 Illumina 的双末端测序技术而言，其主要缺点是步骤较为复杂，涉及到杂交、延伸、解链、去掉模板链等多个步骤，

耗时较长；

2、华大智造（如图 2 所示）：在 DNB（DNA 纳米球）上完成单末端测序后，与模板链上的接头杂交引物，通过 MDA（多重置换扩增）反应，进行 Read1 的延伸，在一个 DNB 上，同时会有多个测序链向前延伸，在前一条测序链的 3’末端遇到后一条测序链的 5’端时，会将后一条测序链从 5’端开始，从模板链上置换下来。因 MDA 反应在不同的测序链上前进速度接近，因此虽然测序链的 5’端会被置换下来，但 3’端依然与模板链互补。MDA 反应结束后，测序链会“漂”在 DNB 的上方，此时可以杂交 Read2 的测序引物，从而完成双末端测序。对于华大智造的双末端测序技术而言，同样步骤较为复杂，涉及到引物杂交、延伸、链置换、末端封闭等步骤，耗时较长；同时 MDA 反应体系对温度较为敏感，对于试剂储存、运输和使用均提出了一定的要求。

当前主流技术都需要在 Read1 测序完成后，进行单独的双末端测序模板链合成的步骤。

以 DNA 纳米球为测序单元进行的双端测序一般包括以下几个步骤：（1）获得测序文库。（2）由文库制备 DNA 正义链纳米球。（3）杂交特异性引物进行 DNA 正义链测序。（4）通过多重链置换扩增反应获得 DNA 反义链。（5）杂交特异性引物进行 DNA 反义链测序。传统的双端测序方式需要通过多重链置换扩增反应获得 DNA 反义链后方能进行反义链测序，步骤繁琐耗时长。

本发明提供了一种 DNA 纳米球的制备方法，这种 DNA 纳米球同时包含有 DNA 正义链纳米球和 DNA 反义链纳米球，可直接进行正义链或反义链的测序而无需多重链置换扩增反应，获得双端测序的真实序列信息。

因此，在本发明的一个方面，本发明提出了一种双端环化引物。根据本发明的实施例，所述双端环化引物包括第一核酸单链分子和第二核酸单链分子，所述第一核酸单链分子的 5’端与第二核酸单链分子的 5’端通过连接子相连。通过连接子将第一核酸单链分子和第二核酸单链分子连接在一起后所得到的环化引物可同时与双链核酸模板分子的正义链和反义链末端接头部分序列互补配对，进行环化反应，经滚环扩增后，可同时获得核酸正义链纳米球和核酸反义链纳米球，进而可对正义链和反义链进行测序，无需再进行多重链置换扩增反应，能够省去杂交、解链、去掉模板等步骤，为后续的测序缩短了时间。

在本发明的另一个方面，本发明提出了一种制备前面所述的双端环化引物的方法。根据本发明的实施例，所述方法为将第一核酸单链分子和第二核酸单链分子进行连接反应，以便获得所述双端环化引物；其中，所述第一核酸单链分子的 5’端连接有第一修饰基团，所述第二核酸单链分子的 5’端连接有第二修饰基团，所述第一修饰基团与第二修饰基团适于发生连接反应；所述第一核酸单链分子的 3’端与第二核酸单链分子的 3’端不适于发生连

接反应；所述第一核酸单链分子和第二核酸单链分子之间不能互补配对。通过在第一核酸单链分子及第二核酸单链分子的 5’端连接修饰基团，能够使两条核酸单链连接起来，形成双端环化引物，该引物可同时与双链核酸模板分子的正义链和反义链末端接头部分序列互补配对，进行环化反应，经滚环扩增后，可同时获得核酸正义链纳米球和核酸反义链纳米球，进而可对正义链和反义链进行测序，无需再进行多重链置换扩增反应，能够省去杂交、解链、去掉模板等步骤，为后续的测序缩短了时间。

在本发明的又一个方面，本发明提出了一种获得环化核酸模板的方法。根据本发明的实施例，所述方法包括：将双端环化引物与双链核酸模板分子进行环化反应，所述双链核酸模板分子包括正义核酸模板链和反义核酸模板链，所述双端环化引物的两个 3’端分别与正义核酸模板链和反义核酸模板链的 5’端和 3’端的至少部分核酸序列互补配对，以便获得环化核酸模板，所述环化核酸模板具有正义核酸模板链环和反义核酸模板链环；其中，所述双端环化引物包括第一核酸单链分子和第二核酸单链分子，所述第一核酸单链分子的 5’端与第二核酸单链分子的 5’ 端通过连接子相连，如前面所限定的或根据前面所述的方法制备获得；所述双链核酸分子的两端连接有不同的接头。根据本发明实施例的环化核酸模板进行环化反应，经滚环扩增后，可同时获得核酸正义链纳米球和核酸反义链纳米球，进而可对正义链和反义链进行测序，无需再经过传统的多重链置换扩增反应，可以避免在多重链置换扩增反应过程中，因 Read1 测序累积损伤造成 Read2 模板链合成失败、效率低或者产生偏好性等问题。

在本发明的又一个方面，本发明提出了一种环化核酸分子，是通过前面所述的方法获得的。通过此方法获得的环化核酸分子，经滚环扩增后，可同时获得核酸正义链纳米球和核酸反义链纳米球，进而可对正义链和反义链进行测序，能够不经过传统的多重链置换扩增反应，可以避免在多重链置换扩增反应过程中，因 Read1 测序累积损伤造成 Read2 模板链合成失败、效率低或者产生偏好性等问题。

在本发明的又一个方面，本发明提出了一种环化核酸分子。根据本发明的实施例，所述环化核酸分子包括：前面所述的双端环化引物以及正义核酸模板链和反义核酸模板链，所述正义核酸模板链和所述反义核酸模板链反向互补，所述正义核酸模板链和所述反义核酸模板链的两端连接有接头序列，所述正义核酸模板链的 5’端和所述反义核酸模板链的 5’端的接头序列不同，所述正义核酸模板链的 3’端和所述反义核酸模板链的 3’端的接头序列不同；其中，所述双端环化引物的两个 3’端分别与正义核酸模板链或反义核酸模板链的 5’端和 3’端的至少部分核酸序列互补配对。所述环化核酸分子，经滚环扩增后，可同时获得核酸正义链纳米球和核酸反义链纳米球，进而可对正义链和反义链进行测序，能够不经过

传统的多重链置换扩增反应，可以避免在多重链置换扩增反应过程中，因 Read1 测序累积损伤造成 Read2 模板链合成失败、效率低或者产生偏好性等问题。

在本发明的又一个方面，本发明提出了一种核酸测序芯片。根据本发明的实施例，所述核酸测序芯片包括：多个核酸样本结合位点和多个固定于所述核酸样本结合位点的核酸分子复合物，其中，所述核酸分子复合物包含正义核酸模板链、反义核酸模板链和双端环化引物，所述双端环化引物与所述正义核酸模板链相连，所述双端环化引物与所述反义核酸模板链相连。所述核酸测序芯片可以任何顺序对正义链和反义链进行测序，可以不经过传统的多重链置换扩增反应，直接通过双端测序获得核酸双端序列信息，可以极大简化测序流程、降低测序时间和测序成本。

在本发明的又一个方面，本发明提出了一种制备双核酸纳米球的方法，根据本发明的实施例，所述方法包括：将前面所述的环化核酸分子进行滚环扩增处理，以便获得双核酸纳米球。通过此方法获得的双核酸纳米球同时具有核酸正义链纳米球和核酸反义链纳米球，可以不经过传统的多重链置换扩增反应，直接通过双端测序获得核酸双端序列信息，可以极大简化测序流程、降低测序时间和测序成本。

在本发明的又一个方面，本发明提出了一种双核酸纳米球。根据本发明的实施例，所述双核酸纳米球由前面所述的方法制备得到。所述双核酸纳米球同时包含有核酸正义链纳米球和核酸反义链纳米球，可直接进行正义链或反义链的测序而无需多重链置换扩增反应，获得双端测序的真实序列信息。

在本发明的又一个方面，本发明提出了一种核酸文库。根据本发明的实施例，所述核酸文库包括前面所述的双核酸纳米球。所述文库容量大，与待测核酸配对的成功率高。使用本发明构建的核酸文库，进而可同时对正义链和反义链进行测序，也可以根据需要调整测序顺序，分别测序。能够简单、高效地构建高通量测序文库，高效的利用测序板，提高了文库构建的成功率，降低了样品和试剂的损耗。

在本发明的又一个方面，本发明提出了一种基因测序方法。根据本发明的实施例，对前面所述的核酸文库进行测序处理。采用所述核酸文库进行测序，可同时对正义链和反义链进行测序，也可以分步对模板链进行测序，能够使测序的信息较完整，高效地捕获目的片段，获得精确的测序结果，对于片段较短的核酸模板链而言，在双末端测序的尾端产生序列重叠，可以通过互相校正，降低因测序累积导致的错误率。

本发明的附加方面和优点将在下面的描述中部分给出，部分将从下面的描述中变得明显，或通过本发明的实践了解到。

附图说明

本发明的上述和/或附加的方面和优点从结合下面附图对实施例的描述中将变得明显和容易理解，其中：

图 1 是根据本发明实施例的 Illumina 双末端测序技术示意图；

图 2 是根据本发明实施例的华大智造双末端测序技术示意图；

图 3 是根据本发明实施例的用于制备 DNA 纳米球的双链 DNA 分子，在以下实施例中称为特殊 DNA 文库（Dual splint dsDNA 文库）的构建过程图；

图 4 是根据本发明实施例的双端环化引物（Dual splint oligo）PAGE 纯化照胶图；

图 5 是根据本发明实施例的 DNA 纳米球的制备及加载原理图。

具体实施方式

在本发明的一个方面，本发明提出了一种双端环化引物。根据本发明的实施例，所述双端环化引物包括第一核酸单链分子和第二核酸单链分子，所述第一核酸单链分子的 5’端与第二核酸单链分子的 5’端通过连接子相连。通过连接子将第一核酸单链分子和第二核酸单链分子连接在一起后所得到的环化引物可同时与双链核酸模板分子的正义链和反义链末端接头部分序列互补配对，进行环化反应，经滚环扩增后，可获得核酸正义链纳米球和核酸反义链纳米球，进而可同时对正义链和反义链进行测序，无需多重链置换扩增反应，能够省去杂交、解链、去掉模板等步骤，为后续的测序缩短了时间。

根据本发明的实施例，所述第一核酸单链分子和第二核酸单链分子分别独立的选自 DNA 或 RNA 分子。

根据本发明的实施例，所述的双端环化引物的连接子包括选自-S-S-、-NH-、-C-S-C-的至少之一。在这些键能的作用下，使得两条核酸单链分子能够连接在一起。

需要说明的是，本申请所述“连接子”为“第一修饰基团”和“第二修饰基团”进行加成反应而产生的结构。其中，所述“第一修饰基团”和“第二修饰基团” 是指位于第一核酸单链分子和第二核酸单链分子的末端可以进行加成反应的分子，以此实现第一核酸单链分子和第二核酸单链分子之间的连接。因此并不局限于“-S-S-、-NH-、-C-S-C-”这三种连接子。

根据本发明的实施例，所述连接子通过支持物连接基团与固体支持物相连，所述支持物连接基团包括选自亲和素或链霉亲和素-生物素基团、氨基-NHS 酯或醛基或羟甲基膦或羧基基团、羟基-异氰酸盐基团、丙烯酰胺-硅烷基基团、叠氮-炔烃基团和巯基-马莱酰亚胺

或卤代乙酰基或硫代磺酸盐基团的至少之一。因此，能够同时将大量所述双端环化引物固定于固体支持物上，为之后与大量双链核酸模板分子同时进行环化反应，获得大量环化核酸模板奠定基础。

根据本发明的实施例，所述固体支持物包括选自：磁珠、凝胶珠、玻璃珠、玻片、纳米金颗粒、多聚物体和芯片的至少之一。

需要说明的是，在所述第一核酸单链分子与第一修饰基团（或所述第二核酸单链分子与第二修饰基团）之间引入不影响第一修饰基团与第二修饰基团连接的第三修饰基团，可以实现双端环化引物与固体支持物表面第四修饰基团的连接，所述固体支持物可以选自磁珠、凝胶珠、玻璃珠、多聚物体、玻片、芯片、纳米金颗粒等，所述双端环化引物与固相载体间的连接反应基团可以是亲和素/链霉亲和素-生物素、氨基-NHS 酯/醛基/羟甲基膦/羧基、羟基-异氰酸盐、丙烯酰胺-硅烷基，也可以是叠氮-炔烃、巯基-马莱酰亚胺/卤代乙酰基/硫代磺酸盐等。但需要注意的是，第一修饰基团与第二修饰基团之间的连接方式与第三修饰基团与第四修饰基团之间的连接方式不同，主要是为了避免第一核酸单链分子或第二核酸单链分子自身产生的连接，以及避免第一核酸单链分子与第二核酸单链分子发生多个位点的连接而失去与固相载体的连接能力。

需要说明的是，本申请所述第三修饰基团和第四修饰基团分别选自亲和素或链霉亲和素和生物素基团、氨基和 NHS 酯或醛基或羟甲基膦或羧基基团、羟基和异氰酸酯基团、丙烯酰胺和硅烷基基团、叠氮和炔烃基团、巯基和马莱酰亚胺或卤代乙酰基或硫代磺酸盐基团。

在本发明的另一个方面，本发明提出了一种制备前面所述的双端环化引物的方法。根据本发明的实施例，将第一核酸单链分子和第二核酸单链分子进行连接反应，以便获得所述双端环化引物；其中，所述第一核酸单链分子的 5’端连接有第一修饰基团，所述第二核酸单链分子的 5’端连接有第二修饰基团，所述第一修饰基团与第二修饰基团适于发生连接反应；所述第一核酸单链分子的 3’端与第二核酸单链分子的 3’端不适于发生连接反应；所述第一核酸单链分子和第二核酸单链分子之间不能互补配对。通过在第一核酸单链分子及第二核酸单链分子的 5’端连接修饰基团，能够使两条核酸单链连接起来，形成双端环化引物，该引物可同时与双链核酸模板分子的正义链和反义链末端接头部分序列互补配对，进行环化反应，经滚环扩增后，可同时获得核酸正义链纳米球和核酸反义链纳米球，进而可对正义链和反义链进行测序，无需多重链置换扩增反应，能够省去杂交、解链、去掉模板等步骤，为后续的测序缩短了时间。

需要说明的是，本申请中所述的“连接反应”为能使所述第一核酸单链分子和第二核酸

单链分子连接在一起的反应，即只要可以实现两条核酸单链分子 5’端的连接就可以，所述连接反应可以为偶联反应、亲和反应或其他化学反应。

根据本发明的实施例，所述制备前面所述的双端环化引物的方法还可以进一步包括如下附加技术特征至少之一：

根据本发明的实施例，所述第一修饰基团与第二修饰基团分别独立的选自化学分子或生物大分子；其中，所述化学小分子之间适于通过共价键结合，所述生物大分子之间适于进行连接反应。

根据本发明的实施例，所述第一修饰基团与第二修饰基团分别独立的选自二苄基环辛炔（DBCO）、叠氮化物（Azide）、马莱酰亚胺（Maleimide）和巯基（-SH）的至少之一。根据本发明实施例的上述修饰基团之间可在一定的条件下发生连接反应，使得第一核酸单链分子和第二核酸单链分子的 5’端连接在一起。

需要说明的是，本申请所述叠氮化物（Azido）与二苯并环辛炔（DBCO）的加成反应属于应变促进叠氮-炔烃的环化加成反应(strain-promoted azide-alkyne cycloaddition, SPAAC)，利用环化加成反应成为环辛炔（例如 OCT、BCN、DBCO、DIBO 和 DIFO）释放的焓形成稳定的三唑，反应高效且无需催化物。除此之外，本申请也可使用其他通过化学共价键结合两个或多个分子或生物大分子的生物偶联体系，如含氨基的分子与 NHS 酯化合物形成胺键进行偶联、含巯基的分子与马莱酰亚胺化合物形成硫醚键进行偶联等。

根据本发明的实施例，所述第一修饰基团与第二修饰基团分别为二苄基环辛炔（DBCO）和叠氮化物（Azide），所述连接反应是在温度为 37℃、溶剂为 PBS、pH 为 7.4 的条件下进行 48 小时。其中，二苄基环辛炔（DBCO）和叠氮化物（Azide）的无铜点击化学反应是一种环张力促进的叠氮-炔基环加成反应，不需要使用有毒的铜离子作为催化剂，反应高效且快速。

根据本发明的实施例，所述溶剂进一步包括 DMSO。其中，DMSO 有助于修饰基团之间的连接反应。

根据本发明的实施例，所述 DMSO 在连接反应体系中的体积分数为 10%。加入此体积的 DMSO 能够使修饰基团之间的连接更加充分。

根据本发明的实施例，所述方法进一步包括所述双端环化引物通过第三修饰基团和第四修饰基团与固体支持物相连，所述第三修饰基团与第一修饰基团和第二修饰基团相连，所述第四修饰基团与所述固体支持物相连。因此，能够同时将大量所述双端环化引物固定于固体支持物上，为之后与大量双链核酸模板分子同时进行环化反应，获得大量环化核酸模板奠定基础。

根据本发明的实施例，所述第三修饰基团和第四修饰基团之间适于形成如下支持物连接基团的至少之一：亲和素或链霉亲和素-生物素基团、氨基-NHS 酯或醛基或羟甲基膦或羧基基团、羟基-异氰酸盐基团、丙烯酰胺-硅烷基基团、叠氮-炔烃基团和巯基-马莱酰亚胺或卤代乙酰基或硫代磺酸盐基团。当所述第三修饰基团和第四修饰基团之间形成所述的支持物连接基团时，能够使双端环化引物更好的固定于固体支持物上。

根据本发明的实施例，所述固体支持物包括选自磁珠、凝胶珠、玻璃珠、玻片、纳米金颗粒、多聚物体或和芯片的至少之一。

在本发明的又一个方面，本发明提出了一种获得环化核酸模板的方法。根据本发明的实施例，所述方法包括：将双端环化引物与双链核酸模板分子进行环化反应，所述双链核酸模板分子包括正义核酸模板链和反义核酸模板链，所述双端环化引物的两个 3’端分别与正义核酸模板链和反义核酸模板链的 5’端和 3’端的至少部分核酸序列互补配对，以便获得环化核酸模板，所述环化核酸模板具有正义核酸模板链环和反义核酸模板链环；其中，所述双端环化引物包括第一核酸单链分子和第二核酸单链分子，所述第一核酸单链分子的 5’端与第二核酸单链分子的 5’端通过连接子相连；所述双端环化引物如前面所限定或根据前面所述的方法制备获得；所述双链核酸模板分子的两端连接有不同的接头。根据本发明实施例的环化核酸模板进行环化反应，经滚环扩增后，可同时获得核酸正义链纳米球和核酸反义链纳米球，进而可对正义链和反义链进行测序，无需经过传统的多重链置换扩增反应，可以避免在多重链置换扩增反应过程中，因 Read1 测序累积损伤造成 Read2 模板链合成失败、效率低或者产生偏好性等问题。

根据本发明的实施例，所述获得环化核酸模板的方法还可以进一步包括如下附加技术特征至少之一：

根据本发明的实施例，所述双端环化引物包括第一游离 3’端和第二游离 3’端，所述第一游离 3’端与正义核酸链 5’端和 3’端的接头的至少部分互补配对，所述第二游离 3’端与反义核酸链 5’端和 3’端的接头的至少部分互补配对；或所述第二游离 3’端与正义核酸链 5’端和 3’端的接头的至少部分互补配对，所述第一游离 3’端与反义核酸链 5’端和 3’端的接头的至少部分互补配对。因此，正义核酸链与反义核酸链能够通过与双端环化引物互补配对，从而正义核酸链与反义核酸链各自成环。

根据本发明的实施例，所述双链核酸模板分子的两端连接有接头，所述正义核酸模板链的 5’端与所述反义核酸模板链的 5’端所连接接头的序列不同。因此，能够使所述正义核酸模板链的 5’端与所述反义核酸模板链的 5’端分别与双端环化引物的两个游离 3’端结合，连接成环。

根据本发明的实施例，所述双链核酸模板分子的 5’端具有游离磷酸基团，所述双链核酸模板分子的 3’端具有游离羟基基团。

需要说明的是，所述“游离磷酸基团”或“游离羟基基团”中的游离是指所述磷酸基团或羟基基团连接在所述双链核酸模板分子的 5’端或 3’端末端，而不再与其他核苷酸分子或基团相连。

根据本发明的实施例，进一步包括：对所述环化核酸模板进行滚环扩增反应，获得同时具有多个拷贝的正义链和反义链的核酸分子。

根据本发明的实施例，进行所述滚环扩增反应之前，将所述环化核酸模板加载在测序芯片上；将加载在所述测序芯片上的环化核酸模板进行所述滚环扩增反应，获得同时具有多个拷贝的正义链和反义链的核酸分子。所述核酸分子可对正义链和反义链进行测序，无需经过传统的多重链置换扩增反应，可以避免在多重链置换扩增反应过程中，因 Read1 测序累积损伤造成 Read2 模板链合成失败、效率低或者产生偏好性等问题。

根据本发明的实施例，所述双链核酸模板分子是通过如下方式制备获得：将核酸双链模板进行 3’末端加 A 处理，所述核酸双链模板有且仅有一个 5’末端具有游离磷酸基团，其余末端具有游离羟基基团；将 3’末端加 A 处理产物与第一接头进行第一连接处理；将第一连接处理产物进行第一 5’末端磷酸化处理；将第一 5’末端磷酸化处理产物与第二接头进行第二连接处理；以及将第二连接处理产物进行第二 5’末端磷酸化处理，以便获得所述双链核酸模板分子。根据本发明实施例的方法可以在双链核酸模板分子的两端分别加上不同的接头，且所获得的双链核酸模板分子解链后所获得的两条单链可以特异性的进行杂交。

需要说明的是，在所述“第二连接处理”中，需要补全在第一连接处理过程中所造成的缺口。在第一连接处理时，仅使一个（因为仅有一个）5’-P 与相邻的 3’-OH 连接形成磷酸二酯键，同端另一边的 5'-OH 与 3'-OH 无法连接而导致缺口出现。在第二连接处理时，在 5’末端磷酸化处理后，缺口处的 5’-OH 转变为 5’-P，并在之后的连接酶作用下与 3’-OH 进行连接形成另一个磷酸二酯键，此谓补全。

根据本发明的实施例，所述 3’末端加 A 处理是在 Taq 聚合酶存在、温度为 72℃的条件下进行 20min。

根据本发明的实施例，所述 3’末端加 A 处理是在 Taq 聚合酶存在的条件下进行 PCR 反应。

根据本发明的实施例，所述 PCR 反应的扩增轮数不多于 8。通过控制 PCR 的扩增轮数能够减少突变产生。

根据本发明的实施例，所述第一连接处理和第二连接处理是在 T4 核酸连接酶的作用

下进行的。采用 T4 核酸连接酶能够高效的催化平端双链核酸模板分子的 5’-P 末端和 3’-OH 末端之间以磷酸二酯键结合，进而将接头与所述核酸双链模板的 5’端相连。

根据本发明的实施例，所述第一 5’末端磷酸化处理和第二 5’末端磷酸化处理是在多聚磷酸激酶的作用下进行的。采用多聚磷酸酶能够在第一和第二 5’的末端引入磷酸基团。

根据本发明的实施例，3’末端加 A 处理之后，第一连接处理之前进一步包括将 3’末端加 A 处理产物进行第一纯化处理。

根据本发明的实施例，第一连接处理之后，第一 5’末端磷酸化处理之前进一步包括第一连接处理产物进行第二纯化处理。

根据本发明的实施例，第一 5’末端磷酸化处理之后，第二连接处理之前进一步包括第一 5’末端磷酸化处理产物进行第三纯化处理。

根据本发明的实施例，所述第一纯化处理、第二纯化处理以及第三纯化处理分别独立地选自磁珠纯化。通过采用此纯化方式，能够减少纯化时间，使纯化之后的第一纯化处理产物、第二纯化处理产物以及第三纯化处理产物效率高，不会造成核酸机械损伤，而且重复性极好。

根据本发明的实施例，在所述第一纯化处理、第二纯化处理以及第三纯化处理中，如在 200μl PCR 管中反应为例，待纯化核酸的投入量不低于 1500 ng，洗脱液体积不高于 50μl。进而可有效提高核酸的浓度。根据本发明的实施例，所述第一接头和第二接头预先进行预退火处理。进而所述第一接头和第二接头以双链的形式与所述核酸双链模板的两端相连。

根据本发明的实施例，所述双端环化引物预先经过预纯化处理。

根据本发明的实施例，所述预纯化处理是通过尿素聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱进行的。

根据本发明的实施例，退火处理之后进一步包括将退火处理产物进行第三连接处理，进而所述正义核酸模板链和反义核酸模板链各自连接成环，以便获得所述环化核酸模板分子。

需要说明的是，所述“第三连接处理”是指所述正义核酸模板链的 5’端与 3’端相连与所述反义核酸模板链的 5’端与 3’端相连。

根据本发明的实施例，所述第三连接处理是在 T4 核酸连接酶的作用下进行的。采用 T4 核酸连接酶能够高效的催化平端核酸的 5’-P 末端和 3’-OH 末端之间以磷酸二酯键结合，进而将正义核酸模板链的 5’端与 3’端相连，反义核酸模板链的 5’端与 3’端相连。

根据本发明的实施例，所述双链核酸模板分子是通过如下方式制备获得：将核酸双链模板进行末端修复和加 A 处理，处理产物与两种接头进行连接处理，以便获得所述双链核

酸模板分子。根据本发明实施例的方法可以在双链核酸模板分子的两端分别加上不同的接头，且所获得的双链核酸模板分子解链后所获得的两条单链可以特异性的进行杂交。

根据本发明的实施例，所述接头为部分互补的双链接头，两种接头的非连接端核酸序列互不相同。

根据本发明的实施例，所述双端环化引物是固定在固体支持物、高分子多聚物或芯片上的，使双端环化引物与双链核酸模板分子接触，在连接酶存在的情况下进行杂交连接环化反应。因此，能够使大量的双链核酸模板分子与所述双端环化引物结合，使所形成的大量的环化核酸模板同时固定于固体支持物、高分子多聚物或芯片上，为后续同时测序获得大量核酸双端序列信息奠定基础。

在本发明的又一个方面，本发明提出了一种环化核酸分子，是通过前面所述的方法获得的。通过此方法获得的环化核酸分子，经滚环扩增后，可获得核酸正义链纳米球和核酸反义链纳米球，进而可同时对正义链和反义链进行测序，能够不经过传统的多重链置换扩增反应，可以避免在多重链置换扩增反应过程中，因 Read1 测序累积损伤造成 Read2 模板链合成失败、效率低或者产生偏好性等。

在本发明的又一个方面，本发明提出了一种环化核酸分子。根据本发明的实施例，所述环化核酸分子包括：包括：前面所述的双端环化引物以及正义核酸模板链和反义核酸模板链，所述正义核酸模板链和所述反义核酸模板链反向互补，所述正义核酸模板链和所述反义核酸模板链的两端连接有接头序列，所述正义核酸模板链的 5’端和所述反义核酸模板链的 5’ 端的接头序列不同，所述正义核酸模板链的 3’端和所述反义核酸模板链的 3’端的接头序列不同；其中，所述双端环化引物的两个 3’端分别与正义核酸模板链或反义核酸模板链的 5’端和 3’端的至少部分核酸序列互补配对。所述环化核酸分子经滚环扩增后，可同时获得核酸正义链纳米球和核酸反义链纳米球，进而可对正义链和反义链进行测序，能够不经过传统的多重链置换扩增反应，可以避免在多重链置换扩增反应过程中，因 Read1 测序累积损伤造成 Read2 模板链合成失败、效率低或者产生偏好性等问题。

根据本发明的实施例，所述双端环化引物以及正义核酸模板链和反义核酸模板链是固定在固体支持物、多聚物或游离在溶液中。

根据本发明的实施例，所述固体支持物包括选自磁珠、凝胶珠、玻璃珠、玻片、纳米金颗粒和芯片的至少之一。

在本发明的又一个方面，本发明提出了一种核酸测序芯片。根据本发明的实施例，所述核酸测序芯片包括：多个核酸样本结合位点和多个固定于所述核酸样本结合位点的核酸分子复合物，其中，所述核酸分子复合物包含正义核酸模板链、反义核酸模板链和双端环

化引物，所述双端环化引物与所述正义核酸模板链相连，所述双端环化引物与所述反义核酸模板链相连。所述核酸测序芯片可同时对正义链和反义链进行测序，可以不经过传统的多重链置换扩增反应，直接通过双端测序获得核酸双端序列信息，可以极大简化测序流程、降低测序时间和测序成本。

根据本发明的实施例，所述正义核酸模板链和所述反义核酸模板链为单链环状结构，所述双端环化引物的两个 3’端分别与正义核酸模板链或反义核酸模板链的 5’端和 3’端的至少部分核酸序列互补配对。

根据本发明的实施例，所述核酸分子复合物包括多个正义核酸链拷贝和多个反义核酸链拷贝。进而可直接进行正义链和反义链的测序而无需多重链置换扩增反应，获得双端测序的真实序列信息。

根据本发明的实施例，所述多个正义核酸链拷贝和多个反义核酸链拷贝是通过将所述正义核酸模板链、反义核酸模板链进行滚环扩增处理后获得的。

需要说明的是，“核酸分子复合物”可以包括正义核酸模板链和反义核酸模板链，也可以包括正义核酸模板链和反义核酸模板链经滚环扩增后的多个正义核酸链拷贝和多个反义核酸链拷贝。其中当“核酸分子复合物”包括经正义核酸模板链和反义核酸模板链经滚环扩增后形成的多个正义核酸链拷贝和多个反义核酸链拷贝时，此时的“核酸分子复合物”与 “双核酸纳米球”具有相同的结构；本申请所述的“多个正义核酸链拷贝”与“核酸正义链纳米球”、“ 多个反义核酸链拷贝”与“核酸反义链纳米球”具有相同的结构。

根据本发明的实施例，所述正义核酸模板链和所述反义核酸模板链的两端连接有接头序列，所述正义核酸模板链的 5’端和所述反义核酸模板链的 5’端的接头序列不同，所述正义核酸模板链的 3’端和所述反义核酸模板链的 3’端的接头序列不同。因此，能够使所述正义核酸模板链的 5’端与所述反义核酸模板链的 5’端分别与双端环化引物的两个游离 3’端结合，连接成环。

根据本发明的实施例，所述正义核酸模板链和所述反义核酸模板链的一端或两端进一步包括标签序列，或者样本标签序列和分子标签序列等可以区分样本来源的标签信息和统计核酸分子数量的分子标签信息等。

根据本发明的实施例，当所述生物样本为 RNA 时，需要进行逆转录反应加接头或扩增建库步骤。

根据本发明的实施例，所述正义核酸模板链和所述反义核酸模板链的两端的接头序列是通过 PCR 扩增反应引入的。具体的，利用带有特异性序列和通用序列的引物对或引物组针对核酸样本的目标区域进行扩增反应，获得两端带有接头序列的双链核酸片段。

在本发明的又一个方面，本发明提出了一种制备双核酸纳米球的方法，根据本发明的实施例，所述方法包括：将前面所述的环化核酸分子进行滚环扩增处理，以便获得双核酸纳米球。通过此方法获得的双核酸纳米球同时具有核酸正义链纳米球和核酸反义链纳米球，可以不经过传统的多重链置换扩增反应，直接通过双端测序获得核酸双端序列信息，可以极大简化测序流程、降低测序时间和测序成本。

根据本发明的实施例，所述滚环扩增处理是在 DNB 酶 I MIX 和 DNB 酶 II 的作用下、温度为 30℃的条件下进行 40 min。

需要说明的是，本申请所述的“DNB 酶 I MIX”为 Make DNB enzyme MIX Ⅰ及 Make DNB enzyme Ⅱ，两者均来自于华大智造的产品，是 MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装（FCL PE100）中的组分。

在本发明的又一个方面，本发明提出了一种双核酸纳米球。根据本发明的实施例，所述双核酸纳米球由前面所述的方法制备得到。所述双核酸纳米球同时包含有核酸正义链纳米球和核酸反义链纳米球，可直接进行正义链或反义链的测序而无需多重链置换扩增反应，获得双端测序的真实序列信息。

根据本发明的实施例，所述双核酸纳米球包含核酸正义链纳米球和核酸反义链纳米球。

在本发明的又一个方面，本发明提出了一种核酸文库。根据本发明的实施例，所述核酸文库包括前面所述的双核酸纳米球。所述文库容量大，与待测核酸配对的成功率高。使用本发明构建的核酸文库，进而可同时对正义链和反义链进行测序，能够简单、高效地构建高通量测序文库，高效的利用测序板，提高了文库构建的成功率，降低了样品和试剂的损耗。

在本发明的又一个方面，本发明提出了一种基因测序方法。根据本发明的实施例，对前面所述的核酸文库进行测序处理。采用所述核酸文库进行测序，可同时对正义链和反义链进行测序，能够使测序的信息较完整，高效地捕获目的片段，获得精确的测序结果，对于片段较短的核酸模板链而言，在双末端测序的尾端产生序列重叠，可以通过互相校正，降低因测序累积导致的错误率。

根据本发明的实施例，所述测序是在 MGI-SEQ2000 平台上进行的。

根据本发明的实施例，本发明的技术优势具有以下几个方面：

（1）本发明提供了一种制备双链核酸模板分子的方法，这种方法可以在双链核酸模板分子的两端分别加上不同的各类接头，且文库解链后的两条单链可以特异性的进行杂交。

（2）本发明提供了一种由双链核酸模板分子和双端环化引物组合，进行滚环扩增，并获得双核酸纳米球，进行单末端或者双末端测序的方法。

（3）本发明提供了一种制备双端环化引物的方法，可以通过具有相互反应能力的生物化学分子将不同引物的 5’端或 3’端进行任意连接，获得正向或反向的新引物。

（4）本发明制备的双链核酸模板分子的正义核酸模板链和反义核酸模板链可以分别以末端连接的方式封闭成环，获得环状文库，因此本方法可以用于环状文库的制备。

（5）本发明提供的双链核酸模板分子制备方法可以对任意的接头进行连接，使双链两端获得不同类型的接头以满足测序需要。

（6）本发明在基于一步法制备双核酸纳米球的过程中，也可在环化后直接进行消化，获得正义链和反义链环状文库，其后再使用可同时与正义链及反义链环状文库互补配对的引物进行抓取，随后进行滚环扩增反应。

（7）本发明中连接引物的方法可以应用于任意多种引物，实现多条多种不同引物的连接。

下面详细描述本发明的实施例。下面描述的实施例是示例性的，仅用于解释本发明，而不能理解为对本发明的限制。实施例中未注明具体技术或条件的，按照本领域内的文献所描述的技术或条件或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市购获得的常规产品。

为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白，以下结合实施例，对本发明进行进一步详细说明。应当理解，此处所描述的具体实施例仅用以解释本发明，并不用于限定本发明。对于本领域的技术人员来说，本发明可以有各种更改和变化，DNA 纳米球制备中所涉及的各流程、各种反应试剂和反应条件可以根据需要进行调整和改变。因此对于本领域技术人员来说，在不脱离本发明的构思和原则之内，还可做出若干简单替换，这些均应包含在本发明的保护范围之内。

实施例中构建 DNA 纳米球使用的各引物均由生工生物工程有限股份公司合成，各引物序列结构如表 1 所示：

表 1

引物	序列
引物 PCR-F (20 μM)	5'phos-GAACGACATGGCTACGA-3'
引物 PCR-R (20 μM)	5'-TGTGAGCCAAGGAGTTG-3'
splint adapter 1-1	5'-CTAAGGCTTAGCGCTAGGCTCTCGACAGCTATGCGTG-3’
splint adapter 1-2	5'-GCTTAGCGCACATCGAGAGCCTAGCGCTAAGCCTTAGT-3'
splint adapter 2-1	5'-GTGACGCTGAAGTCGAGAGCCTAGCGCTAAGCCTTAGT-3'
splint adapter 2-2	5'phos-CTAAGGCTTAGCGCTAGGCTCTCGAGGATCAGACTCG-3'

DBCO splint oligo	5'DBCO-TTAAC/iSp18/CTTCAGCGTCACCACGCATAGCTG-3'（iSp18 代表中间修饰为 PEG18 间臂）
Azide splint oligo	5'Azide-TTAAC/iSp18/TGTGCGCTAAGCCGAGTCTGATCC-3'（iSp18 代表中间修饰为 PEG18 间臂）

实施例中使用的 Ad Lig buffer（连接反应缓冲液）、Ad ligase（T4 DNA 连接酶）及 Ligation Enhancer（连接增强液）均来自华大智造 MGIEasy 酶切 PCR-Free DNA 文库制备试剂盒，磁珠纯化试剂来自于华大智造 MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒，T4 PNK（Cat#1000007884）、T4 DNA Ligase（Cat#1000007877）、10*ligation buffer（Cat#1000007874）、10*phi29 buffer（Cat#1000004657）、rTaq PCR ReadyMix(2x)（Cat#1000004656）、rTaq DNA Polymerase（Cat#1000004443）均采购自华大智造。

使用 MGISEQ-2000 测序仪进行测序时，测序仪及手持 loader 等设备均由武汉华大智造生产并提供，使用到的测序载片、测序引物、测序试剂、Make DNB enzyme MIX Ⅰ及 Make DNB enzyme Ⅱ、stop run buffer 均来自 MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装（FCL PE100）（Cat#1000012554）。V3 PCR 产物试剂由武汉华大智造生产并提供。

实施例 1

制备特殊双链 DNA 文库（Dual splint dsDNA 文库）/双链核酸模板分子，如图 3 所示：

（1）以 V3 PCR 产物（华大智造，V3 PCR 产物试剂 E.coli）为模板，以表 2 为条件配制反应体系，使用 Taq 酶以 PCR 的方式进行末端加 A 反应。

表 2

rTaq PCR ReadyMix(2x)	25 μL
V3 PCR产物 E.coli	1 μL
引物PCR-F (20 μM)	3 μL
引物PCR-R (20 μM)	3 μL
rTaq DNA Polymerase	2 μL
ddH_2O	16 μL

在 PCR 仪上，以表 3 为条件进行扩增，获得 3’末端加 A 产物。

表 3

温度	时间	循环数
95℃	3 min	1
97℃	30 sec	7
48℃	1 min	
72℃	1 min	
72℃	20 min	1
4℃	hold	

使用 1 倍体积的磁珠（MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒）对产物进行纯化，将纯化所得产物命名为 dA-tailed dsDNA。并用 Qubit 1X dsDNA HS 检测试剂盒（ThermoFisher

Cat#Q33230）在 Qubit 4 Fluorometer（ThermoFisher，Cat#Q33230）上测定 DNA 浓度。

（2）以表 4 为条件配制反应体系，反应条件为：95℃ 3min，其后每 2 min 降低 1℃缓慢降低温度至 25℃，置于 4℃保存。获得 Y 型环化接头 1，命名为 splint adapter 1。

表 4

splint adapter 1-1 (100 μM)	20 μL
splint adapter 1-2 (100 μM)	20 μL
10*引物退火buffer (50 mM NaCl，100 mM Tris-HCl pH 8.0)	10 μL

以表 5 为条件配制反应体系，反应条件为：95℃ 3min，其后每 2 min 降低 1℃缓慢降低温度至 25℃，置于 4℃保存。获得 Y 型环化接头 2，命名为 splint adapter 2。

表 5

splint adapter 2-1 (100 μM)	20 μL
splint adapter 2-2 (100 μM)	20 μL
10*引物退火 buffer (50 mM NaCl，100 mM Tris-HCl pH 8.0)	10 μL

（3）以表 6 为条件配制反应体系，进行 dA-tailed dsDNA 与 splint adapter 1 的连接。因 dA-tailed dsDNA 仅有一个 5’末端为磷酸基，故此 splint adapter 1 只能与双链一端进行连接，双链另一端无法连接 splint adapter 1。

表 6

dA-tailed dsDNA	52 μL
splint adapter 1 (40 μM)	3 μL
Ad Lig buffer	18 μL
Ad ligase（T4 DNA 连接酶）	5 μL
Ligation Enhancer	2 μL

反应条件为 25℃ 10min，其后于 4℃放置过夜。第二天于 4℃取出后室温放置 30min 平衡到室温，使用 0.8 倍体积的磁珠（MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒）对产物进行纯化，获得纯化产物命名为 SA1-dA-tailed dsDNA。

（4）以表 7 为条件配制反应体系，进行 SA1-dA-tailed dsDNA 5’羟基末端的磷酸化。

表 7

SA1-dA-tailed dsDNA	50 μL
T4 PNK（多聚磷酸激酶）	3 μL
10*ligation buffer	6 μL
ddH_2O	1 μL

反应条件为 37℃ 1h。反应结束后使用 1 倍体积的磁珠（MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂

盒）对产物进行纯化，获得纯化产物命名为 5P-SA1-dA-tailed dsDNA。用 Qubit 1X dsDNA HS 检测试剂盒（ThermoFisher，Cat#Q33230）在 Qubit 4 Fluorometer（ThermoFisher，Cat#Q33230）上测定 DNA 浓度。

（5）以表 8 为条件配制反应体系，将 5P-SA1-dA-tailed dsDNA 与 splint adapter 2 连接，并且补全连接 splint adapter 1 时未连接的缺口。

表 8

5P-SA1-dA-tailed dsDNA	52 μL
splint adapter 2 (40 μM)	3 μL
Ad Lig buffer	18 μL
Ad ligase (T4 DNA **连接酶**)	5 μL
Ligation Enhancer	2 μL

反应条件为 25℃ 10min，其后于 4℃放置过夜。第二天于 4℃取出后室温放置 30min 平衡到室温，使用 1 倍体积的磁珠（MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒）对产物进行纯化，获得纯化产物命名为 SA2+SA1 dsDNA。

（6）以表 9 为条件配制反应体系，使用多聚磷酸激酶对 SA2+SA1 dsDNA 进行 5’羟基的磷酸化。

表 9

SA1-dA-tailed dsDNA	50 μL
T4 PNK (**多聚磷酸激酶**)	3 μL
10*ligation buffer	6 μL
ddH_2O	1 μL

反应条件为 37℃ 1h。反应结束后使用 1.5 倍体积的磁珠（MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒）对产物进行纯化，获得纯化产物命名为 Dual splint dsDNA 文库。用 Qubit 1X dsDNA HS 检测试剂盒（ThermoFisher，Cat#Q33230）在 Qubit 4 Fluorometer（ThermoFisher，Cat#Q33230）上测定 DNA 浓度，浓度为 6.36 ng/μL。

实施例 2

制备双端环化引物（Dual splint oligo）：

（1）使用两种 5’端分别修饰有可偶联化学分子的 DNA 单链引物，此处使用 5’叠氮化物（Azide）修饰和 5’苄基环辛炔（DBCO）修饰的一对引物以表 10 为条件配制反应体系，进行偶联。

表 10

Azide splint oligo (5 OD)	干粉
DBCO splint oligo (5 OD)	干粉
DMSO（二甲基亚砜）	20 μL
1*PBS buffer pH 7.4 (磷酸盐缓冲溶液）	溶解干粉并定容至 200 μL

反应条件为 37℃水浴 48 h。

（2）将所获得的偶联产物进行尿素聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAEG）纯化，去除未偶联的 Azide splint oligo 和 DBCO splint oligo：

1）制备尿素 12%变性胶：将制胶玻璃板下沿对齐，确保制胶玻璃板内侧干净无异物，放入封底槽中，两侧各用两个大弹簧夹夹紧。取 20 mL 12%变性胶（114 g 丙烯酰胺、6 g 甲叉双丙烯酰胺、315 g 尿素、100 mL 10×TBE 加超纯水定容至 1000 mL，混匀。）加入 200 μL 10% APS 和 20 μL TEMED，温和颠倒混匀后，倒入封底槽中等待凝胶。胶凝固后取 60 mL 12%变性胶，加入 600 μL 10% APS 和 30 μL TEMED，混匀后倒入双层玻璃板中，插上梳子，静置等待凝胶，待胶凝固后拔掉梳子和封底槽，将胶板和胶孔清理干净后使用。

2）样品准备：在（1）中获得的偶联产物中不断加入适量尿素粉末，并不断振荡溶解，直至加入的尿素有少许粉末不溶为宜，用涡旋振荡器混匀后，放入沸水中煮沸 2 min 变性。

3）跑胶：将胶板夹在电泳槽上，向电泳槽中倒入 1×TBE（10×TBE：108 g Tris、56 g 硼酸、8 g EDTA 加超纯水定容至 1000 mL；1×TBE：100 mL 10×TBE 加超纯水定容至 1000 mL，混匀）。确保电泳槽不漏液后，用 200 μL 移液器将变性处理后的样品加至样品孔中，开始电泳。电压为 300 V，电泳时间为 2 h。

4）切胶：将平面玻璃板剥下，将凝胶剥离后放置于荧光板上，置于紫外分析仪下进行观察。因电泳方向自上而下，目的片段分子量大、含量多，切胶时选择最上方 Dual splint oligo 条带。切胶时应迅速，避免在紫外灯下照射过长时间，以免引物降解。照胶图片如图 4 所示。

5）泡胶：将凝胶捣碎后，向盛有凝胶的离心管中加入 6 倍体积的 TE Buffer (pH 8.0)。将离心管置于-80 ℃冰箱中冷冻 10 min 后，迅速放入 90 ℃水浴锅中浸泡 30 min，其间不断上下翻转离心管，以确保胶块充分溶解。

6）乙醇沉淀法纯化：将离心管放入离心机中配平后，12000 rpm 离心 3 min，小心将上清液转到新离心管中。向上清液中加入 1/10 体积的 3 M NaOAc 溶液（pH 5.2）和 2.5 倍体积预先放置于-20℃的无水乙醇，用涡旋振荡器混匀后，置于-20 ℃冰箱冷藏 20 min，其后 12000 rpm 离心 10 min。小心倒掉所有上清液，加入 200 μL 预先放置于-20℃的 75%乙醇洗涤，其后 12000 rpm 离心 2 min。温和地倒掉洗涤液，于室温放置数分钟晾干以除去残余液体。向离心管中加入 50 μL 超纯水，涡旋振荡混匀溶解，获得纯的 Dual splint oligo，

使用 Qubit ssDNA 检测试剂盒（ThermoFisher，Cat#Q10212）在 Qubit 4 Fluorometer（ThermoFisher，Cat#Q33230）上测定 DNA 浓度，浓度为 560 ng/μL，约为 28.5 μM。

实施例 3

制备 DNA 纳米球/核酸分子复合物，如图 5 所示：

（1）以表 11 为条件配制反应体系：

表 11

组分	体积
Dual splint dsDNA文库（6.36 ng/μL）	9.5 μL
Dual splint oligo (0.28 μM)	0.6 μL
10*phi29 buffer (退火缓冲液)	2 μL
ddH_2O	7.9 μL

在 PCR 仪上，以表 12 为条件进行反应，获得 Dual splint oligo 与 Dual splint dsDNA 的双端退火产物。

表 12

温度	时间	循环数
95℃	3 min	1
50℃	5 min	1
48℃	2 min	1
48℃ ~ 32℃	每2 min 温度下降2℃	
32℃	2 min	1
4℃	hold	

（2）以表 13 为条件配制反应体系：

表 13

双端退火产物	20 μL
T4 DNA ligase	1.6 μL
10*ligation buffer	2.4 μL

反应条件为 30℃ 30min。获得双端退火环化产物。

（3）以表 14 为条件配制反应体系：

表 14

双端退火环化产物	24 μL
Make DNB enzyme Ⅰ MIX	20 μL
Make DNB enzyme Ⅱ	2 μL

反应条件为 30℃ 40min，其后加入 10 μL stop run buffer(终止液)终止反应。滚环扩增获

得既具有正义链又具有反义链纳米球的 DNA 纳米球。使用 Qubit ssDNA 检测试剂盒（ThermoFisher，Cat#Q10212）在 Qubit 4 Fluorometer（ThermoFisher，Cat#Q33230）上测定 DNA 纳米球浓度，浓度为 19.3 ng/μL。

实施例 4

华大智造 MGI-SEQ2000 平台测序

使用 MGISEQ-2000 FCL 测序载片，通过手持 loader 将制备完成的 DNA 纳米球加载到测序载片上，室温静置 30 分钟，将载片放置在测序仓内，将 MGISEQ-2000 标准 PE100 测序试剂盒放入。使用移除了 MDA 过程的 PE100 测序脚本，上机测试，获得序列信息后与大肠杆菌参考基因组比对，结果如表 15 所示，在不做多重链置换扩增反应的情况下，成功获取了测序文库的双端 PE 信息，过滤后测序数据 Q30 达到 87.56%，且与参考物种基因组序列比对率可达 86.73%，可获得真实的双端序列信息。

表 15

测序指标	DNA双链纳米球测序结果
参考物种	大肠杆菌
测序循环数	212
过滤后的读长大小（M）	12.47
可比对到参考基因组的读长大小(M)	10.81
过滤后Q30(%)	87.56
一链测序超前比例(%)	0.08
二链测序超前比例(%)	0.09
一链测序滞后比例(%)	0.13
二链测序滞后比例(%)	0.12
具有双末端信息的序列数目	62229
可比对到参考基因组的序列数目	54651
比对率(%)	86.73

在本说明书的描述中，参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、 “示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中，对上述术语的示意性表述不必须针对的是相同的实施例或示例。而且，描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。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。

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、一种双端环化引物，其特征在于，包括第一核酸单链分子和第二核酸单链分子，所述第一核酸单链分子的5’端与第二核酸单链分子的5’端通过连接子相连。

2、根据权利要求1所述的双端环化引物，其特征在于，所述第一核酸单链分子和第二核酸单链分子分别独立的选自DNA或RNA分子。

3、根据权利要求1或2所述的双端环化引物，其特征在于，所述连接子包括选自-S-S-、-NH-、-C-S-C-的至少之一。

4、根据权力要求1所述的双端环化引物，其特征在于，所述连接子通过支持物连接基团与固体支持物相连，所述支持物连接基团包括选自亲和素或链霉亲和素-生物素基团、氨基-NHS酯或醛基或羟甲基膦或羧基基团、羟基-异氰酸盐基团、丙烯酰胺-硅烷基基团、叠氮-炔烃基团和巯基-马莱酰亚胺或卤代乙酰基或硫代磺酸盐基团的至少之一。

5、根据权利要求4所述的双端环化引物，其特征在于，所述固体支持物包括选自：磁珠、凝胶珠、玻璃珠、玻片、纳米金颗粒、多聚物体和芯片的至少之一。

6、一种制备权利要求1~5任一项所述的双端环化引物的方法，其特征在于，将第一核酸单链分子和第二核酸单链分子进行连接反应，以便获得所述双端环化引物；

其中，所述第一核酸单链分子的5’端连接有第一修饰基团，所述第二核酸单链分子的5’端连接有第二修饰基团，所述第一修饰基团与第二修饰基团适于发生连接反应；

所述第一核酸单链分子的3’端与第二核酸单链分子的3’端不适于发生连接反应；

所述第一核酸单链分子和第二核酸单链分子之间不能互补配对。

7、根据权利要求6所述的方法，其特征在于，所述第一修饰基团与第二修饰基团分别独立的选自化学小分子或生物大分子；

其中，所述化学小分子之间适于通过共价键结合，所述生物大分子之间适于进行连接反应；

优选地，所述第一修饰基团与第二修饰基团分别独立的选自二苄基环辛炔（DBCO）、叠氮化物（Azide）、马莱酰亚胺（Maleimide）和巯基（-SH）的至少之一。

8、根据权利要求6所述的方法，其特征在于，所述第一修饰基团与第二修饰基团分别为二苄基环辛炔（DBCO）和叠氮化物（Azide），所述连接反应是在温度为37℃、溶剂为PBS、pH为7.4的条件下进行48小时；

任选地，所述溶剂进一步包括DMSO；

任选地，所述DMSO在连接反应体系中的体积分数为10%。

9、根据权利要求 6 所述的方法，其特征在于，进一步包括所述双端环化引物通过第三修饰基团和第四修饰基团与固体支持物相连，所述第三修饰基团与第一修饰基团和第二修饰基团相连，所述第四修饰基团与所述固体支持物相连。

10、根据权利要求 9 所述的方法，其特征在于，所述第三修饰基团和第四修饰基团之间适于形成如下支持物连接基团的至少之一：亲和素或链霉亲和素-生物素基团、氨基-NHS 酯或醛基或羟甲基膦或羧基基团、羟基-异氰酸盐基团、丙烯酰胺-硅烷基基团、叠氮-炔烃基团和巯基-马莱酰亚胺或卤代乙酰基或硫代磺酸盐基团。

11、根据权利要求 9 所述的方法，其特征在于，所述固体支持物包括选自磁珠、凝胶珠、玻璃珠、玻片、纳米金颗粒、多聚物体或和芯片的至少之一。

12、一种获得环化核酸模板的方法，其特征在于，包括：将双端环化引物与双链核酸模板分子进行环化反应，所述双链核酸模板分子包括正义核酸模板链和反义核酸模板链，所述双端环化引物的两个 3’端分别与正义核酸模板链和反义核酸模板链的 5’端和 3’端的至少部分核酸序列互补配对，以便获得环化核酸模板，所述环化核酸模板具有正义核酸模板链环和反义核酸模板链环；

其中，所述双端环化引物包括第一核酸单链分子和第二核酸单链分子，所述第一核酸单链分子的 5’端与第二核酸单链分子的 5’端通过连接子相连。

13、根据权利要求 12 所述的方法，其特征在于，所述双链核酸模板分子的两端连接有接头，所述正义核酸模板链的 5’端与所述反义核酸模板链的 5’端所连接接头的序列不同。

14、根据权利要求 12 所述的方法，其特征在于，所述双链核酸模板分子的 5’端具有游离磷酸基团，所述双链核酸模板分子的 3’端具有游离羟基基团。

15、根据权利要求 12 所述的方法，其特征在于，进一步包括：对所述环化核酸模板进行滚环扩增反应，获得同时具有多个拷贝的正义链和反义链的核酸分子。

16、根据权利要求 15 所述的方法，其特征在于，进行所述滚环扩增反应之前，将所述环化核酸模板加载在测序芯片上；

将加载在所述测序芯片上的环化核酸模板进行所述滚环扩增反应，获得同时具有多个拷贝的正义链和反义链的核酸分子。

17、根据权利要求 12 所述的方法，其特征在于，所述双链核酸模板分子是通过如下方式制备获得：

将核酸双链模板进行 3’末端加 A 处理，所述核酸双链模板有且仅有一个 5’末端具有游离磷酸基团，其余末端具有游离羟基基团；

将 3’末端加 A 处理产物与第一接头进行第一连接处理；

将第一连接处理产物进行第一 5’末端磷酸化处理；

将第一 5’末端磷酸化处理产物与第二接头进行第二连接处理；以及

将第二连接处理产物进行第二 5’末端磷酸化处理，以便获得所述双链核酸模板分子。

18、一种环化核酸分子，其特征在于，是通过权利要求 12~17 任一项所述的方法获得的。

19、一种环化核酸分子，其特征在于，包括：权利要求 1~5 任一项所述的双端环化引物以及正义核酸模板链和反义核酸模板链，所述正义核酸模板链和所述反义核酸模板链反向互补，所述正义核酸模板链和所述反义核酸模板链的两端连接有接头序列，所述正义核酸模板链的 5’端和所述反义核酸模板链的 5’端的接头序列不同，所述正义核酸模板链的 3’端和所述反义核酸模板链的 3’端的接头序列不同；

其中，所述双端环化引物的两个 3’端分别与正义核酸模板链或反义核酸模板链的 5’端和 3’端的至少部分核酸序列互补配对。

20、根据权力要求 19 所述的环化核酸分子，其特征在于，所述双端环化引物以及正义核酸模板链和反义核酸模板链是固定在固体支持物、多聚物或游离在溶液中。

21、根据权利要求 20 所述的环化核酸分子，其特征在于，所述固体支持物包括选自磁珠、凝胶珠、玻璃珠、玻片、纳米金颗粒和芯片的至少之一。

22、一种核酸测序芯片，其特征在于，包括：多个核酸样本结合位点和多个固定于所述核酸样本结合位点的核酸分子复合物，其中，所述核酸分子复合物包含正义核酸模板链、反义核酸模板链和双端环化引物，所述双端环化引物与所述正义核酸模板链相连，所述双端环化引物与所述反义核酸模板链相连。

23、根据权力要求 22 所述的测序芯片，其特征在于，所述正义核酸模板链和所述反义核酸模板链为单链环状结构，所述双端环化引物的两个 3’端分别与正义核酸模板链或反义核酸模板链的 5’端和 3’端的至少部分核酸序列互补配对。

24、根据权力要求 22 所述的测序芯片，其特征在于，所述核酸分子复合物包括多个正义核酸链拷贝和多个反义核酸链拷贝。

25、根据权利要求 24 所述的测序芯片，其特征在于，所述多个正义核酸链拷贝和多个反义核酸链拷贝是通过将所述正义核酸模板链、反义核酸模板链进行滚环扩增处理后获得的。

26、根据权力要求 22 所述的测序芯片，其特征在于，所述正义核酸模板链和所述反义核酸模板链的两端连接有接头序列，所述正义核酸模板链的 5’端和所述反义核酸模板链的 5’端的接头序列不同，所述正义核酸模板链的 3’端和所述反义核酸模板链的 3’端的接头序

列不同。

说 明 书 附 图

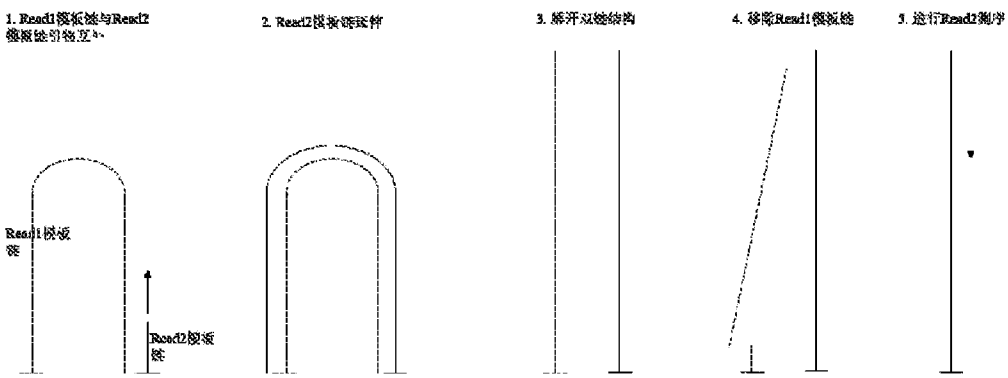

1. Read1模板链与Read2
模板链引物互补
2. Read2模板链延伸
3. 解开双链结构
4. 移除Read1模板链
5. 进行Read2测序
Read1模板
链
Read2模板
链

图 1

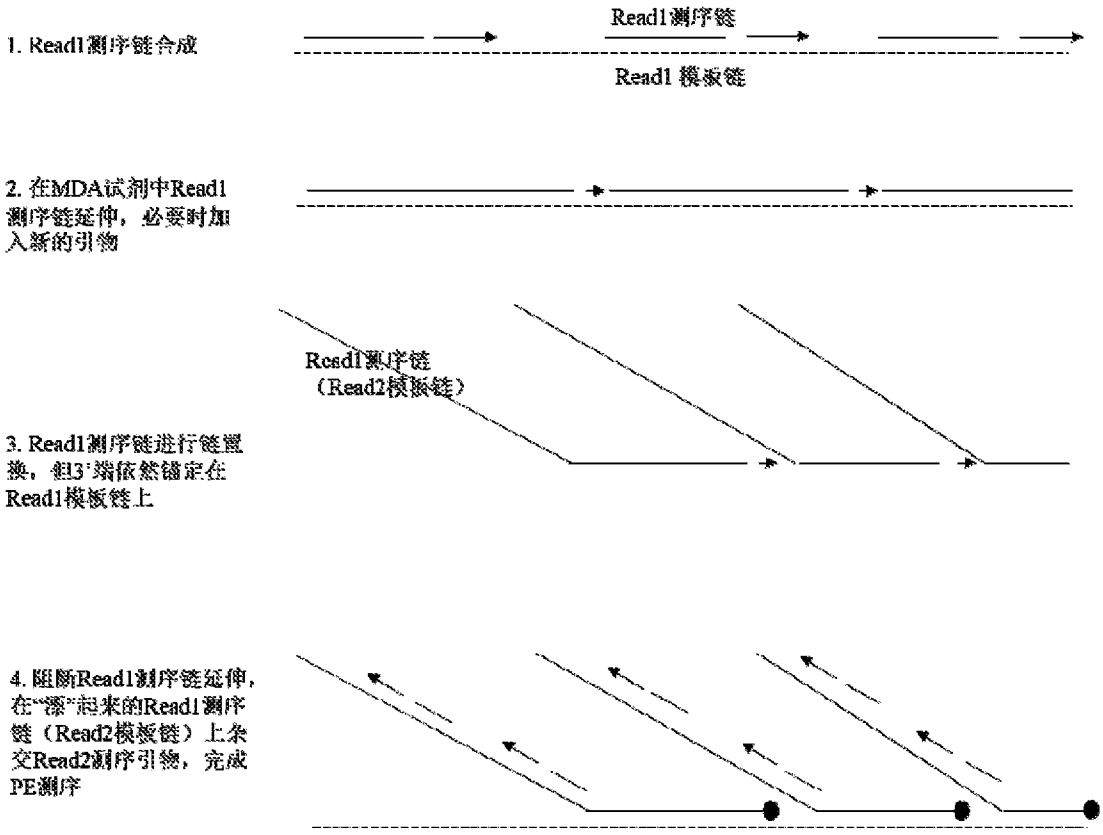

1. Read1测序链合成
Read1测序链
Read1 模板链
2. 在MDA试剂中Read1
测序链延伸，必要时加
入新的引物
3. Read1测序链进行链置
换，但3'端依然锚定在
Read1模板链上
Read1测序链
（Read2模板链）
4. 阻断Read1测序链延伸，
在"漂"起来的Read1测序
链（Read2模板链）上杂
交Read2测序引物，完成
PE测序

图 2

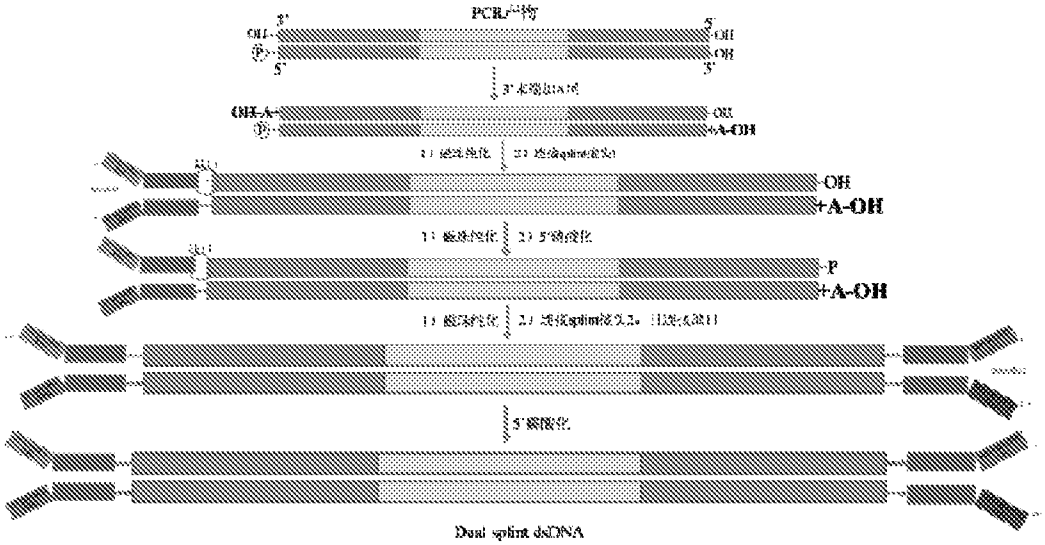

PCR产物
OH
P
+A-OH
Dual splint dsDNA

图 3

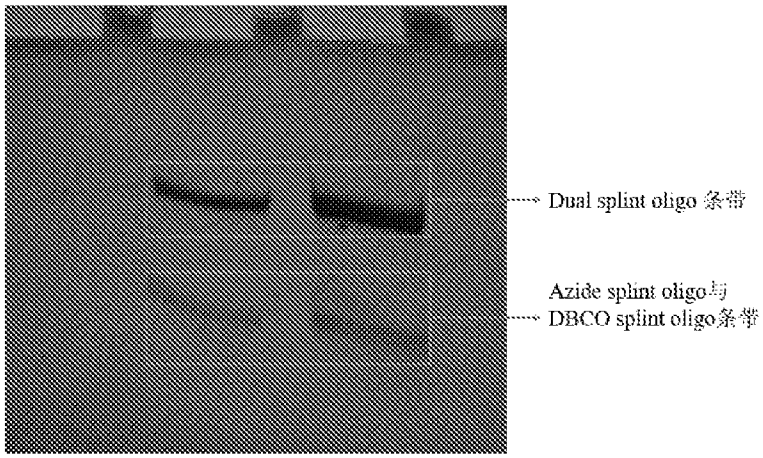

Dual splint oligo 条带
Azide splint oligo与
DBCO splint oligo条带

图 4

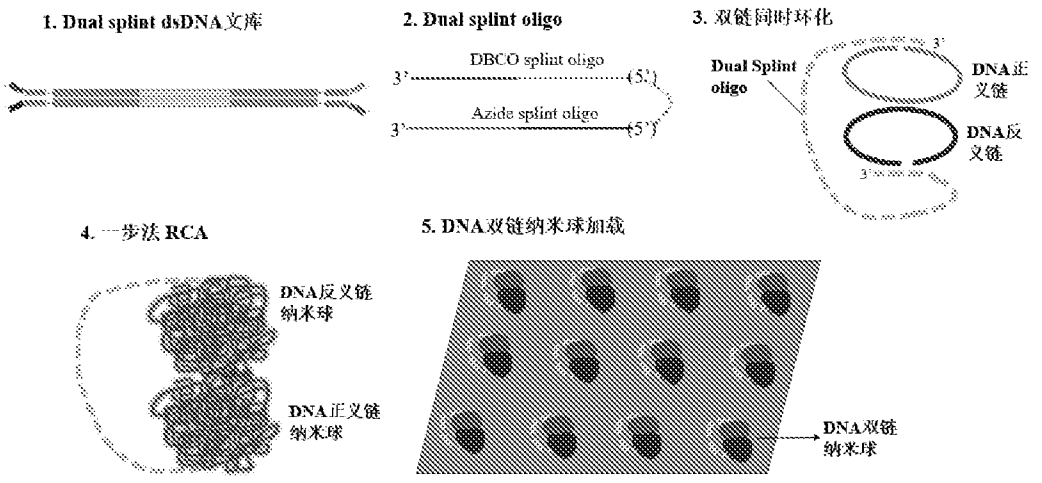

1. Dual splint dsDNA文库
2. Dual splint oligo
DBCO splint oligo
Azide splint oligo
3. 双链同时环化
Dual Splint oligo
DNA正义链
DNA反义链
4. 一步法 RCA
DNA反义链纳米球
DNA正义链纳米球
5. DNA双链纳米球加载
DNA双链纳米球

图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/137336

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/68(2018.01)i; C40B50/06(2006.01)i; C40B50/18(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:C12Q,C40B

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)

VEN, CNABS, PubMed, DWPI, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, JPTXT, CNKI, ISI of Web Science, 百度学术, BAIDU SCHOLAR, BING, Patentics: 申请人, 发明人, 反义链, 环化, 环状, 夹板引物, 接头, 连接子, 纳米球, 亲和素, 双端, 双链, 引物, 正义链, Azide, DBCO, DNB, dsDNA, dual, oligo, primer, rca, splint, -C-S-C-, -S-s-, S-s-, -NH-, 双末端测序, Paired-end sequencing, DNA纳米球, Dual splint oligo.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2022087485 A1 (SINGULAR GENOMICS SYSTEMS, INC.) 28 April 2022 (2022-04-28) description, paragraphs 68, 81, and 169	1-11, 22-26
A	CN 110835783 A (SHENZHEN BGI LIFE SCIENCE RESEARCH INSTITUTE) 25 February 2020 (2020-02-25) entire document	1-26
A	CN 107002291 A (BGI-SHENZHEN et al.) 01 August 2017 (2017-08-01) entire document	1-26
A	CN 113862261 A (NANODIGMBIO (NANJING) BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 31 December 2021 (2021-12-31) entire document	1-26
A	CN 110114472 A (MGI TECH CO., LTD.) 09 August 2019 (2019-08-09) entire document	1-26

☑ 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
"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	Date of mailing of the international search report
28 August 2023	**31 August 2023**

Name and mailing address of the ISA/CN	Authorized officer
China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) **China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088**	Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 107532205 A (ILLUMINA CAMBRIDGE LIMITED) 02 January 2018 (2018-01-02) entire document	1-26
A	CN 113736850 A (NANODIGMBIO (NANJING) BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 03 December 2021 (2021-12-03) entire document	1-26
A	WO 2021178893 A2 (SINGULAR GENOMICS SYSTEMS, INC.) 10 September 2021 (2021-09-10) entire document	1-26
A	WO 2021236792 A1 (ELEMENT BIOSCIENCES, INC.) 25 November 2021 (2021-11-25) entire document	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/137336

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed.
   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2022/137336

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2022087485 A1	28 April 2022	EP 4208470 A1	12 July 2023
CN 110835783 A	25 February 2020	None	
CN 107002291 A	01 August 2017	EP 3225721 A1	04 October 2017
		EP 3225721 A4	16 May 2018
		EP 3225721 B1	24 July 2019
		US 2017349893 A1	07 December 2017
		WO 2016082130 A1	02 June 2016
CN 113862261 A	31 December 2021	None	
CN 110114472 A	09 August 2019	WO 2018112806 A1	28 June 2018
CN 107532205 A	02 January 2018	ES 2846730 T3	29 July 2021
		EP 3783109 A1	24 February 2021
		WO 2016156845 A1	06 October 2016
		HK 1244846 A1	17 August 2018
		US 2021155985 A1	27 May 2021
		US 2018100192 A1	12 April 2018
		EP 3277839 A1	07 February 2018
		EP 3277839 B1	02 December 2020
CN 113736850 A	03 December 2021	None	
WO 2021178893 A2	10 September 2021	US 2021277461 A1	09 September 2021
		US 11359238 B2	14 June 2022
		EP 4114978 A2	11 January 2023
		US 2022325341 A1	13 October 2022
		US 11519029 B2	06 December 2022
		WO 2021178893 A3	07 October 2021
		US 2022119878 A1	21 April 2022
		US 11365445 B2	21 June 2022
		US 2022033895 A1	03 February 2022
		US 2023203576 A1	29 June 2023
		US 2022282324 A1	08 September 2022
WO 2021236792 A1	25 November 2021	US 2023235392 A1	27 July 2023
		GB 202218963 D0	01 February 2023
		GB 2613465 A	07 June 2023
		AU 2021275128 A1	19 January 2023
		CA 3178970 A1	25 November 2021
		EP 4153798 A1	29 March 2023

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2022/137336

A. 主题的分类

C12Q1/68(2018.01)i; C40B50/06(2006.01)i; C40B50/18(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)

IPC:C12Q,C40B

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））

VEN,CNABS, PubMed, DWPI, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, JPTXT, CNKI, ISI of Web Science, 百度学术, BING,Patentics:申请人, 发明人,反义链,环化,环状,夹板引物,接头,连接子,纳米球,亲和素,双端,双链,引物,正义链,Azide,DBCO,DNB,dsDNA, dual,oligo,primer,rca,splint, -C-S-C-,-S-s-,S-s-,-NH-,双末端测序, Paired-end sequencing, DNA纳米球,Dual splint oligo.

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
X	WO 2022087485 A1 (SINGULAR GENOMICS SYSTEMS, INC.) 2022年4月28日 (2022-04-28) 说明书第68、81、169段	1-11, 22-26
A	CN 110835783 A (深圳华大生命科学研究院) 2020年2月25日 (2020-02-25) 全文	1-26
A	CN 107002291 A (深圳华大基因研究院等) 2017年8月1日 (2017-08-01) 全文	1-26
A	CN 113862261 A (纳昂达（南京）生物科技有限公司) 2021年12月31日 (2021-12-31) 全文	1-26
A	CN 110114472 A (深圳华大智造科技有限公司) 2019年8月9日 (2019-08-09) 全文	1-26
A	CN 107532205 A (伊卢米纳剑桥有限公司) 2018年1月2日 (2018-01-02) 全文	1-26

☑ 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
"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	国际检索报告邮寄日期
2023年8月28日	2023年8月31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	受权官员 李煦颖 电话号码 (+86) 010-53961960

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2022/137336

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 113736850 A (纳昂达（南京）生物科技有限公司) 2021年12月3日 (2021-12-03) 全文	1-26
A	WO 2021178893 A2 (SINGULAR GENOMICS SYSTEMS, INC.) 2021年9月10日 (2021-09-10) 全文	1-26
A	WO 2021236792 A1 (ELEMENT BIOSCIENCES, INC.) 2021年11月25日 (2021-11-25) 全文	1-26

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2022/137336

第I栏　核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的：

a. ☑ 作为国际申请的一部分提交的：

b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交（细则13之三.1(a)），

☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。

2. ☐ 本报告是在没有收到符合WIPO ST.26标准的序列表的情况下，考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列，在可进行有意义检索的范围内做出的。

3. 补充意见：

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2022/137336

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	2022087485	A1	2022年4月28日	EP	4208470	A1	2023年7月12日
CN	110835783	A	2020年2月25日		无		
CN	107002291	A	2017年8月1日	EP	3225721	A1	2017年10月4日
				EP	3225721	A4	2018年5月16日
				EP	3225721	B1	2019年7月24日
				US	2017349893	A1	2017年12月7日
				WO	2016082130	A1	2016年6月2日
CN	113862261	A	2021年12月31日		无		
CN	110114472	A	2019年8月9日	WO	2018112806	A1	2018年6月28日
CN	107532205	A	2018年1月2日	ES	2846730	T3	2021年7月29日
				EP	3783109	A1	2021年2月24日
				WO	2016156845	A1	2016年10月6日
				HK	1244846	A1	2018年8月17日
				US	2021155985	A1	2021年5月27日
				US	2018100192	A1	2018年4月12日
				EP	3277839	A1	2018年2月7日
				EP	3277839	B1	2020年12月2日
CN	113736850	A	2021年12月3日		无		
WO	2021178893	A2	2021年9月10日	US	2021277461	A1	2021年9月9日
				US	11359238	B2	2022年6月14日
				EP	4114978	A2	2023年1月11日
				US	2022325341	A1	2022年10月13日
				US	11519029	B2	2022年12月6日
				WO	2021178893	A3	2021年10月7日
				US	2022119878	A1	2022年4月21日
				US	11365445	B2	2022年6月21日
				US	2022033895	A1	2022年2月3日
				US	2023203576	A1	2023年6月29日
				US	2022282324	A1	2022年9月8日
WO	2021236792	A1	2021年11月25日	US	2023235392	A1	2023年7月27日
				GB	202218963	D0	2023年2月1日
				GB	2613465	A	2023年6月7日
				AU	2021275128	A1	2023年1月19日
				CA	3178970	A1	2021年11月25日
				EP	4153798	A1	2023年3月29日