

(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
2020 年 6 月 11 日 (11.06.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/113581 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12Q 1/6869 (2018.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2018/119911
- (22) 国际申请日: 2018 年 12 月 7 日 (07.12.2018)
- (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: 朱国丽 (ZHU, Guoli); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 沈寒婕 (SHEN, Hanjie); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 林建勋 (LIN, Jianxun); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 江媛 (JIANG, Yuan); 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)。
- (74) 代理人: 深圳鼎合诚知识产权代理有限公司 (DHC IP ATTORNEYS); 中国广东省深圳市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, JO, 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)。

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: NANOPORE SEQUENCING METHOD

(54) 发明名称: 纳米孔测序方法

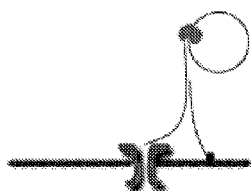


图 2

(57) Abstract: A nanopore sequencing method, comprising: in a nanopore sequencing device, performing rolling circle amplification by using a single-strand ring or a double-strand ring of nucleic acids as a template to produce an amplified single strand; under the action of an electric field, introducing the amplified single strand to nanopores of the nanopore sequencing device, so that the amplified single strand passes through the nanopores and generates an electrical signal of each basic group. By determining electrical signal differences caused by different basic groups, a base sequence on a template nucleic acid is measured.

(57) 摘要: 一种纳米孔测序方法, 包括: 在纳米孔测序装置中, 以核酸单链环或双链环为模板进行滚环扩增, 产生出扩增的单链, 在电场的作用下, 将扩增的单链引入纳米孔测序装置的纳米孔中, 使扩增的单链通过纳米孔并产生每个碱基的电信号, 通过判断不同碱基引起的电信号差异, 实现对模板核酸上碱基序列的测定。

WO 2020/113581 A1

纳米孔测序方法

技术领域

本发明涉及测序技术领域，具体涉及一种纳米孔测序方法。

背景技术

目前二代测序的读长较短，难以对相似基因、SNP 位点以及转录异构体等进行准确检测；纳米孔测序技术有如下特点：（1）单分子 DNA 测序。无需对测序对象进行扩增和放大，能够克服由基因扩增引起的测序偏向性。（2）连续测序。DNA 链上碱基的阅读是不间断的，这一特性不仅能够大幅度提高测序速度，也会使 DNA 的读长大幅度增加。

目前英国牛津纳米孔技术公司（Oxford Nanopore Technologies）基于该技术已经推出商业化产品 MinION、GridION 和 PromethION。配套的 DNA 建库试剂盒主要采用 1D 和 1D2 两种方式。由于纳米孔测序难以对单个碱基的信号进行区分，并且四种碱基引起的电流信号差别很小，仅靠单次对碱基的检测使得测序的准确率较低，需要复杂的后期数据分析并且依赖强大的硬件和软件系统。

目前基于牛津纳米孔技术公司公司的 MinION 平台，有公司推出 1D、2D、1D2 的建库方式，但是这两种方式都存在准确率不足以及需要的样本起始量高的缺点。一些其他相关科研机构也先后开发了基于多拷贝数文库构建方法，包括分子内结合纳米孔一致性测序方法（INC-seq）（Li et al. GigaScience (2016) 5:34 DOI 10.1186/s13742-016-0140-7），滚环扩增多联一致性测序的方法（R2C2）（doi: <https://doi.org/10.1101/338020>），以及基于呼吸作用的自扩增建库方法（专利申请号 201610420179.5）。

现有纳米孔测序的文库构建方式主要采用对单个拷贝数的碱基序列进行测序，这种方式对样本起始量要求较高且准确率较低，而且对后期数据分析有着非常高的要求。而多拷贝纳米孔文库构建的常规双链直接环化以及基于 Gibson 组装的效率较低，并且一般环化的片段短于 1kb，限制了测序应用。基于呼吸作用的自扩增方法对于两端的 Tm 值要求比较高，并且可能存在模板 DNA 在扩增过程中自配对的现象。

发明内容

本发明提供一种纳米孔测序方法。通过多种方法构建可用于纳米孔测序的多拷贝文库，可以实现长片段的多次重复信号测定，能够有效提高纳米孔测序的准确率。

本发明通过如下技术方案实现：

一种纳米孔测序方法，包括：在纳米孔测序装置中，以核酸单链环或双链环为模板核酸进行滚环扩增产生出扩增的单链，在电场的作用下，将上述扩增的单链引入纳米孔测序装置的纳米孔中，使上述扩增的单链通过上述纳米孔并产生每个碱基的电信号，通过判断不同碱基引起的电信号差异，实现对上述模板核酸上碱基序列的测定。

在优选实施方案中，上述模板核酸为核酸单链环；上述滚环扩增的反应体系包括：上述核酸单链环，与上述核酸单链环部分杂交的扩增引物，以及具有链置换活性的聚合酶、dNTPs和反应缓冲液；上述方法包括：

将上述核酸单链环与上述扩增引物杂交形成杂交产物；

将上述杂交产物加入上述纳米孔测序装置中，加入上述聚合酶、dNTPs 和反应缓冲液进行滚环扩增产生出扩增的单链；

在电场的作用下，使上述扩增的单链单个碱基逐步通过上述纳米孔并产生每个碱基的电信号，通过判断不同碱基引起的电信号差异，实现对上述模板核酸上碱基序列的测定。

在优选实施方案中，上述反应体系还包括探针序列，上述探针序列上具有特定修饰，该特定修饰能够与上述纳米孔测序装置中支撑上述纳米孔的支撑层连接，上述扩增引物上包含能够与上述探针序列结合的探针识别位点；上述方法包括：

将上述扩增引物、上述探针序列和上述核酸单链环杂交形成杂交产物；

将上述杂交产物加入上述纳米孔测序装置中，使上述探针序列与上述支撑层连接，加入上述聚合酶、dNTPs 和反应缓冲液进行滚环扩增产生出扩增的单链；

在电场的作用下，使上述扩增的单链单个碱基逐步通过上述纳米孔并产生每个碱基的电信号，通过判断不同碱基引起的电信号差异，实现对上述模板核酸上碱基序列的测定。

在优选实施方案中，上述反应体系还包括探针序列，上述探针序列上具有特定修饰，该特定修饰能够与上述纳米孔测序装置中支撑上述纳米孔的支撑层连接，上述扩增引物上包含能够与上述探针序列结合的探针识别位点；上述方法包括：

将上述扩增引物和上述核酸单链环杂交形成杂交产物；

向上述纳米孔测序装置中加入上述探针序列使其与上述支撑层连接，加入上述杂交产物

使上述扩增引物与上述探针序列杂交，加入上述聚合酶、dNTPs 和反应缓冲液进行滚环扩增产生出扩增的单链；

在电场的作用下，使上述扩增的单链单个碱基逐步通过上述纳米孔并产生每个碱基的电信号，通过判断不同碱基引起的电信号差异，实现对上述模板核酸上碱基序列的测定。

在优选实施方案中，上述特定修饰选自胆固醇或生物素修饰。

在优选实施方案中，上述特定修饰是胆固醇修饰，上述支撑层是磷脂双分子层，上述胆固醇与上述磷脂双分子层通过亲和结合实现连接。

在优选实施方案中，上述特定修饰是生物素修饰，上述支撑层上具有链霉亲和素修饰，上述生物素与上述链霉亲和素通过亲和结合实现连接。

在优选实施方案中，上述核酸单链环上带有特殊修饰，该特殊修饰能够与上述纳米孔测序装置中支撑上述纳米孔的支撑层连接；上述方法包括：

将上述扩增引物、上述核酸单链环加入上述纳米孔测序装置中，使上述扩增引物、上述核酸单链环杂交形成杂交产物，且使上述核酸单链环通过上述特殊修饰与上述支撑层连接，加入上述聚合酶、dNTPs 和反应缓冲液进行滚环扩增产生出扩增的单链；

在电场的作用下，使上述扩增的单链单个碱基逐步通过上述纳米孔并产生每个碱基的电信号，通过判断不同碱基引起的电信号差异，实现对上述模板核酸上碱基序列的测定。

在优选实施方案中，上述特殊修饰选自生物素或聚乙二醇。

在优选实施方案中，上述特殊修饰是生物素，上述支撑层上具有链霉亲和素修饰，上述生物素与上述链霉亲和素通过亲和结合实现连接。

在优选实施方案中，上述模板核酸为核酸双链环；上述核酸双链环一条链带有缺口；上述滚环扩增的反应体系包括：上述核酸双链环，以及具有链置换活性的聚合酶、dNTPs 和反应缓冲液；上述方法包括：

将上述核酸双链环、聚合酶、dNTPs 和反应缓冲液加入上述纳米孔测序装置中，进行滚环扩增以从上述核酸双链环的带有缺口的单链产生出扩增的单链；

在电场的作用下，使上述扩增的单链单个碱基逐步通过上述纳米孔并产生每个碱基的电信号，通过判断不同碱基引起的电信号差异，实现对上述模板核酸上碱基序列的测定。

在优选实施方案中，上述反应体系还包括探针序列，上述探针序列上具有特定修饰，该特定修饰能够与上述纳米孔测序装置中支撑上述纳米孔的支撑层连接，上述核酸双链环上包

含能够与上述探针序列结合的探针识别位点；上述方法包括：

将上述核酸双链环、上述探针序列、聚合酶、dNTPs 和反应缓冲液加入上述纳米孔测序装置中，使上述探针序列通过上述特定修饰与上述支撑层连接，进行滚环扩增以从上述核酸双链环的带有缺口的单链产生出扩增的单链；

在电场的作用下，使上述扩增的单链单个碱基逐步通过上述纳米孔并产生每个碱基的电信号，通过判断不同碱基引起的电信号差异，实现对上述模板核酸上碱基序列的测定。

在优选实施方案中，上述具有链置换活性的聚合酶选自 phi29 聚合酶或 Bst 聚合酶。

在优选实施方案中，上述电场的电压是毫伏级电压。

在优选实施方案中，上述毫伏级电压是 10mV 以上的电压，优选 50mV 以上的电压，更优选 100mV-250mV 的电压，最优选 120mV 的电压。

在优选实施方案中，上述方法还包括制备上述核酸单链环或双链环的步骤，该步骤包括对 DNA 片段进行环化得到单链环或双链环。

在优选实施方案中，上述 DNA 片段的长度是 100bp 至 1Mbp。

在优选实施方案中，上述纳米孔是生物纳米孔和固态纳米孔。

在优选实施方案中，上述生物纳米孔是蛋白纳米孔，该蛋白纳米孔的最窄处满足使单链核酸通过的特性。

在优选实施方案中，上述固态纳米孔是硅基材料或者石墨烯二维材料的纳米孔，该硅基材料纳米孔的最窄处满足使单链核酸通过的特性。

本发明的纳米孔测序方法，基于多拷贝 DNA 纳米孔文库制备，不仅可以弥补常规纳米孔测序建库中的准确率不足的问题，还可以提高环化效率，并且在进行滚环扩增的同时进行纳米孔测序可以提高测序的时效性，缩短建库的时间并且简化测序步骤。同时本发明对所有可以进行纳米孔测序的碱基序列都适应，而且不会存在接头污染以及自配对的现象。

附图说明

图 1 为本发明实施例中文库构建使用的 DNA 接头序列结构示意图；

图 2 为本发明实施例中单链 DNA 环与接头杂交后置于纳米孔装置进行测序的方法示意图；

图 3 为本发明实施例中单链 DNA 环在纳米孔体系内与表面固定序列杂交进行测序的方法示意图；

图 4 为本发明实施例中对单链 DNA 环进行特殊修饰固定于支撑层表面进行测序的方法示意图；

图 5 为本发明实施例中无探针识别位点的 DNA 双链环文库构建和测序方法示意图；

图 6 为本发明实施例中有探针识别位点的 DNA 双链环文库构建和测序方法示意图；

图 7 为本发明实施例中制备的双链环状 DNA 琼脂糖凝胶电泳实验结果图；

图 8 为本发明实施例中双链环状 DNA 滚环扩增得到的 DNA 纳米球正向测序的结果图；

图 9 为本发明实施例中基于单链环进行纳米孔测序得到的电流变化结果图；

图10为本发明实施例中基于双链环进行纳米孔测序得到的电流变化结果图。

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。在以下的实施方式中，很多细节描述是为了使得本发明能被更好的理解。然而，本领域技术人员可以毫不费力的认识到，其中部分特征在不同情况下是可以省略的，或者可以由其他材料、方法所替代。

另外，说明书中所描述的特点、操作或者特征可以以任意适当的方式结合形成各种实施方式。同时，方法描述中的各步骤或者动作也可以按照本领域技术人员所能显而易见的方式进行顺序调换或调整。因此，说明书和附图中的各种顺序只是为了清楚描述某一个实施例，并不意味着是必须的顺序，除非另有说明其中某个顺序是必须遵循的。

本发明主要基于滚环扩增的方法，完成基于纳米孔的多拷贝文库的构建及测序。本发明详细涉及多拷贝文库构建的技术方案以及其所需要的寡核苷酸序列组成、特殊修饰、反应条件、方法步骤等。

本发明的基本原理是：将待测的核酸（如 DNA）打断成长片段后，通过特定的方法构建单链环或双链环，通过滚环扩增方法以及纳米孔测序装置，在电场的作用下，待测模板核酸会以单链的模式通过纳米孔并产生不同碱基的电信号，通过判断不同碱基引起的电信号差异，从而实现对不同序列模板核酸进行识别。

本发明一个实施例中，一种纳米孔测序方法，包括：在纳米孔测序装置中，以核酸单链环或双链环为模板核酸进行滚环扩增产生出扩增的单链，在电场的作用下，将上述扩增的单

链引入纳米孔测序装置的纳米孔中，使上述扩增的单链通过上述纳米孔并产生每个碱基的电信号，通过判断不同碱基引起的电信号差异，实现对上述模板核酸上碱基序列的测定。

本发明实施例中，纳米孔测序装置可以按照现有该类装置实施，例如国际申请 WO2014013262A1 中公开的纳米孔测序装置。这种纳米孔测序装置可以是基于生物纳米孔或固态纳米孔的装置，生物纳米孔可以是蛋白纳米孔，固态纳米孔可以是硅基材料纳米孔，纳米孔的最窄处满足使单链核酸通过的特性。支撑纳米孔的支撑层可以是磷脂双分子层（磷脂膜）、多聚物膜或其它做了表面修饰（例如生物素修饰）的支撑物。

本发明实施例中，模板核酸包括两种类型，即核酸单链环或双链环。它们都可以通过对核酸（如 DNA）片段进行环化而得到。这样的 DNA 片段，即用于进行环化建库的 DNA 样本，片段大小一般是需要适合构建单链环或双链环的长度，例如 100bp 至 1Mbp，该核酸（如 DNA）片段，可以来源于任何感兴趣的生物样品，如动物、植物、微生物等。核酸单链环，例如单链 DNA 环，一般是以 DNA 片段为模板，通过连接设计的接头并进行环化后得到的封闭 DNA 单链环，也可称为文库。核酸双链环，例如双链 DNA 环，一般是以 DNA 片段为模板，经过特殊设计的接头连接以及其他合适的技术方案得到的一条链上具有缺口的双链环状 DNA。

如图 1 所示，本发明一个实施例中，文库构建使用 DNA 接头序列，该 DNA 接头序列由两条不同长度的碱基序列组成，如图 1 所示，较长的碱基序列在 3' 端的延长部分具有一段能够与单链环特异性结合的序列。该 DNA 接头序列一条链上带有特定修饰的碱基序列，如图 1 中短链 3' 端的修饰，例如可以是胆固醇或生物素修饰，该特定修饰能够与纳米孔测序装置中支撑纳米孔的支撑层连接而将整个 DNA 接头序列固定在支撑层上。

需要说明的是，在本发明实施例中，在模板核酸是核酸单链环的情况下，纳米孔测序必需的接头序列是如图 1 所示的那条在 3' 端的延长部分具有一段能够与单链环特异性结合的序列，其作为滚环扩增的引物，该序列在本发明中也称“扩增引物”。而图 1 中 3' 端带有修饰的短链是作为优选存在的序列，用于连接到纳米孔的支撑层上，以使扩增的单链靠近纳米孔并进入纳米孔中，该短链在本发明中也称“探针序列”。

在模板核酸是核酸单链环的情况下，本发明的纳米孔测序中滚环扩增的反应体系包括以下成分：核酸单链环，与核酸单链环部分杂交的扩增引物，以及具有链置换活性的聚合酶、dNTPs 和反应缓冲液等。本发明的纳米孔测序方法包括：将核酸单链环与扩增引物杂交形成杂交产物；将杂交产物加入纳米孔测序装置中，加入聚合酶、dNTPs 和反应缓冲液进行滚环扩增产生出扩增的单链；在电场的作用下，使扩增的单链单个碱基逐步通过纳米孔并产生每

个碱基的电信号，通过判断不同碱基引起的电信号差异，实现对模板核酸上碱基序列的测定。

在优选实施方案中，一种基于单链 DNA 环的纳米孔多拷贝文库构建和测序方法，如图 2 所示，示出了一种单链 DNA 环与接头（包括长链和短链）杂交后置于纳米孔装置进行测序的方法。反应体系包括核酸单链环，与核酸单链环部分杂交的扩增引物（即长链），探针序列（即短链），以及具有链置换活性的聚合酶、dNTPs 和反应缓冲液，探针序列上具有特定修饰（例如胆固醇或生物素修饰），该特定修饰能够与纳米孔测序装置中支撑纳米孔的支撑层连接，扩增引物上包含能够与探针序列结合的探针识别位点；该方法包括：将扩增引物、探针序列和核酸单链环杂交形成杂交产物；将杂交产物加入纳米孔测序装置中，使探针序列与支撑层连接，加入聚合酶、dNTPs 和反应缓冲液进行滚环扩增产生出扩增的单链；在电场的作用下，使扩增的单链单个碱基逐步通过纳米孔并产生每个碱基的电信号，通过判断不同碱基引起的电信号差异，实现对模板核酸上碱基序列的测定。

具体实施例中，扩增引物（即长链）、探针序列（即短链）二者具有部分序列互补，短链的 3' 末端进行修饰（例如胆固醇或生物素等），先将长链和短链进行杂交，杂交产物再与单链环杂交。然后，将杂交后产物投放至已形成纳米孔的测序装置中，短片段 3' 端修饰物会与支撑层表面相互作用进而吸附在表面，实现杂交产物在纳米孔表面的富集。向测序装置中加入聚合酶以及 dNTP，并对整套测序装置施加电场，使接头序列中的长链 5' 端进入到纳米孔中并在聚合酶和电场的作用下实现单个碱基逐步通过纳米孔，记录产生的电流信号。

在优选实施方案中，一种基于单链 DNA 环的纳米孔多拷贝文库构建和测序方法，如图 3 所示，示出了一种单链 DNA 环在纳米孔体系内与表面固定序列杂交。反应体系包括核酸单链环，与核酸单链环部分杂交的扩增引物（即长链），探针序列（即短链），以及具有链置换活性的聚合酶、dNTPs 和反应缓冲液，探针序列上具有特定修饰（例如胆固醇或生物素修饰），该特定修饰能够与纳米孔测序装置中支撑纳米孔的支撑层连接，扩增引物上包含能够与探针序列结合的探针识别位点；该方法包括：将扩增引物和核酸单链环杂交形成杂交产物；向纳米孔测序装置中加入探针序列使其与支撑层连接，加入杂交产物使扩增引物与探针序列杂交，加入聚合酶、dNTPs 和反应缓冲液进行滚环扩增产生出扩增的单链；在电场的作用下，使扩增的单链单个碱基逐步通过纳米孔并产生每个碱基的电信号，通过判断不同碱基引起的电信号差异，实现对模板核酸上碱基序列的测定。

具体实施例中，设计两段寡核苷酸序列（oligo），其中一条链是 3' 端带有修饰（例如胆固醇、生物素等）的短链，称为探针序列；另一条链是既带有探针识别位点又能够与 DNA 单链环杂交的长链，称为扩增引物，将该扩增引物与 DNA 单链环杂交，形成引物-单链 DNA

(primer-ssDNA) 杂交产物。将 3'端带有修饰的短链(探针序列)固定于支撑层表面,在支撑层表面形成高密度的探针序列,并将引物-单链 DNA 杂交产物投放至形成纳米孔的测序装置中,使杂交产物上的探针识别位点与支撑层表面的探针序列相互杂交。向纳米孔测序装置中加入聚合酶和 dNTP,并在纳米孔两端施加电压,长链(扩增引物)的 5'端会在电场作用下进入到纳米孔中,并在聚合酶的作用下逐个碱基的通过,产生相应的电流信号。

上述实施例中,短链上的修饰可以是胆固醇修饰,支撑层可以是磷脂双分子层,胆固醇与磷脂双分子层通过亲和结合实现连接。其它实施例中,短链上的修饰可以是生物素修饰,支撑层上具有链霉亲和素修饰,生物素与链霉亲和素通过亲和结合实现连接。

在优选实施方案中,一种基于单链 DNA 环的纳米孔多拷贝文库构建和测序方法,如图 4 所示,示出了一种对单链 DNA 环进行特殊修饰固定于支撑层表面进行测序的方法。反应体系包括核酸单链环,与核酸单链环部分杂交的扩增引物(即长链),以及具有链置换活性的聚合酶、dNTPs 和反应缓冲液。核酸单链环上带有特殊修饰(例如生物素或聚乙二醇等),该特殊修饰能够与纳米孔测序装置中支撑上述纳米孔的支撑层连接。该方法包括:将扩增引物、核酸单链环加入纳米孔测序装置中,使扩增引物、核酸单链环杂交形成杂交产物,且使核酸单链环通过特殊修饰与支撑层连接,加入聚合酶、dNTPs 和反应缓冲液进行滚环扩增产生出扩增的单链;在电场的作用下,使扩增的单链单个碱基逐步通过纳米孔并产生每个碱基的电信号,通过判断不同碱基引起的电信号差异,实现对模板核酸上碱基序列的测定。

具体实施例中,对核酸单链环上特定的碱基进行标记修饰,该标记修饰可以为生物素或者其他类似的化学物质(如聚乙二醇),带有该标记修饰的碱基需要既具有正常的聚合作用又不会在聚合酶的作用下从双分子层表面被替换。在反应开始后,滚环扩增后的单链 DNA 会在电场作用下穿过纳米孔并产生相应的电信号。

上述实施例中,特殊修饰可以是生物素,支撑层上具有链霉亲和素修饰,生物素与链霉亲和素通过亲和结合实现连接。

在优选实施方案中,一种基于双链 DNA 环的纳米孔多拷贝文库构建和测序方法,如图 5 所示,示出了一种无探针识别位点的 DNA 双链环文库构建和测序方法,其模板核酸为核酸双链环,该核酸双链环一条链带有缺口;其反应体系包括:核酸双链环,以及具有链置换活性的聚合酶、dNTPs 和反应缓冲液。该方法包括:将核酸双链环、聚合酶、dNTPs 和反应缓冲液加入纳米孔测序装置中,进行滚环扩增以从核酸双链环的带有缺口的单链产生出扩增的单链;在电场的作用下,使扩增的单链单个碱基逐步通过纳米孔并产生每个碱基的电信号,通过判断不同碱基引起的电信号差异,实现对模板核酸上碱基序列的测定。

本发明实施例中，制备一条链带有缺口的核酸双链环的方法可以按照现有常规方法进行。例如，在一个实施例中，按照如下方法制备 DNA 双链环：对 DNA 片段进行末端修复并在末端加 A；加特殊设计的接头（例如，两段接头为不对称、一条较长、一条较短的形成分叉结构的接头）；使用特殊设计的引物（例如，带有 U 碱基）进行 PCR 扩增；使用 User 酶进行处理，获得两端具有互补序列的双链 DNA；环化处理，由于特殊设计的引物，在环化时会形成带有缺口的双链 DNA 环。

在优选实施方案中，一种基于双链 DNA 环的纳米孔多拷贝文库构建和测序方法，如图 6 所示，示出了一种有探针识别位点的 DNA 双链环文库构建和测序方法，其模板核酸为核酸双链环，该核酸双链环一条链带有缺口；其反应体系包括：核酸双链环，具有链置换活性的聚合酶、dNTPs 和反应缓冲液，以及探针序列，该探针序列上具有特定修饰，该特定修饰能够与纳米孔测序装置中支撑上述纳米孔的支撑层连接，核酸双链环上包含能够与探针序列结合的探针识别位点。该方法包括：将核酸双链环、探针序列、聚合酶、dNTPs 和反应缓冲液加入纳米孔测序装置中，使探针序列通过特定修饰与支撑层连接，进行滚环扩增以从核酸双链环的带有缺口的单链产生出扩增的单链；在电场的作用下，使扩增的单链单个碱基逐步通过纳米孔并产生每个碱基的电信号，通过判断不同碱基引起的电信号差异，实现对模板核酸上碱基序列的测定。

本发明实施例中，具有链置换活性的聚合酶可以选自 phi29 聚合酶或 Bst 聚合酶等。电场的电压一般是毫伏级电压，例如 10mV 以上的电压，优选 50mV 以上的电压，更优选 100mV-250mV 的电压，最优选 120mV 的电压。

以下通过实施例详细说明本发明的技术方案，应当理解，实施例仅是示例性的，不能理解为对本发明保护范围的限制。

实施例 1：单链环状 DNA 的制备

根据 MGIEasy™ DNA 文库制备试剂盒（深圳华大智造科技有限公司）以大肠杆菌标准菌株为原料提取 DNA，按照试剂盒说明书操作制备单链环状 DNA。

实施例 2：双链环状 DNA 的制备

1、phiX174 质粒线性化

取 1μg phiX174 (1μL, NEB 公司)，加入 1μL ssPI 酶 (NEB 公司)，5μL 10X Smart buffer，补加 43μL 水至 50μL。涡旋混匀后放入 PCR 仪中，反应程序如下所示：37℃反应 30 分钟，65℃反应 20 分钟，4℃保存。

2、线性化 DNA 末端加 A

取 20 μ L 线性化的 phiX174, 加 3 μ L 10X NEB buffer2 (NEB 公司), 0.075 μ L 100mM dATP (Enzymatics 公司), 6U Klenow Exo- (Enzymatics 公司), 用水补到 30 μ L, 涡旋混匀后放入 PCR 仪中, 反应程序如下所示: 37 $^{\circ}$ C 反应 30 分钟, 4 $^{\circ}$ C 保存。

3、加接头连接

将表 1 中 YJ-1058 与 YJ-1092 序列杂交得到 25 μ M 的杂交接头产物, 取上述产物 13 μ L, 加入 1.6 μ L 25 μ M 的接头, 0.55 μ L 600U/ μ L 的 T4 DNA 连接酶(BGI 公司), 加水补到 30 μ L, 涡旋混匀后放入 PCR 仪中, 反应程序如下所示: 20 $^{\circ}$ C, 30 分钟, 4 $^{\circ}$ C 保存。使用 0.5X 的 AM Xpure 磁珠进行纯化, 并用 60 μ L 的 TE 进行溶解。

4、对连接产物进行 PCR

取 320ng 的上述产物, 加入 10U Pfu Curbo Tur (Promega 公司)、100 μ L PfuCx mix3 (Promega 公司)、1.6 μ L 25mM dNTP (Enzymatics)、5 μ L 20 μ M YJ-1054 引物(表 1)、5 μ L 20 μ M YJ-1055 引物(表 1), 用水补到 200 μ L。混匀后使用如下反应程序: 95 $^{\circ}$ C, 3min; 9 个循环的 92 $^{\circ}$ C, 30secs+56 $^{\circ}$ C, 30secs+72 $^{\circ}$ C, 20min, 68 $^{\circ}$ C, 18min, 以 0.1 秒的速率降温至 4 $^{\circ}$ C。

5、使用 User 酶处理 PCR 产物

取 4.5ug PCR 产物, 加入 11 μ L 10X Taq buffer (NEB 公司)、12 μ L User 酶(NEB 公司), 加水至 110 μ L, 混匀后在 PCR 仪上反应 60min, 再加入 180 μ L TA buffer(BGI 公司), 用水补至 1810 μ L, 在 70 $^{\circ}$ C 水浴锅中反应 30min 后放置室温冷却 20min。

6、环化

在上述产物中加入 200 μ L 10X smart buffer, 2 μ L T4 DNA 连接酶 (NEB 公司), 用水补到 2ml, 室温反应 2 小时, 使用 0.5 $\times$ 的 1:1 的 AM Xpure 磁珠和 HBB 混合液进行纯化, 并使用 60 μ L TE 溶解。

7、消化未环化产物

取 59.1 μ L 环化后产物, 加入 8.9 μ L 9X PS mix、9 μ L Plasmid-Safe 酶、3 μ L ATP, 混匀后置于 PCR 仪器中 37 $^{\circ}$ C 反应 1 小时。使用 1X AM Xpure 磁珠进行纯化, 并用 60 μ L TE 溶解。

8、聚合酶 I (Polymerase I) 处理

取 10 μ L 上述纯化后的产物加入 1 μ L 聚合酶 I, 9 μ L NEBuffer 2, 混匀后放入 PCR 仪中反应, 反应程序: 14 $^{\circ}$ C, 30min。

9、琼脂糖凝胶电泳

分别取 20ng 的 PCR 产物、环化产物、消化后的环化产物、以及使用聚合酶 I 处理后的产物，使用 0.8%的胶进行凝胶电泳实验，结果如图 7 所示。

M 泳道为 1kb plus ladder。泳道 1 为 PCR 产物，三角对应的是线性 phiX174 的条带。泳道 2 为环化产物，下面三角对应的是线性 phiX174 的条带，上面三角对应环化后的双链 DNA 环。泳道 3 为经过 Plasmid-safe 酶消化后的环化产物，三角对应环化后的双链 DNA 环。泳道 4 为经过 Plasmid-safe 酶消化后的环化产物再使用聚合酶 I 处理后的产物条带，三角对应环化后的双链 DNA 环。泳道 1 和 2 对比，可以看出环化效率接近于 30%；泳道 2 和 3 对比可以说明上面三角对应的为双链环；泳道 3 和泳道 4 对比，可以说明形成的双链环包含一条封闭完整的环。

表1

引物名称	引物序列
YJ-1092	5phos/AGTCGGAGGCCAAGCGGTCTTAGGAAGACAATA GGTCCGATCAACTCCTTGGCTCACAGAACGACAT (SEQ ID NO: 1)
YJ-1058	CTTGGCUCACAGAACGACAUGGCTACGATCCGACTT (SEQ ID NO: 2)
YJ-1054	CTTGGCUCACAGAACGACAUGGCTAC (SEQ ID NO: 3)
YJ-1055	ATGTCGTTCTGUGAGCCAAGGAGUTG (SEQ ID NO: 4)

实施例3：双链环状DNA的滚环扩增

取出环化后的双链DNA文库、2×phi29 buffer（Enzymatics公司）、phi29酶（Enzymatics公司），100mM EDTA pH8.0 (Invitrogen公司)置于冰盒上约0.5h，待融化后，使用漩涡振荡器震荡混匀5s后，短暂离心置于冰盒上备用。

- 1、加入20μL的40fmol浓度的双链DNA链环。
- 2、加入20μL的2X phi29 buffer到PCR管中，混匀后置于PCR设备中，30℃孵化，5分钟。
- 3、在每个反应管中加入40μL的2x phi29，4μL的phi29酶（Enzymatics公司）用枪头上下搅拌均匀，置于PCR仪中，反应条件为30℃，2hr。
- 4、待反应完成后，在每个反应管中加入20μL 100mM EDTA pH 8.0，进行混合。
- 5、取出BGISEQ-500测序试剂盒，根据试剂盒说明书，将测序芯片装载至BGISEQ-500测序仪上，将上述反应产物DNA纳米球（DNB）加载到BGISEQ-500平台。根据测序试剂盒说

说明书进行测序，设置参数进行拍照，第一轮正向测序的结果如图8所示。图8显示了在BGISEQ-500平台上进行正向测序，其中一个循环的结果，图中的亮点表明有多个拷贝数的DNB，方框突出显示出了出现DNB位置。

该实施例结果说明上述双链DNA文库能够制备并进行滚环扩增用于测序。

实施例4：基于单链环进行纳米孔测序

1、设计两条寡核苷酸序列（oligo），其中一条是3'端带有特殊修饰（胆固醇）的短片段作为探针序列（序列为：SEQ ID NO：5：CCGCGTGAGATCTGATGATGTTTTAAATTTGGGTTT/iSpC3/-Cholesterol，其中/iSpC3/表示-CH₂CH₂CH₂-，用于阻断DNA的聚合，Cholesterol是指胆固醇），另一条是既带有探针识别位点又可以与DNA单链环杂交的长链序列（序列为：SEQ ID NO：6：/iSpC3/AAAAAAAAACCTTCC/iSpC3/CTTCCCATCATCATCAGATCTCACGCGGAAAAAAAAAAAAAA/iSpC3/iSpC3/iSpC3/iSpC3/iSpC3/iSpC3/iSpC3/GAACGACATGGCTACGA，下划线序列部分与环状DNA互补，/iSpC3/iSpC3/iSpC3/iSpC3/iSpC3/iSpC3/iSpC3/起识别作用，当检测到该处电流信号意味着开始检测待测序列），将该长链序列与实施例1中的单链环状DNA杂交，形成引物-单链DNA（primer-ssDNA）杂交产物。

2、搭建纳米孔测试装置：使用Axopatch 200B Patch Clam(Axon公司)与数据采集卡1550A（Axon公司）搭建信号采集平台，使用带有100μM的孔的槽（warner，BCH-M13）进行纳米孔实验成膜实验。

3、向进行实验的槽两边的池子中都加入1mL 300mM的KCl溶液，对槽的另一边（trans）施加120mV电压，形成双层磷脂膜，并加入MspA蛋白，形成蛋白纳米孔。在一边槽（cis）中加入5μL 10μM的primer-ssDNA杂交产物到cis端，并加入10μL 10mg/ml的野生型（WT）phi29聚合酶，以及10μL 25mM的dNTP（enzymatics公司），在常温下进行反应并记录电流变化，如图9所示。

实施例5：基于双链环进行纳米孔测序

1、取1μg phiX174（1μL，NEB公司），加入1μL ssPI酶（NEB公司），5μL 10X Smart buffer，补加43μL水至50μL。涡旋混匀后放入PCR仪中，反应程序如下所示：37℃，30分钟，65℃反应20分钟，4℃保存。

2、将表2中GL-25与GL-26序列杂交得到25μM的杂交接头产物，取上述产物13μL，加入1.6μL 25μM的接头，9μL 3×HB buffer（BGI公司），0.55μL 600U/μL的T4 DNA连接酶(BGI公司)，加水补到30μL，涡旋混匀后放入PCR仪中，反应程序如下所示：20℃，30分钟，4℃保

存。使用0.5×的AM Xpure磁珠进行纯化，并用60μL的TE进行溶解。

3、对连接产物进行PCR

取320ng的上述产物，加入10U Pfu Curbo Tur(Promega公司)、100μL PfuCx mix3 (Promega公司)、1.6μL 25mM dNTP (Enzymatics公司)、5μL 20μM YJ-1054引物(表2)、5μL 20μM YJ-1055引物(表2)，用水补到200μL。混匀后使用如下反应程序：95℃，3min，9个循环的92℃，30secs+56℃，30secs+72℃，20min，68℃，18min，以0.1秒的速率降温至4℃。

4、使用User酶处理PCR产物

取4.5ug PCR产物，加入11μL 10X Taq buffer (NEB公司)、12μL User酶(NEB公司)，加水至110μL，混匀后在PCR仪上反应60min，再加入180μL TA buffer(BGI公司)，用水补至1810μL，在70℃水浴锅中反应30min后放置室温冷却20min。

5、环化

在上述产物中加入200μL 10X smart buffer，2μL T4连接酶 (NEB公司)，用水补到2ml，室温反应2小时，使用0.5×的1:1的AM Xpure磁珠和HBB混合液进行纯化，并使用60μL TE溶解。

6、消化未环化产物

取59.1μL环化后产物，加入8.9μL 9X PS mix、9μL Plasmid-Safe酶、3μL ATP，混匀后置于PCR仪器中37℃反应1小时。使用1X AM Xpure磁珠进行纯化，并用60μL TE溶解，浓度为20ng/μL。

7、搭建纳米孔测试装置，使用Axopatch 200B Patch Clam(Axon公司)与数据采集卡1550A (Axon公司)搭建信号采集平台，使用带有100μM的孔的槽 (warner, BCH-M13) 进行纳米孔实验成膜实验。

8、向进行实验的槽两边的池子中都加入1mL 300mM的KCl溶液，并在一边槽 (cis) 中加入5μL 10μM寡核苷酸序列(序列为: SEQ ID NO: 7: AAAAAAAAAAAAAAAAAA-chelesetrol); 对槽的另一边 (trans) 施加120mV电压，用升降法形成双层磷脂膜，并加入MspA蛋白，形成蛋白纳米孔。

9、加入400ng纯化后的双链环到cis端，并加入10μL 10mg/ml的野生型phi29聚合酶，以10μL 25mM的dNTP (enzymatics公司)，在常温下进行反应并记录电流变化，如图10所示。

表2

引物名称	引物序列
------	------

GL-25	5phos/AGTCGGAGGCCAAGCGGTCTTAGGAAGACAATA GGTCCGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCAACTCCTTGG CTCACAGAACGACAT (SEQ ID NO: 8)
GL-26	CTTGGCUCACAGAACGACAUGGCTACGATCCGACTT (SEQ ID NO: 9)
YJ-1054	CTTGGCUCACAGAACGACAUGGCTAC (SEQ ID NO: 10)
YJ-1055	ATGTCGTTCTGUGAGCCAAGGAGUTG (SEQ ID NO: 11)

以上应用了具体个例对本发明进行阐述，只是用于帮助理解本发明，并不用以限制本发明。对于本发明所属技术领域的技术人员，依据本发明的思想，还可以做出若干简单推演、变形或替换。

15
权 利 要 求 书

1. 一种纳米孔测序方法，其特征在于，所述方法包括：在纳米孔测序装置中，以核酸单链环或双链环为模板核酸进行滚环扩增产生出扩增的单链，在电场的作用下，将所述扩增的单链引入纳米孔测序装置的纳米孔中，使所述扩增的单链通过所述纳米孔并产生每个碱基的电信号，通过判断不同碱基引起的电信号差异，实现对所述模板核酸上碱基序列的测定。

2. 根据权利要求1所述的纳米孔测序方法，其特征在于，所述模板核酸为核酸单链环；所述滚环扩增的反应体系包括：所述核酸单链环，与所述核酸单链环部分杂交的扩增引物，以及具有链置换活性的聚合酶、dNTPs和反应缓冲液；所述方法包括：

将所述核酸单链环与所述扩增引物杂交形成杂交产物；

将所述杂交产物加入所述纳米孔测序装置中，加入所述聚合酶、dNTPs和反应缓冲液进行滚环扩增产生出扩增的单链；

在电场的作用下，使所述扩增的单链单个碱基逐步通过所述纳米孔并产生每个碱基的电信号，通过判断不同碱基引起的电信号差异，实现对所述模板核酸上碱基序列的测定。

3. 根据权利要求2所述的纳米孔测序方法，其特征在于，所述反应体系还包括探针序列，所述探针序列上具有特定修饰，该特定修饰能够与所述纳米孔测序装置中支撑所述纳米孔的支撑层连接，所述扩增引物上包含能够与所述探针序列结合的探针识别位点；所述方法包括：

将所述扩增引物、所述探针序列和所述核酸单链环杂交形成杂交产物；

将所述杂交产物加入所述纳米孔测序装置中，使所述探针序列与所述支撑层连接，加入所述聚合酶、dNTPs和反应缓冲液进行滚环扩增产生出扩增的单链；

在电场的作用下，使所述扩增的单链单个碱基逐步通过所述纳米孔并产生每个碱基的电信号，通过判断不同碱基引起的电信号差异，实现对所述模板核酸上碱基序列的测定。

4. 根据权利要求2所述的纳米孔测序方法，其特征在于，所述反应体系还包括探针序列，所述探针序列上具有特定修饰，该特定修饰能够与所述纳米孔测序装置中支撑所述纳米孔的支撑层连接，所述扩增引物上包含能够与所述探针序列结合的探针识别位点；所述方法包括：

将所述扩增引物和所述核酸单链环杂交形成杂交产物；

向所述纳米孔测序装置中加入所述探针序列使其与所述支撑层连接，加入所述杂交产物使所述扩增引物与所述探针序列杂交，加入所述聚合酶、dNTPs和反应缓冲液进行滚环扩增产生出扩增的单链；

在电场的作用下，使所述扩增的单链单个碱基逐步通过所述纳米孔并产生每个碱基的电

信号，通过判断不同碱基引起的电信号差异，实现对所述模板核酸上碱基序列的测定。

5. 根据权利要求 3 或 4 所述的纳米孔测序方法，其特征在于，所述特定修饰选自胆固醇或生物素修饰。

6. 根据权利要求 5 所述的纳米孔测序方法，其特征在于，所述特定修饰是胆固醇修饰，所述支撑层是磷脂双分子层，所述胆固醇与所述磷脂双分子层通过亲和结合实现连接。

7. 根据权利要求 5 所述的纳米孔测序方法，其特征在于，所述特定修饰是生物素修饰，所述支撑层上具有链霉亲和素修饰，所述生物素与所述链霉亲和素通过亲和结合实现连接。

8. 根据权利要求 2 所述的纳米孔测序方法，其特征在于，所述核酸单链环上带有特殊修饰，该特殊修饰能够与所述纳米孔测序装置中支撑所述纳米孔的支撑层连接；所述方法包括：

将所述扩增引物、所述核酸单链环加入所述纳米孔测序装置中，使所述扩增引物、所述核酸单链环杂交形成杂交产物，且使所述核酸单链环通过所述特殊修饰与所述支撑层连接，加入所述聚合酶、dNTPs 和反应缓冲液进行滚环扩增产生出扩增的单链；

在电场的作用下，使所述扩增的单链单个碱基逐步通过所述纳米孔并产生每个碱基的电信号，通过判断不同碱基引起的电信号差异，实现对所述模板核酸上碱基序列的测定。

9. 根据权利要求 8 所述的纳米孔测序方法，其特征在于，所述特殊修饰选自生物素或聚乙二醇。

10. 根据权利要求 9 所述的纳米孔测序方法，其特征在于，所述特殊修饰是生物素，所述支撑层上具有链霉亲和素修饰，所述生物素与所述链霉亲和素通过亲和结合实现连接。

11. 根据权利要求 1 所述的纳米孔测序方法，其特征在于，所述模板核酸为核酸双链环；所述核酸双链环一条链带有缺口；所述滚环扩增的反应体系包括：所述核酸双链环，以及具有链置换活性的聚合酶、dNTPs 和反应缓冲液；所述方法包括：

将所述核酸双链环、聚合酶、dNTPs 和反应缓冲液加入所述纳米孔测序装置中，进行滚环扩增以从所述核酸双链环的带有缺口的单链产生出扩增的单链；

在电场的作用下，使所述扩增的单链单个碱基逐步通过所述纳米孔并产生每个碱基的电信号，通过判断不同碱基引起的电信号差异，实现对所述模板核酸上碱基序列的测定。

12. 根据权利要求 11 所述的纳米孔测序方法，其特征在于，所述反应体系还包括探针序列，所述探针序列上具有特定修饰，该特定修饰能够与所述纳米孔测序装置中支撑所述纳米孔的支撑层连接，所述核酸双链环上包含能够与所述探针序列结合的探针识别位点；所述方

法包括：

将所述核酸双链环、所述探针序列、聚合酶、dNTPs 和反应缓冲液加入所述纳米孔测序装置中，使所述探针序列通过所述特定修饰与所述支撑层连接，进行滚环扩增以从所述核酸双链环的带有缺口的单链产生出扩增的单链；

在电场的作用下，使所述扩增的单链单个碱基逐步通过所述纳米孔并产生每个碱基的电信号，通过判断不同碱基引起的电信号差异，实现对所述模板核酸上碱基序列的测定。

13. 根据权利要求 2 或 11 所述的纳米孔测序方法，其特征在于，所述具有链置换活性的聚合酶选自 phi29 聚合酶或 Bst 聚合酶。

14. 根据权利要求 1 所述的纳米孔测序方法，其特征在于，所述电场的电压是毫伏级电压。

15. 根据权利要求 1 所述的纳米孔测序方法，其特征在于，所述毫伏级电压是 10mV 以上的电压，优选 50mV 以上的电压，更优选 100mV-250mV 的电压，最优选 120mV 的电压。

16. 根据权利要求 1 所述的纳米孔测序方法，其特征在于，所述方法还包括制备所述核酸单链环或双链环的步骤，该步骤包括对 DNA 片段进行环化得到单链环或双链环。

17. 根据权利要求 16 所述的纳米孔测序方法，其特征在于，所述 DNA 片段的长度是 100bp 至 1Mbp。

18. 根据权利要求 1 所述的纳米孔测序方法，其特征在于，所述纳米孔是生物纳米孔和固态纳米孔。

19. 根据权利要求 18 所述的纳米孔测序方法，其特征在于，所述生物纳米孔是蛋白纳米孔，该蛋白纳米孔的最窄处满足使单链核酸通过的特性。

20. 根据权利要求 18 所述的纳米孔测序方法，其特征在于，所述固态纳米孔是硅基材料或者石墨烯二维材料的纳米孔，该硅基材料纳米孔的最窄处满足使单链核酸通过的特性。

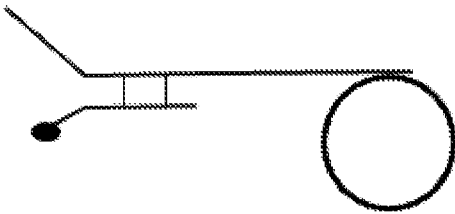


图 1

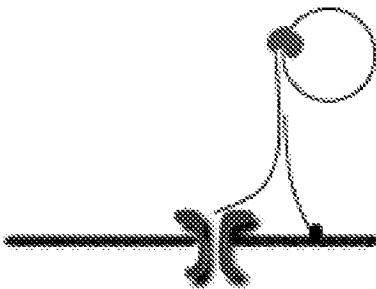


图 2

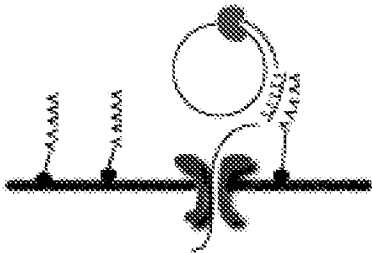


图 3

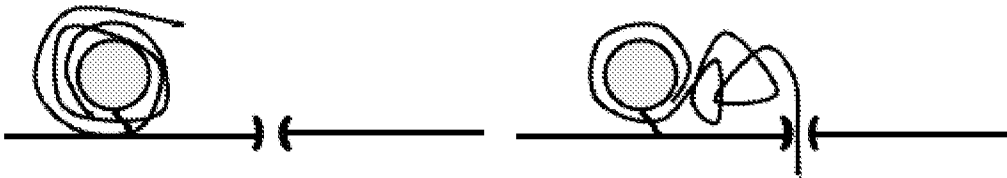


图 4

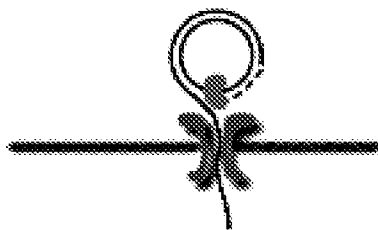


图 5

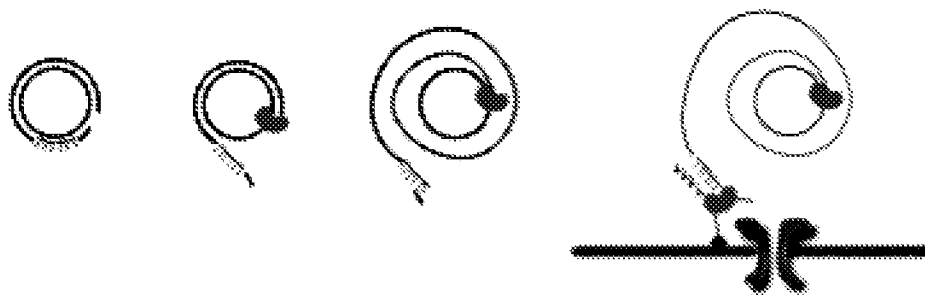


图 6

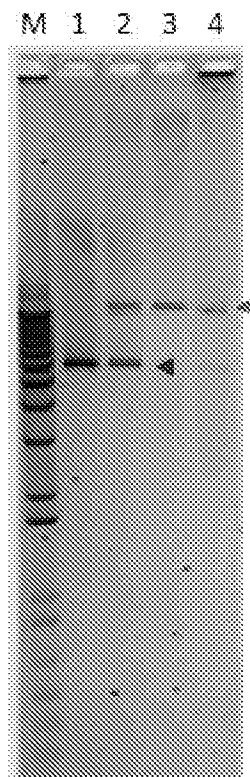


图 7

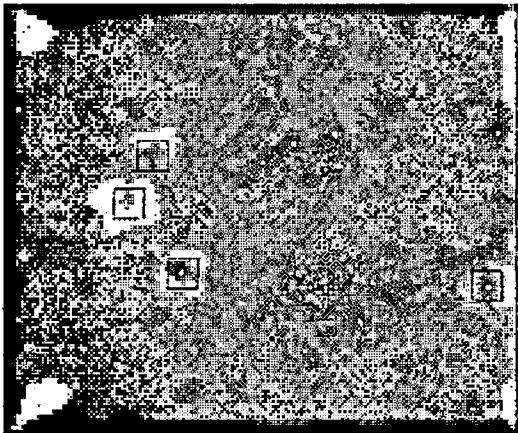


图 8

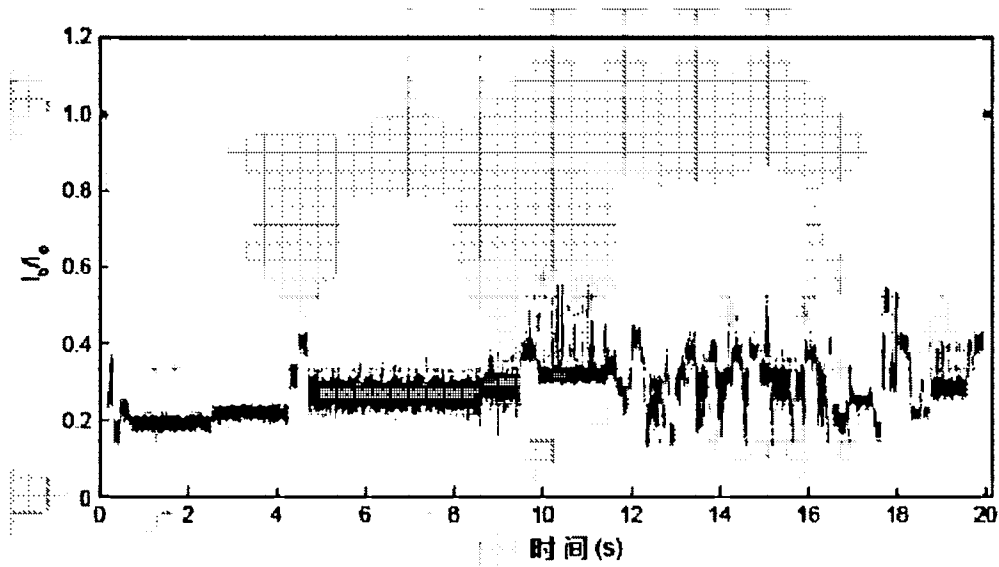


图 9

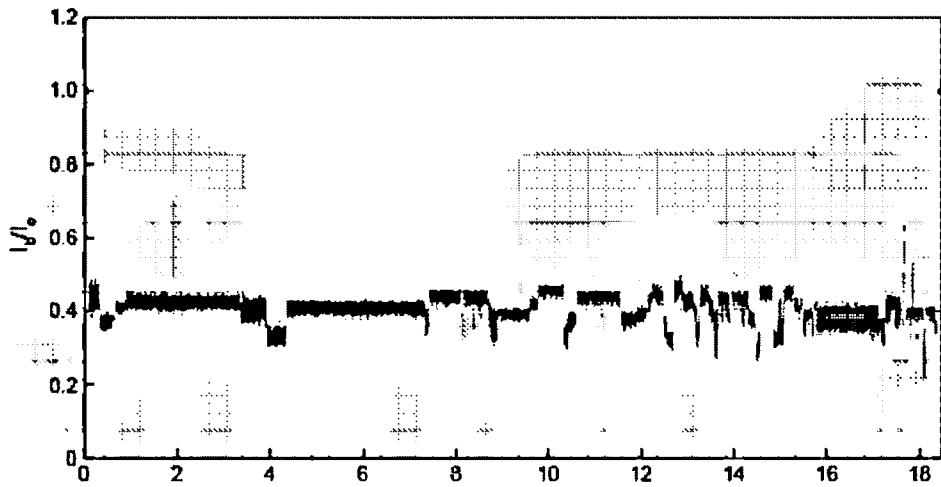


图 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/119911

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/6869(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)

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)

CNABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, WOTXT, JPTXT, USTXT, EPTXT, 万方, WANFANG, CNKI, PubMed, GenBank, ISI web of knowledge: 纳米孔, 测序, 滚环, 电场, 电信号, 链置换活性的聚合酶, 探针, 磷脂双分子层, 蛋白纳米孔, 固态纳米孔, nanopore sequencing, rolling ring, amplification, electric field, probe, phospholipid bilayer, Bio-nanopore, Solid state nanopore

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2018114706 A1 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG et al.) 28 June 2018 (2018-06-28) claim 1, and description, p. 2, last paragraph to p. 3, paragraph 2, and p. 19, paragraph 2	1-20
A	WO 2014066909 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 01 May 2014 (2014-05-01) entire document	1-20
A	CN 107727705 A (SOUTHEAST UNIVERSITY) 23 February 2018 (2018-02-23) entire document	1-20
A	CN 107835858 A (ILLUMINA, INC.) 23 March 2018 (2018-03-23) entire document	1-20
A	CN 107002130 A (BGI-SHENZHEN et al.) 01 August 2017 (2017-08-01) entire document	1-20
A	CN 104406952 A (SHANGHAI NATIONAL ENGINEERING RESEARCH CENTRE FOR NANOTECHNOLOGY CO., LTD.) 11 March 2015 (2015-03-11) entire document	1-20
A	CN 104254771 A (GENIA TECHNOLOGIES, INC.) 31 December 2014 (2014-12-31) entire document	1-20



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

16 August 2019

Date of mailing of the international search report

10 September 2019

Name and mailing address of the ISA/CN

National Intellectual Property Administration, PRC (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/119911**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 103282518 A (THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK) 04 September 2013 (2013-09-04) entire document	1-20
A	CN 101103357 A (HARVARD UNIVERSITY et al.) 09 January 2008 (2008-01-09) entire document	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/119911

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2018114706	A1	28 June 2018	CN	110062809	A	26 July 2019
WO	2014066909	A1	01 May 2014	US	2017145481	A1	25 May 2017
				US	9650670	B2	16 May 2017
				US	2015337367	A1	26 November 2015
CN	107727705	A	23 February 2018	None			
CN	107835858	A	23 March 2018	WO	2016196755	A1	08 December 2016
				AU	2016270887	A1	07 December 2017
				RU	2017139536	A3	17 July 2019
				IL	255758	D0	31 January 2018
				RU	2017139536	A	09 July 2019
				KR	20180014159	A	07 February 2018
				JP	2018520649	A	02 August 2018
				BR	112017025723	A2	14 August 2018
				US	2018155774	A1	07 June 2018
				CA	2986074	A1	08 December 2016
				MX	2017015517	A	09 November 2018
				EP	3303627	A1	11 April 2018
CN	107002130	A	01 August 2017	EP	3218519	A1	20 September 2017
				US	2018282800	A1	04 October 2018
				WO	2016077313	A1	19 May 2016
				EP	3218519	A4	25 July 2018
CN	104406952	A	11 March 2015	CN	104406952	B	29 March 2017
CN	104254771	A	31 December 2014	JP	6333179	B2	30 May 2018
				JP	2018072353	A	10 May 2018
				WO	2013109970	A1	25 July 2013
				CN	107828877	A	23 March 2018
				EP	2807476	A1	03 December 2014
				JP	2015505458	A	23 February 2015
				CN	104254771	B	12 January 2018
				US	2018223351	A1	09 August 2018
				EP	3415901	A1	19 December 2018
				EP	2807476	A4	09 December 2015
				US	2013244340	A1	19 September 2013
				CA	2861457	A1	25 July 2013
CN	103282518	A	04 September 2013	EP	2652153	A2	23 October 2013
				CN	107083421	A	22 August 2017
				CN	103282518	B	16 November 2016
				US	2013264207	A1	10 October 2013
				ES	2641871	T3	14 November 2017
				WO	2012083249	A3	11 April 2013
				WO	2012083249	A2	21 June 2012
				EP	2652153	B1	05 July 2017
				EP	2652153	A4	14 May 2014
CN	101103357	A	09 January 2008	CA	2577079	A1	23 February 2006
				JP	2011254837	A	22 December 2011
				US	2009029477	A1	29 January 2009
				CN	101103357	B	03 October 2012
				CA	2577079	C	20 May 2014
				IL	181262	D0	20 March 2008

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/119911

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		CN 102925549 A	13 February 2013
		US 7972858 B2	05 July 2011
		US 8802838 B2	12 August 2014
		US 2011257043 A1	20 October 2011
		IL 181262 A	28 June 2012
		EP 1784754 A2	16 May 2007
		JP 5190263 B2	24 April 2013
		AU 2005272823 B2	12 April 2012
		JP 2008509671 A	03 April 2008
		EP 1784754 A4	27 May 2009
		WO 2006020775 A2	23 February 2006
		WO 2006020775 A3	15 June 2006
		IL 210586 D0	31 July 2011
		AU 2005272823 A1	23 February 2006

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/119911

A. 主题的分类 C12Q 1/6869(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) 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)) CNABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, WOTXT, JPTXT, USTXT, EPTXT, 万方, CNKI, PubMed, GenBank, ISI web of knowledge: 纳米孔, 测序, 滚环, 电场, 电信号, 链置换活性的聚合酶, 探针, 磷脂双分子层, 蛋白纳米孔, 固态纳米孔, nanopore sequencing, rolling ring, amplification, electric field, probe, phospholipid bilayer, Bio-nanopore, Solid state nanopore																							
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>X</td> <td>WO 2018114706 A1 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG等) 2018年 6月 28日 (2018 - 06 - 28) 权利要求1, 说明书第2页最后1段至第3页第2段, 第19页第2段</td> <td>1-20</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2014066909 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 2014年 5月 1日 (2014 - 05 - 01) 全文</td> <td>1-20</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 107727705 A (东南大学) 2018年 2月 23日 (2018 - 02 - 23) 全文</td> <td>1-20</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 107835858 A (亿明达股份有限公司) 2018年 3月 23日 (2018 - 03 - 23) 全文</td> <td>1-20</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 107002130 A (深圳华大基因研究院等) 2017年 8月 1日 (2017 - 08 - 01) 全文</td> <td>1-20</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 104406952 A (上海纳米技术及应用国家工程研究中心有限公司) 2015年 3月 11日 (2015 - 03 - 11) 全文</td> <td>1-20</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	X	WO 2018114706 A1 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG等) 2018年 6月 28日 (2018 - 06 - 28) 权利要求1, 说明书第2页最后1段至第3页第2段, 第19页第2段	1-20	A	WO 2014066909 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 2014年 5月 1日 (2014 - 05 - 01) 全文	1-20	A	CN 107727705 A (东南大学) 2018年 2月 23日 (2018 - 02 - 23) 全文	1-20	A	CN 107835858 A (亿明达股份有限公司) 2018年 3月 23日 (2018 - 03 - 23) 全文	1-20	A	CN 107002130 A (深圳华大基因研究院等) 2017年 8月 1日 (2017 - 08 - 01) 全文	1-20	A	CN 104406952 A (上海纳米技术及应用国家工程研究中心有限公司) 2015年 3月 11日 (2015 - 03 - 11) 全文	1-20
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																					
X	WO 2018114706 A1 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG等) 2018年 6月 28日 (2018 - 06 - 28) 权利要求1, 说明书第2页最后1段至第3页第2段, 第19页第2段	1-20																					
A	WO 2014066909 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 2014年 5月 1日 (2014 - 05 - 01) 全文	1-20																					
A	CN 107727705 A (东南大学) 2018年 2月 23日 (2018 - 02 - 23) 全文	1-20																					
A	CN 107835858 A (亿明达股份有限公司) 2018年 3月 23日 (2018 - 03 - 23) 全文	1-20																					
A	CN 107002130 A (深圳华大基因研究院等) 2017年 8月 1日 (2017 - 08 - 01) 全文	1-20																					
A	CN 104406952 A (上海纳米技术及应用国家工程研究中心有限公司) 2015年 3月 11日 (2015 - 03 - 11) 全文	1-20																					
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。																							
<table border="0"> <tr> <td> * 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 </td> <td> “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 </td> </tr> </table>			* 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																			
* 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		国际检索报告邮寄日期																					
2019年 8月 16日		2019年 9月 10日																					
ISA/CN的名称和邮寄地址		授权官员																					
中国国家知识产权局(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		刘新蕾 电话号码 86-(10)-53962097																					

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 104254771 A (吉尼亚科技公司) 2014年 12月 31日 (2014 - 12 - 31) 全文	1-20
A	CN 103282518 A (纽约哥伦比亚大学理事会) 2013年 9月 4日 (2013 - 09 - 04) 全文	1-20
A	CN 101103357 A (哈佛学院院长等) 2008年 1月 9日 (2008 - 01 - 09) 全文	1-20

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/119911

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	2018114706	A1	2018年 6月 28日	CN	110062809	A	2019年 7月 26日
WO	2014066909	A1	2014年 5月 1日	US	2017145481	A1	2017年 5月 25日
				US	9650670	B2	2017年 5月 16日
				US	2015337367	A1	2015年 11月 26日
CN	107727705	A	2018年 2月 23日	无			
CN	107835858	A	2018年 3月 23日	WO	2016196755	A1	2016年 12月 8日
				AU	2016270887	A1	2017年 12月 7日
				RU	2017139536	A3	2019年 7月 17日
				IL	255758	D0	2018年 1月 31日
				RU	2017139536	A	2019年 7月 9日
				KR	20180014159	A	2018年 2月 7日
				JP	2018520649	A	2018年 8月 2日
				BR	112017025723	A2	2018年 8月 14日
				US	2018155774	A1	2018年 6月 7日
				CA	2986074	A1	2016年 12月 8日
				MX	2017015517	A	2018年 11月 9日
				EP	3303627	A1	2018年 4月 11日
CN	107002130	A	2017年 8月 1日	EP	3218519	A1	2017年 9月 20日
				US	2018282800	A1	2018年 10月 4日
				WO	2016077313	A1	2016年 5月 19日
				EP	3218519	A4	2018年 7月 25日
CN	104406952	A	2015年 3月 11日	CN	104406952	B	2017年 3月 29日
CN	104254771	A	2014年 12月 31日	JP	6333179	B2	2018年 5月 30日
				JP	2018072353	A	2018年 5月 10日
				WO	2013109970	A1	2013年 7月 25日
				CN	107828877	A	2018年 3月 23日
				EP	2807476	A1	2014年 12月 3日
				JP	2015505458	A	2015年 2月 23日
				CN	104254771	B	2018年 1月 12日
				US	2018223351	A1	2018年 8月 9日
				EP	3415901	A1	2018年 12月 19日
				EP	2807476	A4	2015年 12月 9日
				US	2013244340	A1	2013年 9月 19日
				CA	2861457	A1	2013年 7月 25日
CN	103282518	A	2013年 9月 4日	EP	2652153	A2	2013年 10月 23日
				CN	107083421	A	2017年 8月 22日
				CN	103282518	B	2016年 11月 16日
				US	2013264207	A1	2013年 10月 10日
				ES	2641871	T3	2017年 11月 14日
				WO	2012083249	A3	2013年 4月 11日
				WO	2012083249	A2	2012年 6月 21日
				EP	2652153	B1	2017年 7月 5日
				EP	2652153	A4	2014年 5月 14日
CN	101103357	A	2008年 1月 9日	CA	2577079	A1	2006年 2月 23日
				JP	2011254837	A	2011年 12月 22日
				US	2009029477	A1	2009年 1月 29日
				CN	101103357	B	2012年 10月 3日
				CA	2577079	C	2014年 5月 20日
				IL	181262	D0	2008年 3月 20日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/119911

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 102925549 A	2013年 2月 13日
		US 7972858 B2	2011年 7月 5日
		US 8802838 B2	2014年 8月 12日
		US 2011257043 A1	2011年 10月 20日
		IL 181262 A	2012年 6月 28日
		EP 1784754 A2	2007年 5月 16日
		JP 5190263 B2	2013年 4月 24日
		AU 2005272823 B2	2012年 4月 12日
		JP 2008509671 A	2008年 4月 3日
		EP 1784754 A4	2009年 5月 27日
		WO 2006020775 A2	2006年 2月 23日
		WO 2006020775 A3	2006年 6月 15日
		IL 210586 D0	2011年 7月 31日
		AU 2005272823 A1	2006年 2月 23日