

(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 9 月 6 日 (06.09.2024)



(10) 国际公布号
WO 2024/178682 A1

(51) 国际专利分类号:
C12Q 1/6869 (2018.01) **G01N 21/64** (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/079100

(22) 国际申请日: 2023 年 3 月 1 日 (01.03.2023)

(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: 韦小芳(**WEI, Xiaofang**); 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)。龚梅花(**GONG, Meihua**); 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)。周爽(**ZHOU, Shuang**); 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)。赵微(**ZHAO, Wei**); 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)。缪海涛(**MIAO, Haitao**); 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)。王静静(**WANG, Jingjing**); 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)。罗银铃(**LUO, Yinling**); 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)。樊帆(**FAN, Fan**); 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)。赵胜明(**ZHAO, Shengming**); 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)。李计广(**LI, Jiguang**); 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))。

(54) **Title:** METHOD FOR DETERMINING REACTION TIME IN SEQUENCING, AND SEQUENCING METHOD AND SYSTEM

(54) 发明名称: 确定测序中反应时间的方法和测序方法及系统

(57) **Abstract:** A sequencing method, and a sequencing method and system. The sequencing method comprises: (1) reacting a target nucleic acid immobilized on the surface of a chip with a polymerization reagent, and incorporating a nucleotide or a nucleotide analog to obtain a reaction product; (2) detecting fluorescent signals; (3) reacting the reaction product with a regeneration reagent to obtain a product that can be used for the next round of polymerization reaction; (4) repeating step (1) to step (3); and continuing in this manner for multiple rounds of cycles to finally obtain sequencing data, wherein the reaction time in at least one of step (1) and step (3) is calculated by a predetermined cycle number-reaction time relationship.

(57) 摘要: 一种测序方法和测序方法及系统, 该测序方法包括: (1) 将固定于芯片表面的目标核酸与聚合试剂进行反应, 掺入核苷酸或核苷酸类似物, 得到反应产物; (2) 检测荧光信号; (3) 将反应产物与再生试剂进行反应, 获得可以进行下一轮聚合反应的产物; (4) 重复步骤 (1) 到步骤 (3), 以此类推, 进行多轮循环, 最终获得测序数据; 其中, 步骤 (1) 和步骤 (3) 至少之一中反应的时间是通过预先确定的循环数-反应时间关系计算获得。

WO 2024/178682 A1

确定测序中反应时间的方法和测序方法及系统

技术领域

本公开涉及生物领域。具体地，本公开涉及确定测序中反应时间的方法和测序方法及系统。

背景技术

二代测序技术因其费用低、测序速度快及高通量等优点，是目前应用最为广泛的测序技术。二代测序引入了可逆阻断基团，同时在碱基上携带荧光标记分子，通过增强荧光信号强度从而读出 DNA 序列，但这样的技术存在一定的限制，随着读长增长，荧光信号会随之下降，导致碱基测序质量下降，限制了二代测序的读长，因此二代测序的长读长测序是一个很大的挑战，想要获得一个准确的长读长测序是非常困难的。

测序过程中在聚合酶的作用下，互补配对的核苷酸会结合到 DNA 链上，因为核苷酸带有可逆阻断基团，每个循环只会结合一种核苷酸，对芯片进行扫描后读出 DNA 的序列，在这个循环完成后，加入化学试剂将可逆阻断基团和荧光基团切断进行再生，进行下一个循环。

核苷酸在聚合酶的作用下结合到 DNA 模板链上，需要一定的反应温度和反应时间，同时可逆阻断基团和荧光基团切断的反应过程也需要一定的反应温度和反应时间；其中不同的反应时间可能影响到聚合和再生（切除）的效果，随着测序读长增长，由于化学试剂和 DNA 模板链结构的影响，反应的效率逐渐降低。

因此，如何确定测序过程中反应时间仍有待研究。

发明内容

本公开旨在至少在一定程度上解决现有技术中存在的技术问题。

需要说明的是，本公开是基于申请人的下列发现而完成的：

聚合反应和再生反应都需要一定的反应时间，现有技术是从起始循环到终止循环，使用相同的聚合反应时间和相同的再生反应时间，并且对于双端测序，一链和二链也使用相同的反应时间。

随着测序读长增长，反应试剂影响 DNA 模板链结构、光损伤以及酶活性的降低，导致聚合和再生的效率降低。使用相同的反应时间，会导致测序前端时间的浪费，因为在测序短读长时，在较短的反应时间内即可完成反应，但是使用测序后端的反应时间可能会导致

测序短读长时时间的浪费，而到了测序后端（如从第 150 个循环开始），反应效率下降，仍然使用短循环的反应时间会导致反应不充分，测序质量下降。现有技术在使用总时间相同的情况下，反应时间分配不合理导致测序反应不充分，测序质量结果不佳。

如果为了得到较好的结果而盲目的在测序后期增加测序的反应时间，虽然有时在短读
5 长上可以得到质量较好的数据，但是从长远来看，对于长读长的测序会带来一定的弊端，由于过度的增加反应时间，使核酸序列在高温下处于较长的时间，会对核酸序列造成不可逆的伤害，使其不能够维持特有的结构特征完成测序，造成测序质量变差。

同样地，在测序过程中若使用相同的反应温度，也容易出现因反应温度低而造成反应不充分或者因反应温度高而造成核酸序列损伤，影响测序质量。

理论上，DNA 模板链在高温下反应的时间越长，对于核酸序列的伤害更大；累计反应
10 时间或温度增加，对核酸序列的损伤更严重。针对双端测序，一链的反应时间或反应温度会影响一链的结果、二链的结果以及整体的结果，二链的反应时间或反应温度会影响二链的结果和整体的结果；针对单端测序，其反应时间或反应温度将直接影响该测序结果的好坏。反应时间或反应温度分配不好导致前端循环反应时间的浪费，后端循环反应不充分，
15 反应时间长、准确度低，测序时长增加。

有鉴于此，申请人针对不同循环采用不同的反应时间或反应温度，构建循环数-反应时间关系和循环数-反应温度关系，基于该预先构建的关系合理分配不同循环的反应时间和反应温度，使得每个循环的反应更加充分，同时减少核酸序列的损伤。由此，本公开解决了
20 反应时间过长或过短、反应温度过高或过低引起的问题，可以较好的平衡反应时间，适用于长读长的测序，在测序前期保证反应时间较短的情况下，保护核酸序列不受高温损伤，同时测序质量也不会下降很多；也为测序后期保留充分的余地，保障整体测序水平，解决测序前期对测序后期以及整体测序的影响。

为此，在本公开的一个方面，本公开提出了一种测序方法。根据本公开的实施例，所述测序方法包括：（1）将固定于芯片表面的目标核酸与聚合试剂进行反应，掺入核苷酸或
25 核苷酸类似物，得到反应产物；（2）检测荧光信号；（3）将所述反应产物与再生试剂进行反应，获得可以进行下一轮聚合反应的产物；（4）重复步骤（1）到步骤（3），以此类推，进行多轮循环，最终获得测序数据；其中，所述步骤（1）和步骤（3）至少之一中所述反应的时间是通过预先确定的循环数-反应时间关系计算获得。

根据本公开实施例的方法中，针对不同循环采用不同的反应时间，构建循环数-反应时间
30 关系，基于该预先构建的关系合理分配不同循环的反应时间，使得每个循环的反应更加充分，同时减少反应中长时间的高温对核酸的损伤，提高测序质量，有利于长读长的测序。

根据本公开的一种实施例，上述测序方法还可以具有下列附加技术特征：

根据本公开的一种实施例，将所述循环的总循环数划分为 N 个循环段，每个所述循环段内各循环的反应时间相同，各个所述循环段之间的反应时间不同； N 为大于 1 的整数。

根据本公开的一种实施例，每个所述循环段的反应时间随着循环段数的增加而增加。

5 根据本公开的一种实施例，随着循环段数的增加，各个所述循环段之间的反应时间呈指数函数或者线性函数分布方式增加。

根据本公开的一种实施例，所述线性函数分布方式选自等差数列或者等比数列分布方式。

根据本公开的一种实施例，所述循环数-反应时间关系选自如下公式：反应时间(s)=
10 $A+(B-A)/N \times (C-1)$ ；其中， A 表示第一个循环的反应时间常数， B 表示最后一个循环的反应时间常数， C 表示当前测序循环数， N 表示测序总循环数；其中反应时间为公式结果取整。

根据本公开的一种实施例，确定所述循环数-反应时间关系的方法包括：在各个循环的反应时间相同的条件下，进行步骤（1）~（4），根据获得的测序错误率，得到归一化曲线；
15 将所述归一化曲线中每个循环的归一化数值乘以系数 P ，并将所得归一化数值与循环数构建指数曲线，所述系数 P 为最后一个循环预计增加的反应时间；将所述指数曲线对应的指数公式中加上第一个循环所需反应时间，得到所述循环数-反应时间关系。

根据本公开的一种实施例，每轮循环中，所述反应包括将所述芯片浸泡于存放有聚合试剂或再生试剂的反应容器中，所述反应完成后，将所述测序芯片转移至另外的反应容器
20 中；随着循环次数增加，每个反应容器内发生浸泡次数增加，每次浸泡的时间延长。

根据本公开的一种实施例，每次浸泡的时间按照下列公式确定：浸泡时间（s）
= $50+10(X-1)/(Y-1)$ ， X 为同一反应容器浸泡的次数， Y 为同一反应容器总浸泡次数。

根据本公开的一种实施例，所述步骤（1）和步骤（3）至少之一中所述反应的温度是通过预先确定的循环数-反应温度关系计算获得。将所述循环的总循环数划分为 N 个循环
25 段，每个所述循环段内各循环的反应温度相同，各个所述循环段之间的反应温度不同； N 为大于 1 的整数；每个所述循环段的反应温度随着循环段数的增加而增加；随着循环段数的增加，各个所述循环段之间的反应温度呈指数函数或者线性函数分布方式增加；所述线性函数分布方式选自等差数列或者等比数列分布方式。

根据本公开的一种实施例，进行多轮循环后，采用具有链置换活性的 DNA 聚合酶对固
30 定在芯片上的目标核酸也可以称之为链，进行多重置换扩增反应，得到互补链也可以称之为二链；将所述二链进行步骤（1）~（4）；其中，所述一链每次进行的反应时间和/或反

应温度与所述二链每次进行相应的反应时间和/或反应温度不同。

在本公开的又一方面，本公开提出了一种测序系统。根据本公开的一种实施例，所述测序系统包括：芯片；测序设备，所述测序设备用于对固定于所述芯片表面的目标核酸进行测序；一个或多个处理器，所述一个或多个处理器被配置为用于执行：（1）使固定于芯片表面的目标核酸与聚合试剂进行反应，掺入核苷酸或核苷酸类似物，得到反应产物；（2）检测荧光信号；（3）使所述反应产物与再生试剂进行反应，获得可以进行下一轮聚合反应的产物；（4）重复步骤（1）到步骤（3），以此类推，进行多轮循环，最终获得测序数据；其中，所述步骤（1）和步骤（3）至少之一中所述反应的时间是通过预先确定的循环数-反应时间关系计算获得。

根据本公开的一种实施例，所述一个或多个处理器被配置为用于执行：将所述循环的总循环数划分为 N 个循环段，每个所述循环段内各循环的反应时间相同，各个所述循环段之间的反应时间不同；N 为大于 1 的整数；随着循环段数的增加，各个所述循环段之间的反应时间呈指数函数或者线性函数分布方式增加。

根据本公开的一种实施例，所述一个或多个处理器被配置为用于执行按照如下公式确定反应时间：反应时间(s)= $A+(B-A)/D \times (C-1)$ ；其中，A 表示第一个循环的反应时间常数，B 表示最后一个循环的反应时间常数，C 表示当前测序循环数，D 表示测序总循环数；其中反应时间为公式结果取整；或者所述一个或多个处理器被配置为用于执行：根据在各个循环的反应时间相同的条件下进行测序获得的测序错误率，得到归一化曲线；将所述归一化曲线中每个循环的归一化数值乘以系数 P，并将所得归一化数值与循环数构建指数曲线，所述系数 P 为最后一个循环预计增加的反应时间；将所述指数曲线对应的指数公式中加上第一个循环所需反应时间，得到所述循环数-反应时间关系。

根据本公开的一种实施例，所述一个或多个处理器被配置为用于执行的每轮循环反应中的所述反应包括：使所述芯片浸泡于存放有聚合试剂或再生试剂的反应容器中，所述反应完成后，使所述芯片转移至另外的反应容器中；随着循环次数增加，每个反应容器内发生浸泡次数的增加，每次浸泡的时间延长。

根据本公开的一种实施例，所述一个或多个处理器被配置为用于执行按照下列公式确定每次浸泡的时间：浸泡时间(s)= $50+10(X-1)/(Y-1)$ ，X 为同一反应容器浸泡的次数，Y 为同一反应容器总浸泡次数。

根据本公开的一种实施例，所述步骤（1）和步骤（3）至少之一中所述反应的温度是通过预先确定的循环数-反应温度关系计算获得；所述一个或多个处理器被配置为用于执行：将所述循环的总循环数划分为 N 个循环段，每个所述循环段内各循环的反应温度相同，

各个所述循环段之间的反应温度不同；N 为大于 1 的整数；每个所述循环段的反应温度随着循环段数的增加而增加；随着循环段数的增加，各个所述循环段之间的反应温度呈指数函数或者线性函数分布方式增加；所述线性函数分布方式选自等差数列或者等比数列分布方式。

5 在本公开的又一方面，本公开提出了一种电子设备。根据本公开的一种实施例，所述电子设备包括：存储器、一个或多个处理器；所述存储器与所述一个或多个处理器耦合，所述存储器用于存储计算机程序代码，所述计算机程序代码包括计算机指令，所述一个或多个处理器调用所述计算机指令以使得所述电子设备执行如前面所述测序方法。

10 在本公开的又一方面，本公开提出了一种计算机可读存储介质，包括计算机指令。根据本公开的一种实施例，当所述计算机指令在电子设备上运行时，使得所述电子设备执行如前面所述测序方法。

在本公开的又一方面，本公开提出了一种计算机程序产品。根据本公开的实施例，当所述计算机程序产品在计算机上运行时，使得计算机执行如前面所述测序方法。

15 本公开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，或通过本公开的实践了解到。

附图说明

本公开的上述和/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：

20 图 1 显示了根据本公开一个实施例的测序方法流程示意图；

图 2 显示了根据本公开一个实施例的循环数-线性孵育时间曲线图；

图 3 显示了根据本公开一个实施例的循环数-指数孵育时间曲线图，a 表示测序后一链的错误率曲线；b 表示错误率曲线归一化后获得的曲线；c 表示通过归一化值 $\times$ 系数 B，获得的指数曲线；

25 图 4 显示了根据本公开一个实施例的测序系统示意图；

图 5 显示了根据本公开一个实施例的电子设备结构示意图；

图 6 显示了根据本公开实施例 1 的恒定孵育和梯度孵育曲线图，横坐标为循环数，纵坐标为每个循环的 Q30% 的值，表示 Q30% 随着循环数增加而下降的情况，在一定程度上可以代表测序结果的好坏程度；

30 图 7 显示了根据本公开实施例 2 的孵育时间曲线图；

图 8 显示了根据本公开实施例 2 的 Q30% 值分析图，横坐标为不同的孵育时间方式，

纵坐标为 Q30%指标;

图 9 显示了根据本公开实施例 2 的每个循环的 Q30%值分析图,横坐标为循环数,纵坐标为每个循环的 Q30%的值,表示 Q30%随着循环数增加而下降的情况;

图 10 显示了根据本公开实施例 3 的每个循环的 Q30%值分析图,横坐标为循环数,纵坐标为每个循环的 Q30%的值,表示 Q30%随着循环数增加而下降的情况,在一定程度上可以代表测序结果的好坏程度;

图 11 显示了根据本公开实施例 4 的中恒定反应温度和梯度反应温度对测序质量下降的比对分析图,横坐标为循环数,纵坐标为每个循环的 Q30%的值,表示 Q30%随着循环数增加而下降的情况,在一定程度上可以代表测序结果的好坏程度。

具体实施方式

下面详细描述本公开的实施例。下面描述的实施例是示例性的,仅用于解释本公开,而不能理解为对本公开的限制。

需要说明的是,术语“第一”、“第二”仅用于描述目的,而不能理解为指示或暗示相对重要性或者隐含指明所指示的技术特征的数量。由此,限定有“第一”、“第二”的特征可以明示或者隐含地包括一个或者更多个该特征。进一步地,在本公开的描述中,除非另有说明,“多个”的含义是两个或两个以上。

在本文中所披露的范围的端点和任何值都不限于该精确的范围或值,这些范围或值应当理解为包含接近这些范围或值的值。对于数值范围来说,各个范围的端点值之间、各个范围的端点值和单独的点值之间,以及单独的点值之间可以彼此组合而得到一个或多个新的数值范围,这些数值范围应被视为在本文中具体公开。

在本文中,术语“包括”为开放式表达,即包括本公开所指明的内容,但并不排除其他方面的内容。

本公开提出了测序方法、确定测序中反应时间的方法、测序系统、电子设备和计算机可读存储介质,下面将分别对其进行详细描述。

测序方法

在本公开的一个方面,本公开提出了一种测序方法。根据本公开的实施例,参见图 1,该测序方法包括:S100 将目标核酸与聚合试剂进行反应、S200 检测荧光信号、S300 将反应产物与再生试剂进行反应、S400 重复步骤 S100 到 S300,下面将分别进行详细描述。

S100 将目标核酸与聚合试剂进行反应

在该步骤中,将固定于芯片表面的目标核酸与聚合试剂进行反应(在本发明中,亦成

为“聚合反应”), 掺入核苷酸或核苷酸类似物, 得到反应产物。在模板指导下, 聚合试剂不断将 dNTP 加到引物/前一个掺入的核苷酸或核苷酸类似物的 3' -OH 末端, 使引物延长, 合成出新的互补的 DNA 链。

在本公开中, 术语“聚合试剂”是指参与聚合反应所需试剂, 凡是本领域所公开的聚合反应发生的试剂均包含在本公开中, 例如 dNTP、DNA 聚合酶、缓冲液。术语“聚合”既可以包括链合成, 即发生链延伸, 也可以包括补平过程, 即弥补链合成过程中 3' -OH 端未结合上带有可逆阻断基团和荧光基团的 dNTP, 在补平过程中可以进一步结合, 让所有 reads 信号同步。

根据本公开的一种实施例, 步骤 100 还可以包括: 利用清洗试剂清洗合成产物, 具体地, 将连接有合成产物的测序芯片于含有清洗试剂的反应容器中, 清洗芯片上游离的反应试剂。

在本公开中, 术语“反应容器”是指测序过程中, 可以进行聚合以及去除可逆阻断基团和荧光基团的反应场所, 对于具体的反应容器的种类不作严格限定, 例如, 可以为测序平台上的试剂槽。

S200 检测荧光信号

通过检测荧光信号, 基于信号颜色和强度等, 获知测序读段信息。

S300 将反应产物与再生试剂进行反应

在该步骤中, 将反应产物与再生试剂进行反应(在本公开中, 亦称为“再生反应”), 获得可以进行下一轮聚合反应的产物。通过将反应产物与再生试剂反应, 可以去除反应产物上携带的可逆阻断基团和荧光基团。由此, 有助于发生下一轮的聚合反应。

在本公开中, 术语“阻断基团”通过与脱氧核糖的 3' 羟基或其它位点结合, 导致脱氧核糖无法同后续的 dNTP 形成磷酸二酯键或形成空间位阻使聚合酶无法进行聚合反应, 进而终止链延伸。当将其可逆地去除, 可以恢复 3' 端羟基结构, 可以与后续 dNTP 形成磷酸二酯键, 进而完成链延伸。或将其可逆的去除, 恢复 DNA 的空间结构, 可以与后续 dNTP 和聚合酶发生聚合反应, 进而完成链延伸。阻断基团可以是任何本领域中用于阻断 dNTP 的基团, 典型但非限定性的包括叠氮亚甲基, 有一些荧光基团也可以作为阻断基团。其它的可用阻断基团还包括例如国际申请 WO2014139596A1 中公开的那些阻断基团。本公开对阻断基团的种类没有特别限定, 任何本领域中用于阻断 dNTP 的 3' 羟基的基团都可以作为本公开中的阻断基团。这些阻断基团都能够可逆地从 dNTP 上脱落下来。

本公开对于“再生试剂”的类型不作严格限定, 凡是本领域所公开的可以去除可逆阻断基团和荧光基团的物质均包含在本公开中。

S400 重复步骤 S100 到 S300

在该步骤中，重复步骤 S100 到步骤 S300，以此类推，进行多轮循环，最终获得测序数据。

根据本公开的一种实施例，步骤 S100 和 S300 至少之一中反应的时间是通过预先确定
5 的循环数-反应时间关系计算获得的。根据本公开实施例的方法中，针对不同循环采用不同的反应时间，构建循环数-反应时间关系，基于该预先构建的关系合理分配不同循环的反应时间，使得每个循环的反应更加充分，同时减少反应中长时间的高温对核酸的损伤，提高测序质量，有利于长读长的测序。

根据本公开的一种实施例，将循环的总循环数划分为 N 个循环段，每个循环段内各循
10 环的反应时间相同，各个循环段之间的反应时间不同；N 为大于 1 的整数。

不同循环可采用不同的反应时间，循环可以按照一定规则分成不同循环段，循环段内的循环数采用相同的反应时间，不同循环段之间的反应时间不一致；也可以是每个循环其反应时间都不一致，反应时间与循环数按照一定的公式进行，即总循环数与循环段数相同。

根据本公开的一种实施例，每个循环段的反应时间随着循环段数的增加而增加。根据
15 本公开的另一种实施例，随着循环段数的增加，各个循环段之间的反应时间呈等差数列或者等比数列分布方式增加。

在测序反应过程中，从起始循环到终止循环，聚合及再生反应的反应时间可以按照在一定范围内梯度增加的方式进行，梯度增加可以是按照等差数列或等比数列的梯度或其他方式进行，具体如下：

20 1.先设置分段的数目，可以将总的循环数分成不同段，循环段内的循环数采用相同的反应时间，不同循环段之间的反应时间不一致；可以有平分的方式进行分段，也可以自定义分段；

1)平分的分段规则有：

如总循环数是 300，可将 300 个循环平分成 X 段，则每个循环段的循环数是 Y， $Y=300/X$ ，
25 具体的例子有，一种分段方式是将 300 个循环分为 2 个循环段，每个循环段为 150 个循环；另一种分段方式是将 300 循环分为 5 个循环段，每个循环段为 60 个循环；再一种方式是将 300 循环分为 6 个循环段，每个循环段为 50 个循环；等等类似这样的分段方式。

2)自定义的分段规则有：

如 300 个循环数，可以分为第一个循环段是 1-150 个循环，第二个循环段是 151-200 个
30 循环，第三个循环段是 201-250 个循环，第四个循环段是 251-300 个循环；等等类似的分段方式；段数和段内的循环数可根据需要进行调整，不需要每段的循环数一致。

2.设置好分段后,同一循环段内的循环采用相同的反应时间,不同循环段的之间采用不同的反应时间,反应时间可以按照一定的等差数列或等比数列的来增加反应的时间,也可以是自定义每个循环段的反应时间。

1)等差数列的递增方式可以是:

5 如 300 循环分为 5 个循环段,每个循环段为 60 个循环,反应时间在 20s-100s 的范围内按照等差数列的梯度增加方式,则 5 个循环段的反应时间分别是 20s、40s、60s、80s 和 100s。以上只是举例说明,分段方式和反应时间可以是其他类似设置。

2)等比数列的递增方式可以是:

10 如 200 循环分为 4 个循环段,每个循环段为 50 个循环,反应时间在 15s-120s 的范围内按照等比数列的梯度增加方式,则 4 个循环段的反应时间分别是 15s、30s、60s 和 120s。以上只是举例说明,分段方式和反应时间可以是其他类似设置。

3)自定义的递增方式可以是:

15 如 300 循环分为 5 个循环段,每个循环段为 60 个循环,反应时间在 20s-100s 的范围内梯度增加方式,则 5 个循环段的反应时间分别是 20s、30s、60s、80s 和 100s。以上只是举例说明,分段方式和反应时间可以是其他类似设置。

聚合及再生反应的分段方式和反应时间设置可以不同,可分别进行编辑设置。

一链和二链的分段方式和反应时间设置可以不同,可分别进行编辑设置。

举例说明,如下表 1 所示:

表 1: 梯度反应的一种设置方式

循环数	1-50	51-100	101-150	151-200	201-250	251-300
反应时间(s)	20	40	60	80	100	120

20 根据本公开的一种实施例,循环数-反应时间关系选自如下公式:反应时间(s)= $A+(B-A)/D \times (C-1)$;其中,A 表示第一个循环的反应时间常数,B 表示最后一个循环的反应时间常数,C 表示当前测序循环数,N 表示测序总循环数;其中反应时间为公式结果取整。

25 在测序反应过程中,从起始循环到终止循环,聚合及再生反应的反应时间按照在一定范围内的线性反应的方式进行:

按照如下公式确定每一当前循环的曝光时间:

$$\text{反应时间(s)} = A + (B - A) / D \times (C - 1)$$

30 其中,A 表示第一个循环的反应时间常数,B 表示最后一个循环的反应时间常数,C 表示当前测序循环数,D 表示测序总循环数;其中反应时间为公式结果取整。

聚合及再生反应的线性反应时间设置可以不同，可分别进行编辑设置。

一链和二链的线性反应时间设置可以不同，可分别进行编辑设置。

图 2 所示的是一种线性反应的反应时间设置情况，但不代表本公开只有这一种线性反应的方式。

5 根据本公开的一种实施例，确定循环数-反应时间关系的方法包括：在各个循环的反应时间相同的条件下，进行步骤（1）～（4），根据获得的测序错误率，得到归一化曲线；将归一化曲线中每个循环的归一化数值乘以系数 P，并将所得归一化数值与循环数构建指数曲线，系数 P 为最后一个循环预计增加的反应时间；将指数曲线对应的指数公式中加上第一个循环所需反应时间，得到循环数-反应时间关系。

10 在测序反应过程中，从起始循环到终止循环，聚合及再生反应的反应时间按照在一定范围内的指数反应的方式进行，指数反应的公式可以按照以下方法设置，但不局限于只有这种设置方式：

在固定反应时间的条件下进行测序，根据测序的错误率曲线，对最后一个循环的错误率归一化，归一化的系数为 Q，则所有循环相应的错误率除以系数 Q，获得归一化曲线；

15 进一步地，对每个循环的归一化数值*P，系数 P 为最后一个循环计划增加的孵育时间；获得乘以 P 系数的指数曲线；

进一步地，使用 Excel、MATLAB 或其他工具求指数曲线的公式，获得指数公式；

进一步地，在指数公式的基础上加上第一个循环需要反应的时间，则获得一个指数反应时间的曲线。

20 使用 Excel、MATLAB 或其他工具求指数曲线的公式，求公式得：

$$S=a*K^3+b*K^2+c;$$

在该公式基础上加上第一个循环的孵育时间 T，则指数孵育得公式为：

$S=a*K^3+b*K^2+c$ ，在该例子中 $T=50$ ，即指数孵育的公式为： $S=a*K^3+b*K^2+c+50$ ，其中 K 为当前循环，S 为该循环的孵育时间，a、b 为常数。

25 图 3 所示的是一种指数反应的时间设置情况，但并不代表本公开只有这一种指数反应的方式。

本公开中的聚合及再生反应的指数反应的设置方式可以不同，可分别进行编辑设置。

进一步地，一链和二链的指数反应时间设置可以不同，可分别进行编辑设置。

本公开的测序方法可以是单端测序或双端测序方法，包括使用经标记或未经标记的核苷酸通过引物延伸进行测序，如边测序边连接或者焦磷酸测序等，例如使用 Sanger 双脱氧法、纳米孔或本领域的“NexGen”测序方法中的任一种(例如，使用 MGI 的测序平台、ROCHE

454 测序平台、ILLUMINATM SOLEXATM 测序平台、LIFE TECHNOLOGIES/APPLIED BIOSYSTEMS 的 SOLIDTM 测序平台、PACIFIC BIOSCIENCES 的 SMRTTM 测序平台、POLLONATOR Polony 测序平台、COMPLETE GENOMICS 测序平台、INTELLIGENT BIOSYSTEMS 的测序平台、HELICOS 测序平台或本领域的任何其它测序仪和系统) 实现。

- 5 本公开对于步骤 S100 和 S300 的聚合反应和再生反应的发生方式不做严格限定，一些测序平台是通过注射泵将反应试剂或者再生试剂打在测序芯片上，例如 MGI 的测序平台：MGISEQ-200RS、MGISEQ-2000RS、DNBSEQ-T7、DNBSEQ-G99、DNBSEQ-E25 等平台；也有一些测序平台是采用浸泡方式，即浸没式生化平台，是将芯片浸泡在含有反应试剂或者再生试剂的反应容器中，待某一反应完成后，将芯片转移至另一反应容器中完成下一步
- 10 操作，例如 DNBSEQ-T10×4RS 测序平台。

根据本公开的一种实施例，每轮循环中，反应包括将芯片浸泡于存放有聚合试剂或再生试剂的反应容器中，反应完成后，将测序芯片转移至另外的反应容器中；随着循环次数增加，每个反应容器内发生浸泡次数增加，每次浸泡的时间延长。

- 根据本公开的一种实施例，每次浸泡的时间按照下列公式确定：浸泡时间 (s)
- 15 $=50+10(X-1)/(Y-1)$ ，X 为同一反应容器浸泡的次数，Y 为同一反应容器总浸泡次数。

- 当在测序平台上使用试剂浸泡的方式操作时，在芯片转移过程中，会携带少量残留液进入新的反应容器（例如试剂槽）中，导致新的反应容器中聚合试剂或者再生试剂浓度有所降低。而且加热时间的过程中，一些关键试剂槽中的试剂有效成分也会发生变化。为了使得反应充分发生，需要延长每次浸泡的时间。当反应容器内待反应的试剂浓度过低或者
- 20 有效成分变质至不利于反应发生，则需要重新更换新的试剂，此时可以适当缩短浸泡时间。具体地，通过测序平台（例如：浸没式生化平台）软件中的生化参数设置，可以在不同的测序阶段设置不同的温度，来达到比较合适的测序结果，并在同一轮试剂中，不同的浸泡次数设置不同的反应时间，来达到最佳的实验效果。

具体的方案：

- 25 设置生化槽初始生化时间和末阶段生化时间，比如生化槽 1 的初始生化时间是 50s，末阶段生化时间是 60s；

比如有 6 张载片同时进行测序时，浸泡次数设定为 78 次；

生化槽中的试剂进行第 X 次浸泡时，反应时间 (s) $=50+10(X-1)/(78-1)$ 。

- 则载片在生化槽 1 进行第一次浸泡时，反应时间是 50s，当进行 78 次浸泡时，反应时
- 30 间是 60s，反应时间随着浸泡次数的增加线性增加。

同理反应温度也可以按照浸泡次数进行调整。

根据本公开的一种实施例，步骤 S100 和步骤 S300 至少之一中反应的温度是通过预先确定的循环数-反应温度关系计算获得。

根据本公开的一种实施例，将循环的总循环数划分为 N 个循环段，每个循环段内各循环的反应温度相同，各个循环段之间的反应温度不同；N 为大于 1 的整数；每个循环段的反应温度随着循环段数的增加而增加；随着循环段数的增加，各个循环段之间的反应温度呈指数函数或者线性函数分布方式增加；线性函数分布方式选自等差数列或者等比数列分布方式。

根据本公开的一种实施例，进行多轮循环后，采用具有链置换活性的 DNA 聚合酶对固定在芯片上的目标核酸进行多重置换扩增反应，得到互补链；将二链进行步骤 S100~S400；其中，一链每次进行的反应时间和/或反应温度与二链每次进行相应的反应时间和/或反应温度不同。具体地，一链进行第 n 轮循环的反应时间/反应温度与二链进行第 n 轮循环的反应时间/反应温度不同。

测序系统、电子设备、计算机可读存储介质和计算机程序产品

在本公开的又一方面，本公开提出了一种测序系统。根据本公开的实施例，参见图 4，该测序系统 1000 包括：芯片 100、测序设备 200 和一个或多个处理器 300，一个或多个处理器 300 被配置为用于执行：（1）使固定于芯片表面的目标核酸与聚合试剂进行反应，掺入核苷酸或核苷酸类似物，得到反应产物；（2）检测荧光信号；（3）使反应产物与再生试剂进行反应，获得可以进行下一轮聚合反应的产物；（4）重复步骤（1）到步骤（3），以此类推，进行多轮循环，最终获得测序数据；其中，步骤（1）和步骤（3）至少之一中反应的时间是通过预先确定的循环数-反应时间关系计算获得。

针对不同循环采用不同的反应时间，构建循环数-反应时间关系，基于该预先构建的关系合理分配不同循环的反应时间，使得每个循环的反应更加充分，同时减少反应中长时间的高温对核酸的损伤，提高测序质量，有利于长读长的测序。

根据本公开的一种实施例，参见图 4，一个或多个处理器 300 包括：

第一模块 210，该第一模块 210 用于使固定于芯片表面的目标核酸与聚合试剂进行反应，掺入核苷酸或核苷酸类似物，得到反应产物；

第二模块 220，该第二模块 220 用于检测荧光信号；

第三模块 230，该第三模块 230 用于使反应产物与再生试剂进行反应，获得可以进行下一轮聚合反应的产物；

第四模块 240，该第四模块 240 用于使第一模块 210、第二模块 220 和第三模块 230 中

执行的操作依次重复，以此类推，进行多轮循环，最终获得测序数据；

其中，第一模块 210 和第三模块 230 至少之一中反应的时间是通过预先确定的循环数-反应时间关系计算获得。

根据本公开的一种实施例，一个或多个处理器 300 被配置为用于执行：将循环的总循环数划分为 N 个循环段，每个循环段内各循环的反应时间相同，各个循环段之间的反应时间不同；N 为大于 1 的整数。

根据本公开的一种实施例，随着循环段数的增加，各个循环段之间的反应时间呈指数函数或者线性函数分布方式增加。

根据本公开的一种实施例，一个或多个处理器 300 被配置为用于执行按照如下公式确定反应时间：反应时间(s)= $A+(B-A)/D \times (C-1)$ ；其中，A 表示第一个循环的反应时间常数，B 表示最后一个循环的反应时间常数，C 表示当前测序循环数，D 表示测序总循环数；其中反应时间为公式结果取整。

根据本公开的一种实施例，一个或多个处理器 300 被配置为用于执行：根据在各个循环的反应时间相同的条件下进行测序获得的测序错误率，得到归一化曲线；将归一化曲线中每个循环的归一化数值乘以系数 P，并将所得归一化数值与循环数构建指数曲线，系数 P 为最后一个循环预计增加的反应时间；将指数曲线对应的指数公式中加上第一个循环所需反应时间，得到循环数-反应时间关系。

根据本公开的一种实施例，一个或多个处理器 300 被配置为用于执行的每轮循环反应中的反应包括：使芯片浸泡于存放有聚合试剂或再生试剂的反应容器中，反应完成后，使芯片从反应容器中取出；随着循环次数增加，每个反应容器内发生浸泡次数的增加，每次浸泡的时间延长；一个或多个处理器被配置为用于执行按照下列公式确定每次浸泡的时间：浸泡时间= $50+10(X-1)/(Y-1)$ ，X 为同一反应容器浸泡的次数，浸泡时间单位为秒，Y 为同一反应容器总浸泡次数。

根据本公开的一种实施例，步骤（1）和步骤（3）至少之一中反应的温度是通过预先确定的循环数-反应温度关系计算获得；一个或多个处理器被配置为用于执行：将循环的总循环数划分为 N 个循环段，每个循环段内各循环的反应温度相同，各个循环段之间的反应温度不同；N 为大于 1 的整数；每个循环段的反应温度随着循环段数的增加而增加；随着循环段数的增加，各个循环段之间的反应温度呈指数函数或者线性函数分布方式增加；线性函数分布方式选自等差数列或者等比数列分布方式。

一个或多个处理器 300 可以是通用处理器或者专用处理器等。例如可以是基带处理器或中央处理器。基带处理器可以用于对通信协议以及通信数据进行处理，中央处理器可以

用于对通信设备（如，基站、基带芯片，终端设备、终端设备芯片，DU 或 CU 等）进行控制，执行计算机程序，处理计算机程序的数据。处理器 300 可实现在集成电路（integrated circuit, IC）、模拟 IC、射频集成电路 RFIC、混合信号 IC、专用集成电路（application specific integrated circuit, ASIC）、印刷电路板（printed circuit board, PCB）、电子设备等上。该处
5 理器和收发器也可以用各种 IC 工艺技术来制造，例如互补金属氧化物半导体（complementary metal oxide semiconductor, CMOS）、N 型金属氧化物半导体（nMetal-oxide-semiconductor, NMOS）、P 型金属氧化物半导体（positive channel metal oxide semiconductor, PMOS）、双极结型晶体管（bipolar junction transistor, BJT）、双极 CMOS（BiCMOS）、硅锗（SiGe）、砷化镓（GaAs）等。

10 在本公开的又一方面，本公开提出了一种电子设备。根据本公开的实施例，电子设备包括：存储器、一个或多个处理器；存储器与一个或多个处理器耦合，存储器用于存储计算机程序代码，计算机程序代码包括计算机指令，一个或多个处理器调用计算机指令以使得电子设备执行如前面所述测序方法。具体地，电子设备可以为包括测序仪、平板电脑、计算集群等任意智能终端。

15 本公开所使用的术语“存储器”指的是用于将机器指令和/或数据提供给可编程处理器的任何计算机程序产品、设备、和/或装置（例如，磁盘、光盘、存储器、可编程逻辑装置（PLD）），包括，接收作为机器可读信号的机器指令的机器可读介质。存储器可以采用只读存储器（Read Only Memory, ROM）、静态存储设备、动态存储设备或者随机存取存储器（Random Access Memory, RAM）等形式实现。存储器可以存储操作系统和其他应用程序，
20 在通过软件或者固件来实现本说明书实施例所提供的技术方案时，相关的程序代码保存在存储器中，并由处理器来调用执行本申请实施例的测序方法。

在一些实施例中，参见图 5，该电子设备 400 可以包括：处理器 410、存储器 420、输入/输出接口 430、通信接口 440 和总线 450。其中处理器 410、存储器 420、输入/输出接口 430 和通信接口 440 通过总线 450 实现彼此之间在设备内部的通信连接。

25 处理器 410 可以采用通用的 CPU（Central Processing Unit，中央处理器）、微处理器、应用专用集成电路（Application Specific Integrated Circuit, ASIC）、或者一个或多个集成电路等方式实现，用于执行相关程序，以实现本说明书实施例所提供的技术方案。

存储器 420 可以采用 ROM（Read Only Memory，只读存储器）、RAM（Random Access Memory，随机存取存储器）、静态存储设备，动态存储设备等形式实现。存储器 420 可以
30 存储操作系统和其他应用程序，在通过软件或者固件来实现本说明书实施例所提供的技术方案时，相关的程序代码保存在存储器 420 中，并由处理器 410 来调用执行。

输入/输出接口 430 用于连接输入/输出模块，以实现信息输入及输出。输入/输出模块可以作为组件配置在设备中（图中未示出），也可以外接于设备以提供相应功能。其中输入设备可以包括键盘、鼠标、触摸屏、麦克风、各类传感器等，输出设备可以包括显示器、扬声器、振动器、指示灯等。

5 通信接口 440 用于连接通信模块（图中未示出），以实现本设备与其他设备的通信交互。其中通信模块可以通过有线方式（例如 USB、网线等）实现通信，也可以通过无线方式（例如移动网络、WIFI、蓝牙等）实现通信。

总线 450 包括一通路，在设备的各个组件（例如处理器 410、存储器 420、输入/输出接口 430 和通信接口 440）之间传输信息。

10 需要说明的是，尽管上述设备仅示出了处理器 410、存储器 420、输入/输出接口 430、通信接口 440 以及总线 450，但是在具体实施过程中，该设备还可以包括实现正常运行所必需的其他组件。此外，本领域的技术人员可以理解的是，上述设备中也可以仅包含实现本说明书实施例方案所必需的组件，而不必包含图中所示的全部组件。

在上述实施例中，可以全部或部分地通过软件、硬件、固件或者其任意组合来实现。
15 当使用软件实现时，可以全部或部分地以计算机程序产品的形式实现。计算机程序产品包括一个或多个计算机程序。在计算机上加载和执行计算机程序时，全部或部分地产生按照本申请实施例的流程或功能。计算机可以是通用计算机、专用计算机、计算机网络、或者其他可编程装置。计算机程序可以存储在计算机可读存储介质中，或者从一个计算机可读存储介质向另一个计算机可读存储介质传输，例如，计算机程序可以从一个网站站点、计
20 算机、服务器或数据中心通过有线（例如同轴电缆、光纤、数字用户线（digital subscriber line, DSL））或无线（例如红外、无线、微波等）方式向另一个网站站点、计算机、服务器或数据中心进行传输。

为此，在本公开的又一方面，本公开提出了一种计算机可读存储介质，包括计算机指令。根据本公开的实施例，当计算机指令在电子设备上运行时，使得电子设备执行如前面
25 所述测序方法。计算机可读存储介质可以是计算机能够存取的任何可用介质或者是包含一个或多个可用介质集成的服务器、数据中心等数据存储设备。可用介质可以是磁性介质（例如，软盘、硬盘、磁带）、光介质（例如，高密度数字视频光盘（digital video disc, DVD））、或者半导体介质（例如，固态硬盘（solid state disk, SSD））等。

在本公开的又一方面，本公开提出了一种计算机程序产品。根据本公开的实施例，当
30 计算机程序产品在计算机上运行时，使得计算机执行如前面所述测序方法。

本领域普通技术人员可以理解实现上述实施例方法中的全部或部分流程，该流程可以

由计算机程序来指令相关的硬件完成，该程序可存储于计算机可读取存储介质中，该程序在执行时，可包括如上述各方法实施例的流程。而前述的存储介质包括：ROM 或随机存储记忆体 RAM、磁碟或者光盘等各种可存储程序代码的介质。

需要说明的是，前面针对测序方法和确定测序中反应时间的方法中所描述的特征和优点，同样适用于该测序系统、电子设备、计算机可读存储介质和计算机程序产品，在此不再赘述。

下面将结合实施例对本公开的方案进行解释。本领域技术人员将会理解，下面的实施
例仅用于说明本公开，而不应视为限定本公开的范围。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。

下述实施例中，使用的关键器材和关键试剂如下：

1、关键器材：

MGISEQ-2000RS 测序仪，FTAT 测序仪、PCR 仪，PCR 八连管，Qubit® 3.0 荧光定量
仪，移液器一套，高速离心机，200μL 阔口吸头，冰盒。

2、关键试剂如下表 2 所示：

表 2 所需的试剂

序号	试剂名称	品牌
1	MGISEQ-2000RS 高通量快速测序试剂套装 (FCS PE300)	MGI
2	MGISEQ-2000RS 高通量序试剂套装 (FCL SE400)	MGI
3	MGISEQ-2000RS 快速测序载片	MGI
4	MGISEQ-2000RS 测序载片	MGI
5	Ecoli 450 文库	MGI
6	E320	MGI
7	快速再生试剂	MGI
8	FTAT 测序载片	MGI
9	快速测序试剂	MGI

实施例 1

本实施案例是基于华大智造的测序仪 MGISEQ-2000RS 平台，使用的试剂均来源于该
测序仪配套使用的建库试剂盒以及单端测序试剂盒(以下简称 SE400 试剂盒)；使用的验证

样本来源于大肠杆菌；在验证过程中参考《MGISEQ-2000RS 高通量（快速）测序试剂套装使用说明书》，进行 SE400 所需的 DNB 的制备、加载及 SE400 试剂槽的配制；本实施案例以 SE400 测序为例，进行梯度孵育的方式进行孵育时间的设置，更改测序需要的 SE400 的生化脚本；

5 本实施例设计两组孵育时间进行对比：

 第一组：保持整体合成时间维持在 60s，即维持恒定孵育时间。

 第二组：将孵育时间按照梯度孵育的方式进行，每 100 个循环为一个梯度，每个梯度的孵育时间不同，具体的孵育时间设置见表 3。

 结果见表 4 和图 6，根据本公开实施例的方法设置的梯度孵育时间，比恒定孵育时间的 Q30%下降缓慢，证明梯度孵育时间的方法比恒定孵育会产生更好的效果。

表 3：SE400 梯度孵育的时间设置情况

循环数	1-100	100-200	200-300	300-400	241-300
合成反应时间（s）	20	40	80	100	100

表 4：本实施例中恒定孵育时间和梯度孵育时间对整体测序质量的比对情况。

测试	恒定孵	梯度孵育
TotalReads(M)	468.25	477.27
Q30(%)	77.91	76.7
ESR(%)	77.34	79.01

注：ESR(%)：按照 Q 值对 reads 进行过滤，大于 Q30 的 reads 所占的比例。

15 **实施例2**

 本实施案例是基于华大智造的测序仪MGISEQ-2000RS平台，使用的验证样本来源于大肠杆菌；DNB制备，加载及试剂槽的配制与MGI其他平台通用，可以适配；本实施案例以 SE150测序为例，进行线性孵育的方式进行孵育时间的设置，更改测序需要的SE150的生化脚本。

20 本实施例设计两组孵育时间进行对比：

 第一组：保持整体合成时间维持在20s，补平时间维持在30s，再生时间维持在30s，即维持恒定孵育时间。

 第二组：将孵育时间按照线性孵育的方式进行，孵育时间按照公式进行计算，公式如

下：

反应时间(s)= $A+(B-A)/D*(C-1)$ ，其中，A表示第一个循环的反应时间常数，B表示最后循环的反应时间常数，C表示当前测序循环数，D表示测序总循环数；其中反应时间为公式结果取整。

5 合成的孵育时间为 $13+(43-13)/150*(C-1)$

补平的孵育时间为 $22+(52-22)/150*(C-1)$

再生的孵育时间为 $27+(57-27)/150*(C-1)$

具体的孵育时间见图7。

结果见图8和图9，根据本公开实施例的方法设置的线性孵育时间，比恒定孵育时间的
10 Q30%下降缓慢，证明线性孵育时间的方法比恒定孵育会产生更好的效果。

实施例3

本实施案例是基于华大智造的测序仪MGISEQ-2000RS平台，使用的试剂均来源于该测序仪配套使用的建库试剂盒以及双端测序试剂盒(以下简称PE300试剂盒)；使用的验证样本
15 来源于大肠杆菌；在验证过程中参考《MGISEQ-2000RS高通量（快速）测序试剂套装使用说明》，进行PE300所需的DNB的制备、加载及PE300试剂槽的配制；本实施案例以PE300测序为例，进行指数孵育的方式进行孵育时间的设置，更改测序需要的PE300的生化脚本。

本实施例设计两组孵育时间进行对比：

第一组：保持整体合成（链合成）时间维持在60s，补平时间维持在120s，再生时间维
20 持在60s，即维持恒定孵育时间。

第二组：参考图3，将孵育时间按照指数孵育的方式进行，孵育时间按照公式进行计算，公式如下：

$$S = 3*10^{-6}*K^3 - 0.0001*K^2 - 0.0089*K + 1.3741 + T$$

其中K为当前循环，Y为该循环的孵育时间，T为第一个循环的孵育时间，则

25 合成的孵育时间公式为： $y = 3*10^{-6}*A^3 - 0.0001*A^2 - 0.0089*A + 1.3741 + 19$

补平的孵育时间公式为： $y = 3*10^{-6}*A^3 - 0.0001*A^2 - 0.0089*A + 1.3741 + 60$

再生的孵育时间公式为： $y = 3*10^{-6}*A^3 - 0.0001*A^2 - 0.0089*A + 1.3741 + 40$

结果如表5和图10，根据本公开实施例的方法设置的指数孵育时间，比恒定孵育时间的
Q30%下降缓慢，证明指数孵育时间的方法比恒定孵育会产生更好的效果。

30 表5示出了本实施例中恒定孵育时间和指数孵育时间对测序质量的比对情况

实验	恒 定 孵	指 数 孵
----	-------	-------

	育	育
TotalReads(M)	170.35	194.15
错误率	0.69	0.49
Q30(%)	89.74	90.56
SplitRate(%)	98.77	98.61
ESR(%)	42.6	48.47
RecoverValue(AVG)	2.07	2.44

注：SplitRate(%)：拆分率，数据中成功拆除标签的序列占总数据的比例。
RecoverValue(AVG)：该指标仅针对 PE 测序部分，反映二链信号回升情况。

实施例 4

5 本实施案例是基于华大智造的测序仪 MGISEQ-2000RS 平台，使用的试剂均来源于该
测序仪配套使用的建库试剂盒以及双端测序试剂盒；使用的验证样本来源于大肠杆菌；在
验证过程中参考《MGISEQ-2000RS 高通量（快速）测序试剂套装使用说明书》，进行 PE250
所需的 DNB 的制备、加载及 PE250 试剂槽的配制；本实施案例以 PE250 测序为例，进行
梯度反应温度的设置，更改测序需要的 PE250 的生化脚本；
10 本实施例设计两组孵育温度进行对比：
第一组：保持整体补平温度维持在 60℃，即维持恒定反应温度。
第二组：将反应温度按照梯度温度的方式进行，每个梯度的孵育温度不同，具体的孵
育时间设置见表 6。
结果见表 7 和图 11，根据本公开实施例的方法设置的梯度反应温度，比起恒定孵育温
15 度，梯度反应温度的二链信号回升更好，Q30%下降缓慢，整体数据量更高，证明梯度温度
的方法比恒定温度会产生更好的效果。

表 6：PE250 一链梯度温度设置情况

循环数	1-75	76-150	151-250
补平温度（℃）	55	60	63

表 7：本实施例中恒定孵育温度和梯度孵育温度对整体测序质量的比对情况。

实验	恒 定 孵 育温度	梯 度 孵 育温度
TotalReads(M)	468.05	471.39

错误率(%)	1.26	0.63
Q30(%)	77.38	87.37
SplitRate(%)	98.58	99.23
ESR(%)	74.05	78.21
RecoverValue(AVG)	1.34	1.60

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

应该理解，可以使用上面所示的各种形式的流程，重新排序、增加或删除步骤。例如，
5 本公开中记载的各步骤可以并行地执行也可以顺序地执行也可以不同的次序执行，只要能够实现本公开公开的技术方案所期望的结果，本文在此不进行限制。

需要说明的是，在本文中，诸如“第一”和“第二”等之类的关系术语仅仅用来将一个实体或者操作与另一个实体或操作区分开来，而不一定要求或者暗示这些实体或操作之间存在任何这种实际的关系或者顺序。而且，术语“包括”或者其任何其他变体意在涵盖
10 非排他性的包含，从而使得包括一系列要素的过程、方法、物品或者设备不仅包括那些要素，而且还包括没有明确列出的其他要素，或者是还包括为这种过程、方法、物品或者设备所固有的要素。在没有更多限制的情况下，由语句“包括一个……”限定的要素，并不排除在包括要素的过程、方法、物品或者设备中还存在另外的相同要素。

以上仅是本公开的具体实施方式，使本领域技术人员能够理解或实现本公开。对这些
15 实施例的多种修改对本领域的技术人员来说将是显而易见的，本文中所定义的一般原理可以在不脱离本公开的精神或范围的情况下，在其它实施例中实现。因此，本公开将不会被限制于本文的这些实施例，而是要符合与本文所申请的原理和新颖特点相一致的最宽的范围。

权利要求书

1、一种测序方法，其特征在于，包括：

(1) 将固定于芯片表面的目标核酸与聚合试剂进行反应，掺入核苷酸或核苷酸类似物，
5 得到反应产物；

(2) 检测荧光信号；

(3) 将所述反应产物与再生试剂进行反应，获得可以进行下一轮聚合反应的产物；

(4) 重复步骤 (1) 到步骤 (3)，以此类推，进行多轮循环，最终获得测序数据；

其中，所述步骤 (1) 和步骤 (3) 至少之一中反应的时间是通过预先确定的循环数-反
10 应时间关系计算获得。

2、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，将所述循环的总循环数划分为 N 个循环
段，每个所述循环段内各循环的反应时间相同，各个所述循环段之间的反应时间不同；
N 为大于 1 的整数。

3、根据权利要求 2 所述的方法，其特征在于，每个所述循环段的反应时间随着循环段
15 数的增加而增加；

随着循环段数的增加，各个所述循环段之间的反应时间呈指数函数或者线性函数分布
方式增加；

所述线性函数分布方式选自等差数列或者等比数列分布方式。

4、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述循环数-反应时间关系选自如下公
20 式：

$$\text{反应时间(s)} = A + (B - A) / D \times (C - 1);$$

其中，A 表示第一个循环的反应时间常数，B 表示最后一个循环的反应时间常数，C
表示当前测序循环数，D 表示测序总循环数；其中反应时间为公式结果取整。

5、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，确定所述循环数-反应时间关系的方法
25 包括：

在各个循环的反应时间相同的条件下，进行步骤 (1) ~ (4)，根据获得的测序错误率，
得到归一化曲线；

将所述归一化曲线中每个循环的归一化数值乘以系数 P，并将所得归一化数值与循环
数构建指数曲线，所述系数 P 为最后一个循环预计增加的反应时间；

30 将所述指数曲线对应的指数公式中加上第一个循环所需反应时间，得到所述循环数-反
应时间关系。

6、根据权利要求1所述的方法，其特征在于，每轮循环中，所述反应包括将所述芯片浸泡于存放有聚合试剂或再生试剂的反应容器中，所述反应完成后，将所述测序芯片转移至另外的反应容器中；

随着循环次数增加，每个反应容器内发生浸泡次数增加，每次浸泡的时间延长。

5 7、根据权利要求6所述的方法，其特征在于，每次浸泡的时间按照下列公式确定：

浸泡时间(s) = $50 + 10(X-1)/(Y-1)$ ，X 为同一反应容器浸泡的次数，Y 为同一反应容器总浸泡次数。

8、根据权利要求1所述的方法，其特征在于，所述步骤(1)和步骤(3)至少之一中所述反应的温度是通过预先确定的循环数-反应温度关系计算获得。

10 9、根据权利要求1所述的方法，其特征在于，将所述循环的总循环数划分为N个循环段，每个所述循环段内各循环的反应温度相同，各个所述循环段之间的反应温度不同；

N 为大于1的整数；

每个所述循环段的反应温度随着循环段数的增加而增加；

15 随着循环段数的增加，各个所述循环段之间的反应温度呈指数函数或者线性函数分布方式增加；

所述线性函数分布方式选自等差数列或者等比数列分布方式。

10、根据权利要求1-9任一项所述的方法，其特征在于，进行多轮循环后，采用具有链置换活性的DNA聚合酶对目标核酸进行多重置换扩增反应，得到互补二链；将所述二链进行步骤(1)~(4)；

20 其中，所述一链每次进行的反应时间和/或反应温度与所述二链每次进行相应的反应时间和/或反应温度不同。

11、一种测序系统，其特征在于，包括：

芯片；

测序设备，所述测序设备用于对固定于所述芯片表面的目标核酸进行测序；

25 一个或多个处理器，所述一个或多个处理器被配置为用于执行：

(1)使固定于芯片表面的目标核酸与聚合试剂进行反应，掺入核苷酸或核苷酸类似物，得到反应产物；

(2)检测荧光信号；

(3)使所述反应产物与再生试剂进行反应，获得可以进行下一轮聚合反应的产物；

30 (4)重复步骤(1)到步骤(3)，以此类推，进行多轮循环，最终获得测序数据；

其中，所述步骤(1)和步骤(3)至少之一中所述反应的时间是通过预先确定的循环

数-反应时间关系计算获得。

12、根据权利要求 11 所述的测序系统，其特征在于，所述一个或多个处理器被配置为用于执行：

将所述循环的总循环数划分为 N 个循环段，每个所述循环段内各循环的反应时间相同，
5 各个所述循环段之间的反应时间不同；

N 为大于 1 的整数；

随着循环段数的增加，各个所述循环段之间的反应时间呈指数函数或者线性函数分布方式增加。

13、根据权利要求 11 所述的测序系统，其特征在于，所述一个或多个处理器被配置为
10 用于执行按照如下公式确定反应时间：

反应时间(s)=A+(B-A)/D×(C-1)；

其中，A 表示第一个循环的反应时间常数，B 表示最后一个循环的反应时间常数，C 表示当前测序循环数，D 表示测序总循环数；其中反应时间为公式结果取整；或者

所述一个或多个处理器被配置为用于执行：

15 根据在各个循环的反应时间相同的条件下进行测序获得的测序错误率，得到归一化曲线；

将所述归一化曲线中每个循环的归一化数值乘以系数 P，并将所得归一化数值与循环数构建指数曲线，所述系数 P 为最后一个循环预计增加的反应时间；

将所述指数曲线对应的指数公式中加上第一个循环所需反应时间，得到所述循环数-反
20 应时间关系。

14、根据权利要求 11 所述的测序系统，其特征在于，所述一个或多个处理器被配置为用于执行的每轮循环反应中的所述反应包括：使所述芯片浸泡于存放有聚合试剂或再生试剂的反应容器中，所述反应完成后，使所述芯片从所述反应容器中取出；

随着循环次数增加，每个反应容器内发生浸泡次数的增加，每次浸泡的时间延长；

25 所述一个或多个处理器被配置为用于执行按照下列公式确定每次浸泡的时间：

浸泡时间=50+10(X-1)/(Y-1)，X 为同一反应容器浸泡的次数，浸泡时间单位为秒，Y 为同一反应容器总浸泡次数。

15、根据权利要求 11 所述的系统，其特征在于，所述步骤（1）和步骤（3）至少之一中所述反应的温度是通过预先确定的循环数-反应温度关系计算获得；

30 所述一个或多个处理器被配置为用于执行：

将所述循环的总循环数划分为 N 个循环段，每个所述循环段内各循环的反应温度相同，

各个所述循环段之间的反应温度不同；

N 为大于 1 的整数；

每个所述循环段的反应温度随着循环段数的增加而增加；

随着循环段数的增加，各个所述循环段之间的反应温度呈指数函数或者线性函数分布

5 方式增加；

所述线性函数分布方式选自等差数列或者等比数列分布方式。

16、一种电子设备，其特征在于，包括：存储器、一个或多个处理器；所述存储器与
所述一个或多个处理器耦合，所述存储器用于存储计算机程序代码，所述计算机程序代码
包括计算机指令，所述一个或多个处理器调用所述计算机指令以使得所述电子设备执行如
10 权利要求 1~10 任一项所述测序方法。

17、一种计算机可读存储介质，包括计算机指令，其特征在于，当所述计算机指令在
电子设备上运行时，使得所述电子设备执行如权利要求 1~10 任一项所述测序方法。

18、一种计算机程序产品，其特征在于，当所述计算机程序产品在计算机上运行时，
使得计算机执行如权利要求 1~10 任一项所述测序方法。

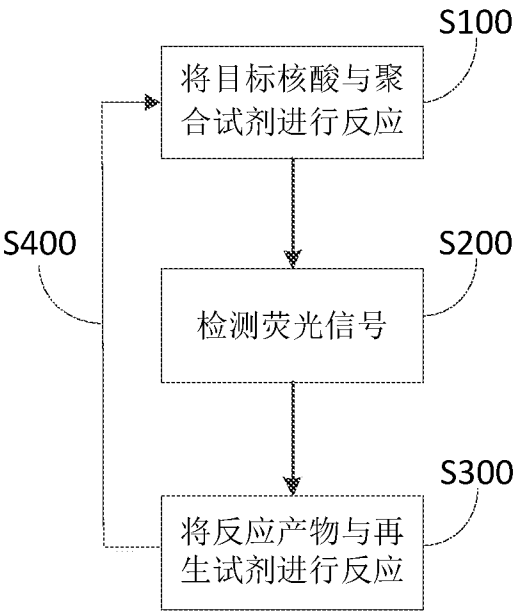


图 1

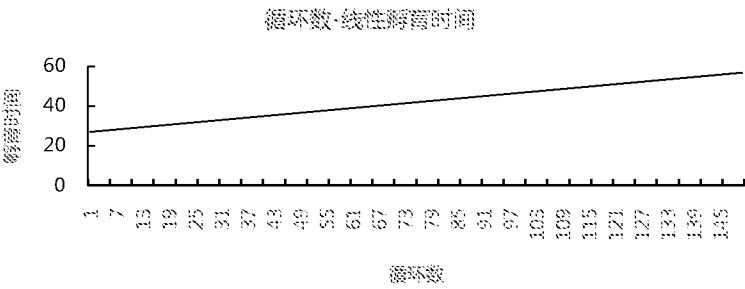


图 2

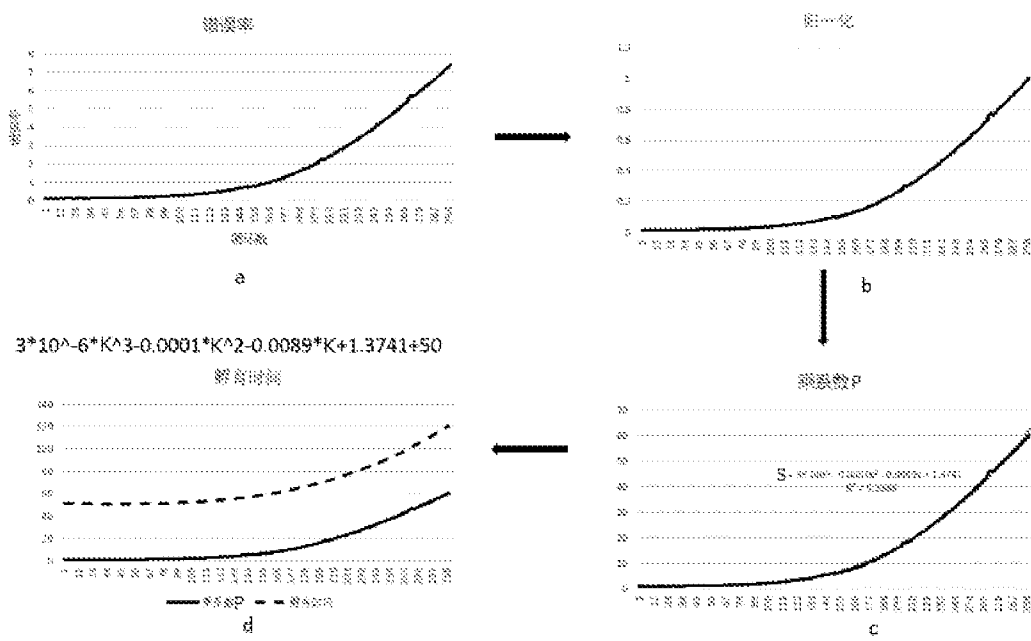


图 3

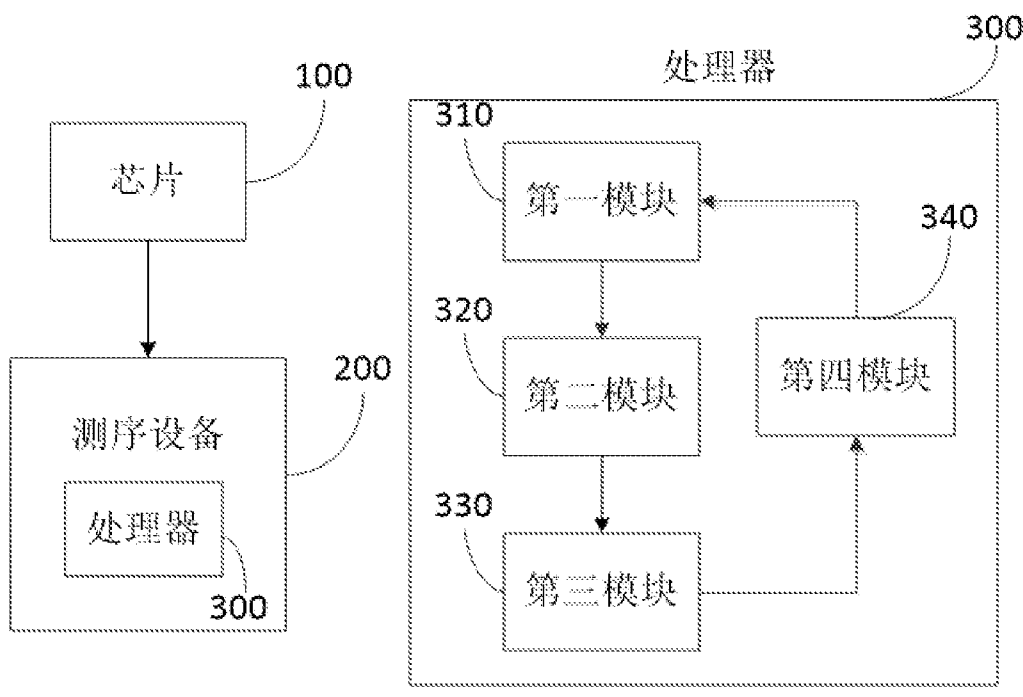


图 4

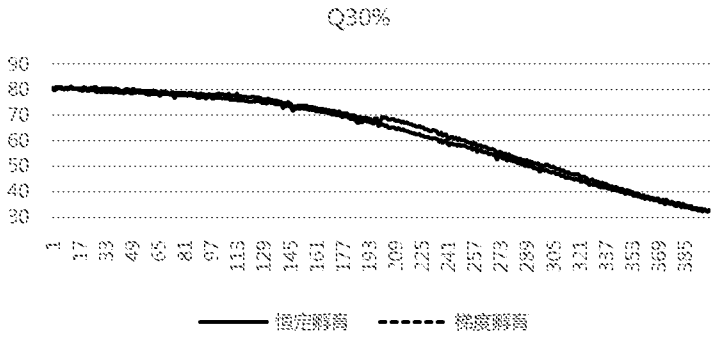
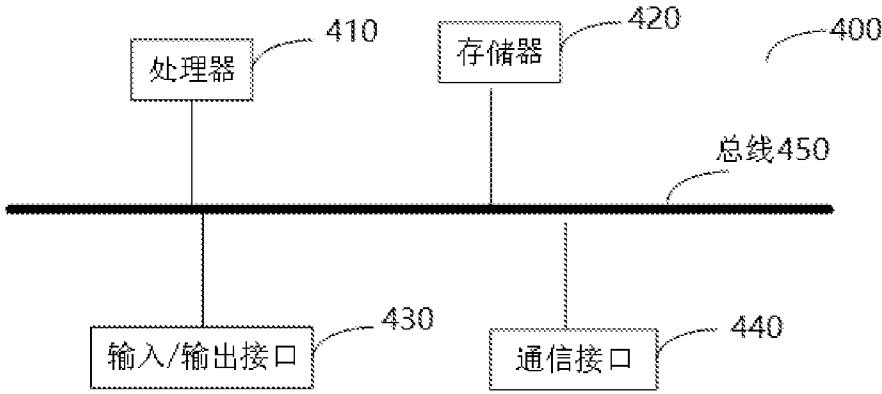


图 6

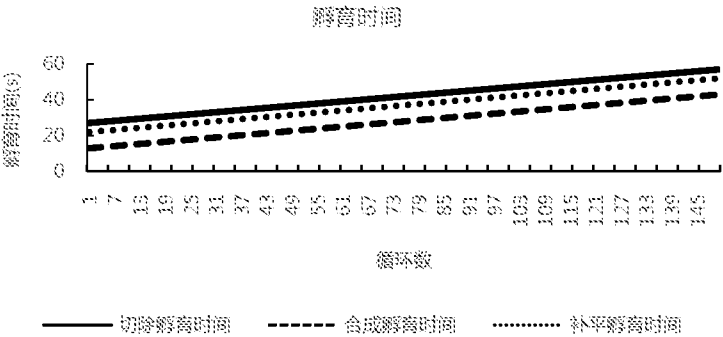


图 7

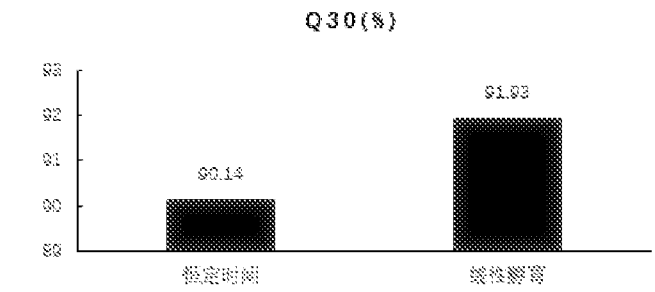


图 8

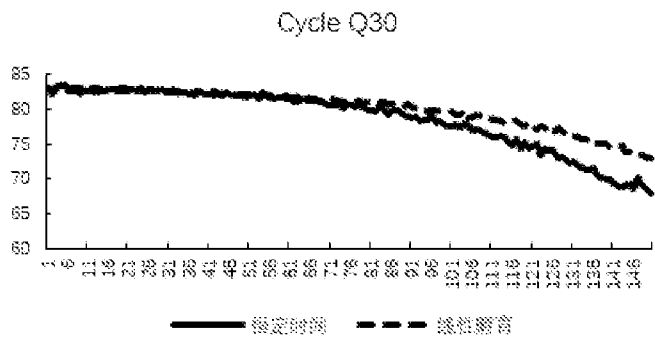


图 9

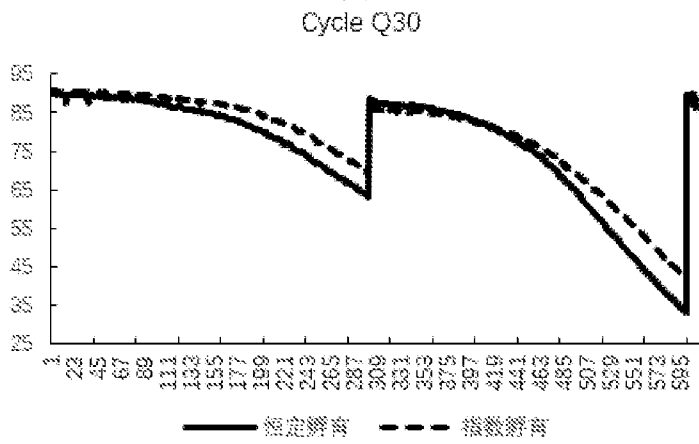


图 10

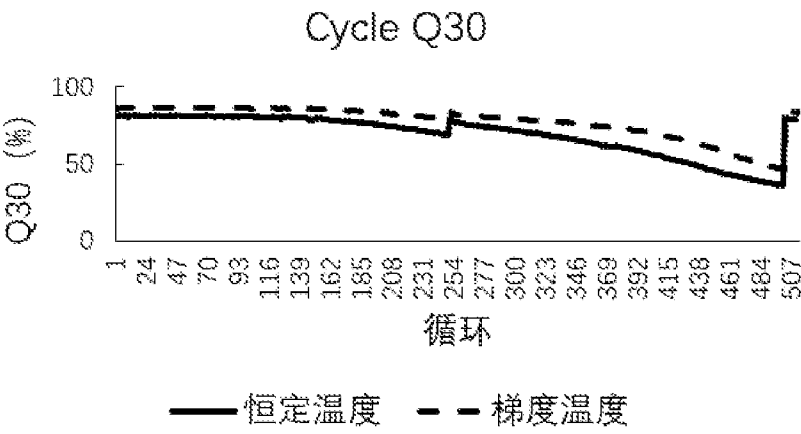


图 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/079100

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/6869(2018.01)i; G01N21/64(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,G01N

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, CNTXT, EPTXT, WOTXT, USTXT, CNKI, ISI web of science, baidu, Pubmed: 深圳华大智造科技股份有限公司, 韦小芳, 固定, fixing, 目标核酸, target, 靶, 测序, sequence, 反应时间, reaction time

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 105001292 A (DIRECT GENOMICS CO., LTD.) 28 October 2015 (2015-10-28) claims 8 and 9	1-18
Y	CN 108603227 A (KALIM U MIR) 28 September 2018 (2018-09-28) claims 1-3	1-18
Y	US 2020056229 A1 (XGENOMES CORP.) 20 February 2020 (2020-02-20) claims 1-15, and description, paragraph 742	1-18
Y	WO 2020243187 A1 (XGENOMES CORP.) 03 December 2020 (2020-12-03) claims 1-15, and description, paragraph 709	1-18
A	CN 103917654 A (CENTRILLION TECHNOLOGY HOLDING CORPORATION) 09 July 2014 (2014-07-09) entire document	1-18
A	WO 2016038381 A1 (ILLUMINA CAMBRIDGE LIMITED) 17 March 2016 (2016-03-17) entire document	1-18



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

02 November 2023

Date of mailing of the international search report

08 November 2023

Name and mailing address of the ISA/CN

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

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/079100

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	105001292	A	28 October 2015	None			
CN	108603227	A	28 September 2018	US	2022002799	A1	06 January 2022
				WO	2017087823	A1	26 May 2017
				EP	3411494	A1	12 December 2018
				EP	3411494	A4	11 March 2020
				US	2018327829	A1	15 November 2018
				US	11066701	B2	20 July 2021
US	2020056229	A1	20 February 2020	US	11427867	B2	30 August 2022
WO	2020243187	A1	03 December 2020	AU	2020282704	A1	27 January 2022
				EP	3976828	A1	06 April 2022
				EP	3976828	A4	28 June 2023
				KR	20220034054	A	17 March 2022
				JP	2022534920	A	04 August 2022
				CA	3140900	A1	03 December 2020
CN	103917654	A	09 July 2014	HK	1200492	A1	07 August 2015
				EP	2694679	A2	12 February 2014
				EP	2694679	A4	22 October 2014
				WO	2012134602	A2	04 October 2012
				WO	2012134602	A3	27 December 2013
				US	2012252682	A1	04 October 2012
				US	2021180123	A1	17 June 2021
				US	2014315724	A1	23 October 2014
				US	10801062	B2	13 October 2020
				US	2014065604	A1	06 March 2014
				US	9689032	B2	27 June 2017
WO	2016038381	A1	17 March 2016	ES	2705427	T3	25 March 2019
				EP	3191603	A1	19 July 2017
				EP	3191603	B1	31 October 2018
				GB	201416106	D0	29 October 2014

A. 主题的分类 C12Q1/6869(2018.01)i; G01N21/64(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,G01N 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, CNTXT, EPTXT, WOTXT, USTXT, CNKI, ISI web of science, baidu, Pubmed, 深圳华大智造科技股份有限公司, 韦小芳, 固定, fixing, 目标核酸, target, 靶, 测序, sequence, 反应时间, reaction time																							
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>Y</td> <td>CN 105001292 A (深圳市瀚海基因生物科技有限公司) 2015年10月28日 (2015 - 10 - 28) 权利要求8, 9</td> <td>1-18</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 108603227 A (卡利姆·U·米尔) 2018年9月28日 (2018 - 09 - 28) 权利要求1-3</td> <td>1-18</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2020056229 A1 (XGENOMES CORP.) 2020年2月20日 (2020 - 02 - 20) 权利要求1-15, 说明书第742段</td> <td>1-18</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2020243187 A1 (XGENOMES CORP.) 2020年12月3日 (2020 - 12 - 03) 权利要求1-15, 说明书第709段</td> <td>1-18</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 103917654 A (桑特里莱恩科技控股公司) 2014年7月9日 (2014 - 07 - 09) 全文</td> <td>1-18</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2016038381 A1 (ILLUMINA CAMBRIDGE LIMITED) 2016年3月17日 (2016 - 03 - 17) 全文</td> <td>1-18</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	Y	CN 105001292 A (深圳市瀚海基因生物科技有限公司) 2015年10月28日 (2015 - 10 - 28) 权利要求8, 9	1-18	Y	CN 108603227 A (卡利姆·U·米尔) 2018年9月28日 (2018 - 09 - 28) 权利要求1-3	1-18	Y	US 2020056229 A1 (XGENOMES CORP.) 2020年2月20日 (2020 - 02 - 20) 权利要求1-15, 说明书第742段	1-18	Y	WO 2020243187 A1 (XGENOMES CORP.) 2020年12月3日 (2020 - 12 - 03) 权利要求1-15, 说明书第709段	1-18	A	CN 103917654 A (桑特里莱恩科技控股公司) 2014年7月9日 (2014 - 07 - 09) 全文	1-18	A	WO 2016038381 A1 (ILLUMINA CAMBRIDGE LIMITED) 2016年3月17日 (2016 - 03 - 17) 全文	1-18
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																					
Y	CN 105001292 A (深圳市瀚海基因生物科技有限公司) 2015年10月28日 (2015 - 10 - 28) 权利要求8, 9	1-18																					
Y	CN 108603227 A (卡利姆·U·米尔) 2018年9月28日 (2018 - 09 - 28) 权利要求1-3	1-18																					
Y	US 2020056229 A1 (XGENOMES CORP.) 2020年2月20日 (2020 - 02 - 20) 权利要求1-15, 说明书第742段	1-18																					
Y	WO 2020243187 A1 (XGENOMES CORP.) 2020年12月3日 (2020 - 12 - 03) 权利要求1-15, 说明书第709段	1-18																					
A	CN 103917654 A (桑特里莱恩科技控股公司) 2014年7月9日 (2014 - 07 - 09) 全文	1-18																					
A	WO 2016038381 A1 (ILLUMINA CAMBRIDGE LIMITED) 2016年3月17日 (2016 - 03 - 17) 全文	1-18																					
☐ 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 2023年11月2日		国际检索报告邮寄日期 2023年11月8日																					
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088		授权官员 陈皓 电话号码 (+86) 010-53962068																					

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/079100

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	105001292	A	2015年10月28日	无			
CN	108603227	A	2018年9月28日	US	2022002799	A1	2022年1月6日
				WO	2017087823	A1	2017年5月26日
				EP	3411494	A1	2018年12月12日
				EP	3411494	A4	2020年3月11日
				US	2018327829	A1	2018年11月15日
				US	11066701	B2	2021年7月20日
US	2020056229	A1	2020年2月20日	US	11427867	B2	2022年8月30日
WO	2020243187	A1	2020年12月3日	AU	2020282704	A1	2022年1月27日
				EP	3976828	A1	2022年4月6日
				EP	3976828	A4	2023年6月28日
				KR	20220034054	A	2022年3月17日
				JP	2022534920	A	2022年8月4日
				CA	3140900	A1	2020年12月3日
CN	103917654	A	2014年7月9日	HK	1200492	A1	2015年8月7日
				EP	2694679	A2	2014年2月12日
				EP	2694679	A4	2014年10月22日
				WO	2012134602	A2	2012年10月4日
				WO	2012134602	A3	2013年12月27日
				US	2012252682	A1	2012年10月4日
				US	2021180123	A1	2021年6月17日
				US	2014315724	A1	2014年10月23日
				US	10801062	B2	2020年10月13日
				US	2014065604	A1	2014年3月6日
				US	9689032	B2	2017年6月27日
WO	2016038381	A1	2016年3月17日	ES	2705427	T3	2019年3月25日
				EP	3191603	A1	2017年7月19日
				EP	3191603	B1	2018年10月31日
				GB	201416106	D0	2014年10月29日