

(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
2017年2月23日 (23.02.2017)



(10) 国际公布号
WO 2017/028760 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12Q 1/68 (2006.01) C12M 1/36 (2006.01)
C12M 1/38 (2006.01) C12M 1/34 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2016/095053
- (22) 国际申请日: 2016年8月12日 (12.08.2016)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201510501300.2 2015年8月14日 (14.08.2015) CN
- (71) 申请人: 深圳市瀚海基因生物科技有限公司 (DIRECT GENOMICS CO., LTD.) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区西丽街道西丽大学城笃学路9号国家超级计算深圳中心科研楼10楼, Guangdong 518000 (CN)。
- (72) 发明人: 葛良进 (GE, Liangjin); 中国广东省深圳市南山区西丽街道西丽大学城笃学路9号国家超级计算深圳中心科研楼10楼, Guangdong 518000 (CN)。 高雁 (GAO, Yan); 中国广东省深圳市南山区西丽街道西丽大学城笃学路9号国家超级计算深圳中心科研楼10楼, Guangdong 518000 (CN)。 邓

力蔚 (DENG, Liyu); 中国广东省深圳市南山区西丽街道西丽大学城笃学路9号国家超级计算深圳中心科研楼10楼, Guangdong 518000 (CN)。 吴增丁 (WU, Zengding); 中国广东省深圳市南山区西丽街道西丽大学城笃学路9号国家超级计算深圳中心科研楼10楼, Guangdong 518000 (CN)。 蔡金森 (CAI, Jinsen); 中国广东省深圳市南山区西丽街道西丽大学城笃学路9号国家超级计算深圳中心科研楼10楼, Guangdong 518000 (CN)。 纪道锐 (JI, Daorui); 中国广东省深圳市南山区西丽街道西丽大学城笃学路9号国家超级计算深圳中心科研楼10楼, Guangdong 518000 (CN)。 曾立董 (ZENG, Lidong); 中国广东省深圳市南山区西丽街道西丽大学城笃学路9号国家超级计算深圳中心科研楼10楼, Guangdong 518000 (CN)。 李改玲 (LI, Gailing); 中国广东省深圳市南山区西丽街道西丽大学城笃学路9号国家超级计算深圳中心科研楼10楼, Guangdong 518000 (CN)。

- (74) 代理人: 广州三环专利代理有限公司 (GUANGZHOU SCIHEAD PATENT AGENT CO., LTD.); 中国广东省广州市越秀区先烈中路80号汇华商贸大厦1508室, Guangdong 510070 (CN)。

[见续页]

(54) Title: SINGLE MOLECULE SEQUENCING METHOD, DEVICE, SYSTEM, AND APPLICATION

(54) 发明名称: 一种单分子测序方法、装置、系统及应用

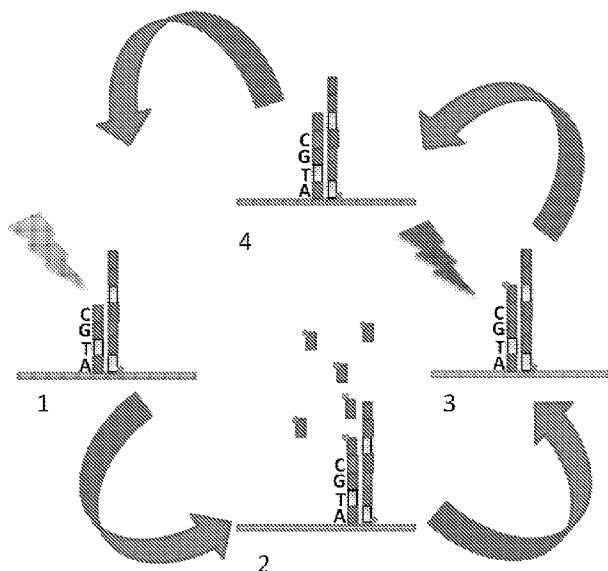


图2

(57) Abstract: The present invention provides a single molecule sequencing (SMTS) method, device, system, and application, and the method comprising: (i) combining a template nucleic acid having a first optical detection marker at an end with a primer to obtain a first complex; (ii) imaging the first complex to obtain a first image; (iii) mixing the first complex, a polymerase, and at least one nucleotide having an optical detection marker, and obtaining an extended product by a polymerase reaction; (iv) imaging the extended first complex to obtain a second image; (v) removing a breakable group from the nucleotide having the optical detection marker of the extended product to obtain a second complex; and (vi) repeating step (ii) to (v) one or more times to identify a sequence of the template nucleic acid. The single molecule sequencing method provided by the present invention achieves single molecule sequencing via a primer capturing a template nucleic acid.

(57) 摘要: 本发明提供了一种单分子测序 (SMTS) 方法、装置、系统及应用, 所述方法包括: (i) 将末端带第一光学检测标记的模板核酸与引物结合, 以获得第一复合物; (ii) 对所述第一复合物进行成像, 获得第一图像; (iii) 将所述第一复合物、聚合酶以及一种或多

种带光学检测标记的核苷酸混合, 通过聚合酶反应获得延伸产物; (iv) 对延伸后的第一复合物进行成像, 获得第二图像; (v) 除去延伸产物上带光学检测标记的核苷酸的可断裂的基团; 以获得第二复合物; (vi) 重复步骤(ii)至(v)一次或多次以鉴定模板核酸序列。本发明提供的单分子测序方案通过引物捕获模板核酸, 实现单分子测序。



WO 2017/028760 A1



(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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, 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))。

一种单分子测序方法、装置、系统及应用

本申请要求于 2015 年 8 月 14 日提交中国专利局的申请号为 201510501300.2 的中国专利申请的优先权，其全部内容通过引用结合在本申请中。

技术领域

本发明属于分子生物学领域，特别是涉及一种单分子测序方法、装置、系统及应用。

背景技术

二代测序技术广泛应用在很多领域，但其内在缺陷带来诸如起始样品量大，测序时间长，费用高，PCR 扩增过程带来的测序错误等开始凸显。以直接针对单个 DNA 分子的测序技术（SMS）为特征的新三代测序技术则针对解决二代技术的缺陷应运而生，并越来越多的引起人们的关注。

世界上首个基于单分子测序技术（tSMS）的测序仪是由 Helicos 公司于 2008 年推向市场的。其原理是通过检测单个碱基荧光信号来实现边合成边测序。具体而言，在测序前，待测 DNA 被打断成约 200 bp 的片段，并需要在片段 3' 末端加上 40bp 带有荧光标记的 poly(A) 尾，文库退火形成单链，与芯片上固定的 Oligo dT（40 bp）探针结合。Helicos 公司在 2012 年发表的学术论文则进一步改进了此项技术，把待测的带荧光，但无 polyA 尾修饰的单个 DNA 分子杂交捕获在特定的探针上面进行直接测序。其结果显示此项技术潜在的应用前景，尤其是临床应用领域。但 Helicos 公司发布的产品由于其高昂的价格和不稳定性等特点，没有得到市场的认可，于 2011 年底破产。

此外，太平洋生物公司的单分子测序仪（SMRT）具有读长长等特点，但是受物理原件和制作工艺的局限，该仪器通量不高，试剂昂贵，尚未真正应用到临床。因此，根据需求以及样本类型特点，单分子测序技术需要进一步开发改进。

发明内容

鉴于此，本发明提供了一种单分子测序方法、装置、系统及应用。本发明提供的单分子测序方法、装置、系统用于对任何一条或多条 DNA、RNA、mRNA、染色体、基因组、或其他核酸序列进行快速和准确地测序。

第一方面，本发明提供了一种单分子测序方法，包括：(i) 将末端带第一光学检测标记的模板核酸与引物结合，以获得第一复合物，所述引物连接在基底表面上；(ii) 对所述第一复合物进行成像，获得第一图像；(iii) 将所述第一复合物、聚合酶以及一种或多种带第二光学检测标记的核苷酸混合，通过聚合酶反应将一种或多种带第二光学检测标记的核苷酸添加至所述第一复合物上，获得延伸产物，其中，所述带第二光学检测标记的核苷酸包括依次连接的第二光学检测标记、可断裂的基团和核苷酸；(iv) 对所述延伸产物进行成像，获得第二图像；(v) 除去所述延伸产物上的可断裂的基团，以获得第二复合物；(vi) 以所述第二复合物替代所述第一复合物，重复以上(ii)至(v)一次或多次，以确定所述模板核酸序列。

可以理解的是，为方便描述和理解，本发明第一方面采用“第一复合物”来描述延伸反应之前的“引物/模板核酸复合物”；“第一复合物”经延伸反应添加了“带光学检测标记的核苷酸”之后获得延伸产物，延伸产物进一步被去掉“光学检测标记”后所得的复合物，本发明采用“第二复合物”来描述；即“第二复合物”为除去延伸产物上带光学检测标记的核苷酸的可断裂的基团后的“引物/模板核酸复合物”。在本发明实施例中，涉及对“延伸反应之前的引物/模板核酸复合物”的限定同样适用于“第一复合物”；涉及对“除去延伸产物上带光学检测标记的核苷酸的可断裂的基团后的“引物/模板核酸复合物”的限定同样适用于“第二复合物”。

若无特殊说明，文中的“引物-待测核酸复合物”同“引物/待测核酸复合物”，表示由引物和待测核酸连接形成的复合物。

若无特殊说明，本发明所述的“待测核酸”与“模板核酸”可以互换。

可以理解的是，本发明第一方面记载的技术方案包括本发明在先申请（申请 201510501300.2）中的第一方面记载的技术方案。

第二方面，本发明提供了一种单分子测序方法，具体包括：(i) 将末端修饰有光学检测标记的模板核酸与连接到基底表面上的引物进行杂交，形成杂交的引物/模板核酸复合物；(ii) 对所述引物/模板核酸复合物进行成像；(iii) 将所述引物/模板核酸复合物、聚合酶以及一种或多种带光学检测标记的核苷酸混合，通过聚合酶反应将一种或多种带光学检测标记的核苷酸添加至引物链的 3' 端；获得延伸产物；(iv) 对延伸后的引物/模板核酸复合物进行成像，并结合步骤(ii)中引物/模板核酸复合物的成像以鉴定模板核酸上的待测核苷酸序列；(v) 除去延伸产物上带光学检测标记的核苷酸的可断裂的基团；(vi) 重复步骤(ii)至(v)一次或多次以鉴定所述模板核酸中的 1 个或多个核苷酸。

本发明通过延伸反应、成像检测和切除光学检测标记分子的反复循环，实现 SMTS 实时测序。

在本发明实施例中，引物连接到基底表面的状态或方式均没有特别限制。本领域现有普通常用的即可。可选地，引物通过行业内常规的化学键或者物理吸附作用固定在基底表面。可选地，引物为 5' 端连接到基底表面的方式为：polyT 的 5' 端连接到基底表面。

在本发明一实施例中，在本发明第一或第二方面中，所述步骤(i)中，引物的至少部分序列为与模板核酸的至少部分序列互补的序列。可以理解的是，模板核酸通过碱基对互补与引物结合，从而结合在基底上。

在本发明又一实施例中，在本发明第一或第二方面中，所述步骤(i)中，引物为 5' 端具有 10-30bp 的 polyT 的引物序列，其中，所述引物序列为与模板核酸的至少部分序列互补的序列。

在本发明另一实施例中，在本发明第一或第二方面中，所述步骤(i)中，引物为 5' 端顺次连接有 10-30bp 的 polyT 以及烷基链的引物序列，其中，所述引物序列为与模板核酸的至少部分序列互补的序列。在该实施例中，引物为 5' 端连接到基底表面的方式为：烷基链（比如 $-(CH_2)_n-$ ）通过氨基与基底表面的环氧基连接。

在本发明实施例中，烷基链的长度没有特别限制。优选地，所述烷基链为 $-(CH_2)_n-$ （优选为 $-(CH_2)_6-$ ），其中，n 为自然数。

在本发明一实施例中，在本发明第一或第二方面中，引物为通过 5' 端修饰的氨基连接到表面修饰有环氧基基底（包括但不限于玻璃基底、石英基底等）。在本发明一优选实施例中，在本发明第一或第二方面中，将带有光学检测标记的引物的 5' 端连接到基底表面的步骤包括：a) 将环氧基修饰的玻璃基底浸泡在含 0.4-3.2nM 引物的固定液中（优选 45min-120min）；清洗基底；b) 将基底浸入磷酸盐钝化液中，摇晃（优选 10-15 小时）；清洗基底，获得所述表面固定有引物的基底。

在该优选实施方式中，进一步优选地，步骤 a 中，所述固定液为 0.02-0.3M 的 K_2HPO_4 溶液。

在该优选实施方式中，进一步优选地，步骤 a 中，所述固定液中引物的浓度优选为 0.8-3.2nM，进一步优选为 0.8-1.6nM。

在该优选实施方式中，进一步优选地，步骤 a 中，采用 3x SSC +0.1% Triton, 3x SSC, 150 mM K_2HPO_4 pH = 8.5 清洗基底。

在该优选实施方式中，进一步优选地，步骤 b 中，摇晃的条件为置于摇床上摇晃（优选为 40-80 转/分钟）。

在该优选实施方式中，进一步优选地，步骤 b 中，磷酸盐钝化液为 pH = 9.0, 0.2-1 M（优选 0.2-0.8 M） K_2HPO_4 溶液。

在本发明实施例中，模板核酸上修饰的光学检测标记及种类、延伸反应中所采用的核苷酸上修饰的光学检测标记种类均没有特别限制。本领域现有普通常用的即可。若无特别说明，本发明实施例中后续对光学检测标记的限定，并不特别说明第一光学检测标记或第二光学检测标记，而是本发明实施例中后续对光学检测标记的限定对第一光学检测标记或第二光学检测标记均适用。

在本发明一实施例中，在本发明第一或第二方面中，所述模板核酸的 3' 端和/或 5' 端带有光学

检测标记。

在本发明一实施例中，在本发明第一方面中，所述步骤(i)中，所述第一光学检测标记非光可断裂标记。

在本发明一实施例中，在本发明第一或第二方面中，所述光学检测标记为荧光标记。

优选地，所述荧光标记物选自荧光素，罗丹明，花青，Cy5，Cy3中的一种或多种。

在本发明一优选实施例中，在本发明第一或第二方面中，带有荧光标记的核苷酸为单色可逆末端终止子。

在本发明一优选实施例中，在本发明第一或第二方面中，带有荧光标记的核苷酸为多色可逆末端终止子。

如本发明所述的，单色可逆末端终止子为A、T、C、G中的任一种均带有相同的荧光标记；每次循环只添加一种核苷酸。

如本发明所述的，多色可逆末端终止子为A、T、C、G各自带有互不相同的荧光标记，每次循环可同时添加多种核苷酸，并通过不同的荧光标记分别读取各核苷酸的荧光信息。

在本发明实施例中，对所述引物/模板核酸复合物进行成像的方法没有特别限制。本领域现有普通常用的即可。

在本发明一实施例中，在本发明第一方面中，步骤 ii 包括：利用不同光源对所述第一复合物进行成像，获得多个第一图像。

在本发明一实施例中，在本发明第一方面中，所述步骤(ii)中，对所述第一复合物进行成像的步骤包括：在每个延伸循环反应中，对同一位点的第一复合物在延伸反应前后不同时间点进行成像。

在本发明一实施例中，在本发明第二方面中，所述步骤(ii)中，对所述引物/模板核酸复合物进行成像的步骤包括：在每个延伸循环反应中，对同一位点的引物/模板核酸复合物在延伸反应前后不同时间点进行成像。

在本发明实施例中，对所述引物/模板核酸复合物进行成像的装置没有特别限制。本领域现有普通常用的即可。例如，本发明实施例中，可采用专利申请号为 201510562591.6 所记载的全内反射荧光成像系统激发荧光并采集光学图像。

在本发明一实施例中，在本发明第一方面中，步骤(iii)的延伸反应之前的步骤(ii)中，通过全内反射显微镜(TIRF)采集光学图像来精确定位第一复合物所处的位置。

在本发明一实施例中，在本发明第二方面中，步骤(iii)的延伸反应之前的步骤(ii)中，通过全内反射显微镜(TIRF)采集光学图像来精确定位引物/模板核酸复合物所处的位置。

在本发明实施例中，对延伸前后的、被荧光分子标记的引物和/或模板核酸进行定位的分析装置没有特别限制，本领域现有普通常用的即可。例如，本发明实施例中，可采用专利申请号为 201510483297.6 所记载的单分子定位装置对光学图像(特别地，为 TIRF 采集的光学图像)进行分析，精确获得被荧光分子标记的第一复合物或引物/模板核酸复合物的单分子二维位置坐标。

本发明实施例中，可采用专利申请号为 201510483207.3 所记载的单分子定位方法对光学图像(特别地，为 TIRF 采集的光学图像)进行分析，精确获得被荧光分子标记的引物/模板核酸复合物的单分子二维位置坐标。

在本发明实施例中，对延伸反应采用的聚合酶没有特别限制，本领域现有普通常用的即可。在本发明一实施例中，在本发明第一或第二方面中，所述的聚合酶选自逆转录酶、末端转移酶或 DNA 聚合酶。

在本发明一实施例中，在本发明第一或第二方面中，步骤(iii)还包括对获得的延伸产物进行清洗。

在本发明实施例中，所述核苷酸的可断裂的基团没有特别限制，本领域现有普通常用的即可。在本发明一实施例中，在本发明第一或第二方面中，步骤(iii)中，所述核苷酸的可断裂的基团为光可裂解的基团、化学断裂的基团或酶催化断裂的基团。本发明实施例通过去除某核苷酸的可断裂基团以去除该核苷酸上的光学检测标记。

在本发明一实施例中，在本发明第一或第二方面中，步骤(v)还包括对除去光学检测标记处理后的

延伸产物进行清洗。

在本发明一实施例中，在本发明第一或第二方面中，还包括同步地对多个靶核酸测序。

在本发明一实施例中，在本发明第一方面中，步骤 iv 包括：利用不同光源对所述延伸产物进行成像，获得多个第二图像。

在本发明另一实施例中，在本发明第一方面中，所述步骤(iv)中，所述的对延伸后的第一复合物进行成像的步骤包括：在延伸反应后的同一时间点，对第一复合物中的模板核酸、以及在该延伸反应中结合到引物链 3' 端的带光学检测标记的核苷酸进行成像。

在本发明一实施例中，在本发明第二方面中，所述步骤(iv)中，所述的对延伸后的引物/模板核酸复合物进行成像的步骤包括：在延伸反应后的同一时间点，对引物/模板核酸复合物中的模板核酸、以及在该延伸反应中结合到引物链 3' 端的带光学检测标记的核苷酸进行成像。

在本发明一实施例中，在本发明第一或第二方面中，所述(iv)的步骤包括：通过全内反射显微镜(TIRF)采集光学图像来鉴定步骤(iii)引入的核苷酸种类。

在本发明实施例中，对所述引物/模板核酸复合物进行成像的装置没有特别限制。本领域现有普通的即可。特别地，本发明提供的单分子测序方法中的图像采集步骤优选采用全内反射显微系统(TIRF)，提升信噪比。本发明提供的方法在每次步骤(iii)的延伸反应之后分别对模板核酸和带荧光标记的核苷酸拍照；通过对同一个坐标视野的前后两次成像，纠正进行拍照时，由于载物台的轻微移动或样品漂移产生的些许偏差。

在本发明一实施例中，在本发明第二方面中，所述步骤(iv)中，所述的对延伸后的引物/模板核酸复合物进行成像，并结合步骤(ii)中引物/模板核酸复合物的成像以鉴定模板核酸上的待测核苷酸序列的步骤包括：对延伸后的引物/模板核酸复合物进行成像，并结合步骤(ii)中引物/模板核酸复合物的成像，进行图像纠偏，以鉴定模板核酸上的待测核苷酸序列。

在本发明实施例中，所述的进行图像纠偏的装置没有特别限制。本领域现有普通的即可。例如，本发明实施例中，可采用专利申请号为 201510500962.8 所记载的单分子图像纠偏装置对在不同时刻采集的光学图像（特别地，为 TIRF 采集的光学图像）进行单分子图像纠偏。又例如，本发明实施例中，可采用专利申请号为 201510501154.3 所记载的单分子图像纠偏方法对在不同时刻采集的光学图像（特别地，为 TIRF 采集的光学图像）进行单分子图像纠偏。

如无特殊说明，本文中“图像比对和纠偏”等同于“图像纠偏”。

在本发明一实施例中，在本发明第一方面中，所述的单分子测序方法还包括基于所述第一图像和所述第二图像，确定所述模板核酸序列。

在本发明一实施例中，在本发明第一方面中，所述基于第一图像和第二图像，确定模板核酸序列，包括，比较所述第一图像和/或所述第二图像的差异，对所述第一图像和/或所述第二图像进行第一纠偏和/或第二纠偏，获得纠偏后的第一图像和/或纠偏后的第二图像。对图像的纠偏处理，能够至少部分纠正由于反应中载物台漂移或者反应中试剂洗涤引起的漂移造成的图像采集时荧光点的位置偏差，利于基于图像的碱基识别。

进一步地，所述第一纠偏基于同一轮反应中的第一图像和第二图像进行，所述第二纠偏基于相邻轮反应中的第一图像之间或者第二图像之间进行，定义(ii)至(v)为一轮反应。所称的相邻轮反应中的图像，可以是相邻两轮、相邻三轮、相邻五轮或者相邻十轮反应中的多个第一图像或者多个第二图像。

在本发明一实施例中，所述的进行图像纠偏的步骤包括第一纠偏处理和第二纠偏处理的一种或两种，其中，所述的第一纠偏处理包括：对同一位点的第一复合物在延伸反应前后不同时间点的成像进行图像比对和纠偏；所述的第二纠偏处理包括：对同一位点的模板核酸在某轮延伸反应后的成像与该延伸反应中结合到该位点的带光学检测标记核苷酸的成像进行图像纠偏。

在本发明一优选实施例中，在本发明第一或第二方面中，对不同时间点对同一位置拍摄的多个单分子图像的比对和纠偏的方法包括：1、首先读取第一时间点的单分子成像图片，然后再读取第二时间点的单分子成像图片，均在 matlab 里面保存为 uint16 格式的矩阵；2、对第一时间点的单分子成像图片

矩阵进行二维傅里叶变换, 保存变换后的矩阵 fft_ref ; 3、对第二时间点的单分子成像图片矩阵进行二维傅里叶变换, 保存变换后的矩阵 fft_frame ; 4、取两个时间点图片傅里叶变换后的矩阵的卷积 $\text{prod}=\text{fft_ref}.\text{conj}(\text{fft_frame})$; 5、对 prod 矩阵进行二维傅里叶反变换得到矩阵 $\text{cc}=\text{ifft2}(\text{prod})$; 6、对 cc 这个矩阵进行 fftshift 变换, 找到变换后矩阵最大值的坐标, 再减去原始图片大小的一半, 得到的不同时间点图片的偏移量; 7、最后再根据偏移量对第二时间点的图片用 circshift 函数来矫正偏移量。

值得注意的是, 本发明实施例中, 虽然每一轮延伸反应都涉及成像; 每轮成像涉及的纠偏处理过程, 可以理解的是, 纠偏可以在每轮反应中进行, 也可以在完成多轮反应后进行。根据本发明的一个实施例, 在所有延伸反应结束后才对所有成像的图片进行纠偏处理。

在本发明一实施例中, 在本发明第一或第二方面中, 所述的单分子测序方法还包括: 获取模板核酸; 对模板核酸进行处理, 以获得所述末端带第一光学检测标记的模板核酸。

在本发明一实施例中, 在本发明第一或第二方面中, 所述模板核酸为 DNA 和/或 RNA。

在本发明一实施例中, 在本发明第一或第二方面中, 所述单分子测序方法还包括对测序结果进行生物信息学分析。在本发明实施例中, 所述的对测序结果进行生物信息学分析没有特别限制。本领域现有普通常用的即可。

第三方面, 本发明提供了一种单分子测序装置, 该装置能够用以实施上述本发明任一实施例中的单分子测序方法, 该装置包括: 结合模块, 用于将末端带第一光学检测标记的模板核酸与引物结合, 以获得第一复合物, 所述引物连接在基底表面上; 第一成像模块, 用于对来自所述结合模块的第一复合物进行成像, 获得第一图像; 合成模块, 用于将来自所述结合模块的第一复合物、聚合酶以及一种或多种带第二光学检测标记的核苷酸混合, 通过聚合酶反应将一种或多种带第二光学检测标记的核苷酸添加至所述第一复合物上, 获得延伸产物, 其中, 所述带第二光学检测标记的核苷酸包括依次连接的第二光学检测标记、可断裂的基团和核苷酸; 第二成像模块, 用于对来自所述合成模块的延伸产物进行成像, 获得第二图像; 切割模块, 用于除去来自所述合成模块的延伸产物上的可断裂的基团, 以获得第二复合物; 迭代模块, 用于以来自切割模块的第二复合物替代来自所述结合模块的第一复合物, 依次进入第二成像模块、合成模块、第二成像模块和切割模块一次或者多次, 以确定所述模板核酸序列。

本领域技术人员可以理解, 上述本发明这一方面的装置, 通过使功能模块具有相应的功能或者增加新的功能模块或子模块, 能够用于实施上述本发明任一实施例中的单分子测序方法, 上述本发明任一实施例的优点或技术特征的描述, 同样适用本发明这一方面的装置, 在此不再赘述。

第四方面, 本发明提供了一种单分子测序装置, 包括: 用于为测序反应提供反应腔室的芯片腔室; 基底, 设置在芯片腔室内, 用于固定引物和结合待测核酸; 流路系统, 与芯片腔室连接, 用于可控地操控处理试剂在基底所在的芯片腔室内的进出; 温度控制系统, 与芯片腔室连接, 用于调节和维持芯片腔室内的温度; 光学系统, 与芯片腔室连接, 包括激光光源, 所述光学系统用于激发芯片腔室内的荧光标记发出荧光; 检测器组件, 与芯片腔室连接, 用于检测和记录芯片腔室内荧光标记发出的荧光信号; 计算机, 具有控制系统以及图像处理单元, 其中, 所述图像处理单元用于获得芯片腔室内的测序反应过程中的延伸反应前后引物-待测核酸复合物的定位结果, 以及对所得定位结果进行图像比对和纠偏, 以鉴定待测核酸序列。

在本发明一实施例中, 图像处理单元还用于对芯片腔室内的测序反应过程中的延伸反应前后的待测核酸在延伸反应后的成像与该延伸反应中结合到该位点的带光学检测标记核苷酸的成像进行图像比对和纠偏。

在本发明实施例中, 所述的芯片腔室、基底、流路系统、温度控制系统、光学系统、检测器组件、计算机均没有特别限制。本领域普通常用的即可。

特别地, 单分子基因测序的流体控制装置是单分子测试仪的关键模块, 而单分子基因测序的流体控制装置中的基因芯片是进行生化反应和光学成像的核心部件, 基因测序的流体控制装置通常设置多个流

体输送器件，该流体输送器件具有向基因芯片输送各种反应试剂、控制试剂流向和流量、控制试剂的混合、导出废弃液等功能。

本发明一实施例中，所述的流路系统可采用专利申请号为 201510585327.4 所记载的基因测序的流体控制装置向基地（例如基因芯片）所在的芯片腔室输送各种反应试剂，并通过计算机控制系统控制试剂流向和流量、控制试剂的混合、导出废弃液等。

本发明一实施例中，所述的光学系统及检测器组件组成荧光成像系统，可选地，所述荧光成像系统可采用专利申请号为 201510562591.6 所记载的全内反射荧光成像系统激发荧光并采集光学图像。

在本发明一实施例中，所述计算机控制的系统包括：流路系统，温控系统，光学和检测系统。可选地，还包括数据分析软件。

本发明一实施例中，所述的图像处理单元包括单分子定位模块及单分子图像纠偏模块。

在本发明实施例中，所述的单分子定位模块用于对延伸前后的、被荧光分子标记的引物和/或模板核酸进行定位获得，所述的单分子定位模块没有特别限制，本领域现有普通常用的即可。例如，本发明实施例中，可采用专利申请号为 201510483297.6 所记载的单分子定位装置对光学图像（特别地，为 TIRF 采集的光学图像）进行分析，精确获得被荧光分子标记的引物/模板核酸复合物的单分子二维位置坐标。

在本发明实施例中，所述的单分子图像纠偏模块用于对芯片腔室内的测序反应过程中的延伸反应前后引物/待测核酸复合物的定位结果进行图像比对和纠偏，以鉴定待测核酸序列。在本发明实施例中，对单分子图像纠偏模块怎样实现图像的纠偏没有特别限制，可参照上述相关段落的描述进行。

第五方面，本发明提供了一种单分子测序系统，包括如第二方面所述的单分子测序装置。可选地，还包括数据分析软件。

第六方面，本发明提供了一种单分子测序试剂盒，包括第一方面或第二方面任一方法中的基底和引物。

在本发明一实施例中，所述的单分子测序试剂盒还包括实现第一方面或第二方面任一方法所需要的试剂。具体地，实现第一方面或第二方面任一方法所需要的试剂可包括固定反应试剂、延伸反应试剂、成像试剂、切除光学检测标记分子的试剂。

可以理解的是，所述单分子测序试剂盒还包括缓冲液或其他测序必要试剂。在本发明实施例中，所述的基底、固定反应试剂、延伸反应试剂、成像试剂、切除光学检测标记分子的试剂均没有特别限制。本领域现有普通常用的即可。比如，本领域技术人员根据需要分别配置针对的固定反应试剂、延伸反应试剂、切除光学检测标记分子等不同过程的缓冲液。

本发明提供的单分子测序方案先在基底上随机固定引物；将末端带有光学检测标记的小片段 DNA 模板与固定好的引物进行杂交并精确定位，通过全内反射显微镜（TIRF）采集光学图像来精确定位杂交后模板所处的位置；逐次加入带有可切除光学检测标记的单色或者多色末端终止子及聚合酶的混合液孵育，洗涤，进行光学成像，记录本次反应的点位；之后再加入试剂以切除延伸点位的光学检测标记，洗涤，加帽，准备好下一个核苷酸的延伸反应。通过延伸反应、成像检测和切除荧光分子的反复循环，就可以实现单分子靶向实时测序。

附图说明

图 1 为本发明实施例提供的单分子测序装置 01 结构示意图；

图 2 为本发明实施例提供的单分子测序原理示意图；

图 3 为本发明实施例对引物进行固定的原理图；

图 4-7 为本发明实施例提供的核酸芯片固定反应结果。

具体实施方式

图 1 为本发明实施例提供的单分子测序装置 01 结构示意图。本发明提供的单分子测序系统包括本发明提供的单分子测序装置 01。

如图 1 所示, 本发明提供的单分子测序装置 01 可用于对平面基底进行成像, 其中基底结合有引物。在用于测序时, 本发明提供的装置可选地包括: 用于给测序反应提供反应腔室的芯片腔室 001, 使待测核酸与流路系统传输的试剂进行测序反应; 基底 002, 设置在芯片腔室内, 用于结合一条或多条引物; 流路系统 003, 与芯片腔室连接, 用于可控地操控各种试剂(例如缓冲剂、酶、荧光标记核苷酸等)在基底所在的芯片腔室内的进出; 温度控制系统 004, 与芯片腔室连接, 用于调节和维持芯片腔室内的温度; 光学系统 005, 与芯片腔室连接, 包括激光光源(例如一个或多个激光器), 所述光学系统用于激发芯片腔室内的荧光标记发出荧光; 检测器组件 006(例如 EMCCD 相机等), 与芯片腔室连接, 用于检测和记录芯片腔室内荧光标记发出的荧光信号; 计算机 007, 具有用于控制系统(比如流路系统, 温控系统, 光学和检测系统、图像系统, 还可包括数据分析软件, 其中, 计算机 007 与流路系统 003, 温控系统 004, 光学系统 005 和检测器组件 006 之间通信连接)的各个组件; 其中, 所述图像系统用于获得芯片腔室内的测序反应过程中的延伸反应前后引物/待测核酸复合物的定位结果, 以及对所得定位结果进行图像比对和纠偏, 以鉴定待测核酸序列。

在本发明一实施例中, 本发明提供的单分子测序技术采用了本发明提供的单分子测序装置, 包括如下步骤: 将模板/引物双链与基底表面上的环氧基团共价结合; 进行边测序边合成(SBS)反应对掺入的核苷酸进行光学检测。

本领域普通技术人员可以理解的是, 本发明的方法可用于部分测序, DNA 指纹, 多态性鉴定, 例如单核苷酸多态性(SNP)的检测, 以及遗传癌症研究应用。本发明的方法也可用于 RNA 序列测序以确定替代剪接位点, 拷贝数, 检测基因表达, 识别未知的细胞中以低拷贝数存在的 RNA 分子。本发明的方法也可用于确定哪些序列转录来注释基因组, 确定系统发育关系, 阐明细胞分化, 促进组织工程。

针对不同医疗应用, 通过对应的方法提取所需检测的核酸模板并进行预处理。在本发明一实施例中, 核酸模板分子包括脱氧核糖核酸(DNA)和/或核糖核酸(RNA)。核酸模板分子可以从含有各种其它成分, 如蛋白质, 脂质和非模板核酸的生物样品中分离出来。核酸模板分子可以来自动物, 植物, 细菌, 真菌, 或任何其他细胞生物体获得。本发明的生物样品包括病毒(DNA 或 RNA 病毒)。核酸模板分子可以直接从生物体获得的生物样品, 例如从血液, 尿, 脑脊髓液, 精液, 唾液, 痰, 粪便或其他组织获得。任何组织或体液样品可以用作核酸在本发明中使用的来源。核酸模板分子也可以从培养的细胞, 如原代细胞培养物或细胞系中分离。样品还可以是从生物样品提取的总 RNA 或基因组 DNA。

核酸从生物样品提取后通常被打断以产生合适的片段进行分析获得的。一般而言, 随机打断为 200 bp 左右的片段。在一个实施方案中, 从生物样品中提取的核酸通过超声处理打断。一般地, 从生物样品中提取的核酸的各种技术为行业内常规技术, 例如 Maniatis 等人所述的《分子克隆实验室手册》, 冷泉港, NY, 第 280-281 (1982)。通常, 单个核酸模板分子的长度可以为约 5 个碱基至约 20 kb。核酸分子可以是单链的, 双链的, 或双链的单链区(例如, 茎和环结构)。

引物(与待测核酸片段的部分序列互补)尽可能覆盖所需待测序基因片段, 稳定高效的捕获靶向 DNA 片段, 比如针对 HBV 病毒的测序, 需要尽可能设计覆盖所有的基因突变点和耐药位点的引物。引物一般固定在光学透明的经过修饰的基底上面。基底表面需要经过化学修饰以便于引物通过化学键或者物理吸附作用固定在基底表面。基底为具有低的天然荧光或基本上不发荧光的任何合适的载体。

在一个优选的实施方案中, 用于本发明的基底可以是二维或三维的, 并且可以包括一个平坦表面(例如, 玻璃载玻片), 或者可以是其他形状。本发明的基底可以包括玻璃(例如, 可控孔度玻璃(CPG)), 石英, 塑料(如聚苯乙烯, 不限于低交联和高交联的聚苯乙烯), 聚碳酸酯, 聚丙烯和聚甲基丙烯酸甲酯(methylmethacrylate), 丙烯酸共聚物, 聚酰胺, 硅, 金属(例如, 烷基硫醇(alkanethiolate)-衍生金), 纤维素, 尼龙, 乳胶, 葡聚糖, 凝胶基质(例如, 硅胶), 聚丙烯醛, 或复合材料。

合适的三维基底包括, 例如, 球, 微粒, 珠, 膜, 载玻片, 平板, 微机械加工的芯片, 管(例如, 毛细管), 微孔, 微流体装置, 通道, 过滤器, 或任何其它合适用于锚定核酸的结构。基底可包括具有引物区域的平面阵列或矩阵, 比如包括核苷衍生的 CPG 和聚苯乙烯基底片; 衍生的磁基底片等。

引物(优选地, 引物 5' 端包括聚胸腺嘧啶核苷酸(聚 dT)的寡核酸链)通过行业内常规的化学键

或者物理吸附作用固定在基底表面，可以直接或间接（如通过生物素）固定在基底表面。在一个具体实施方案中，我们使用的是经环氧硅烷处理的低荧光玻璃表面，其表面的环氧键可以和引物末端的氨基进行化学键合。在一些实施方案中，引物分子的 5' 端连接聚胸腺嘧啶核苷酸（聚 dT）的寡核酸链的 3' 端，聚 dT 寡核酸链的 5' 端通过氨基与基底表面的环氧键键合。在一个优选的实施方案中，引物分子的 5' 端顺次连接有聚胸腺嘧啶核苷酸（聚 dT）的寡核酸链和烷基链（比如， $-(\text{CH}_2)_6-$ ）和末端氨基，其中，聚 dT 寡核酸链的 3' 端与引物分子的 5' 端相连，聚 dT 寡核酸链的 5' 端与烷基链相连，烷基链通过氨基与基底表面的环氧键键合。

固定好的引物密度要求为在保证单分子级别的分散度上，尽可能的密度高一些，这样可以保证尽可能高的测序通量。在一实施方案中，基底可以采用行业内其他处理方式，以改善核酸附着效率。在其他实施方案中，可以对本发明中使用的基片进行处理，以降低背景噪音。用于对基底进行修饰的环氧化物还可以为环氧化物的衍生物。

在基底固定了引物之后，还需要经过化学钝化处理以消除未封闭的环氧基团和防止测序过程中产生的非特异性吸附带来的噪声。表面钝化处理有很多种方法，由于测序中的荧光标记的碱基分子是负电的，在我们的具体实验中，使用磷酸盐来封闭玻璃表面的环氧基团，并产生负电层，以减小负电性的碱基吸附。

结合图 2，本发明提供的单分子测序方法，包括：

样品制备，基底表面处理以及引物（优选地，引物 5 端包括聚胸腺嘧啶核苷酸（聚 dT）的寡核酸链）的固定，成像，和图像处理获得序列的分析步骤。

在一具体实施方案中，如图 2 所示，为本发明单分子测序原理示意图。测序前需要首先将待测的跟疾病相关的待测序列打断成小片段 DNA 模板，DNA 模板的末端标记有可光学检测的标记分子，从而通过光学显微镜进行记录和定位 DNA 模板的坐标；同时在设置在芯片腔室内的基底上随机固定多个 5 端包括聚 dT 的引物；将小片段 DNA 模板与固定好的引物进行杂交并精确定位，通过全内反射显微镜（TIRF）采集光学图像来精确定位杂交后小片段 DNA 模板所处的位置；逐次加入带有检测标记的核苷酸及聚合酶的混合液孵育，洗涤，进行光学成像，记录本次反应的点位；之后再加入试剂以切除延伸点位的荧光分子，洗涤，加帽，准备好下一个核苷酸的延伸反应。通过延伸反应、成像检测和切除荧光分子的反复循环，就可以实现实时测序。

本发明提供的单分子测序方法采用到的聚合酶，优选为降低核酸外切酶活性的 Klenow 聚合酶。可选地，本发明可用核酸聚合酶包括但不限于本领域文献记载或商用的 DNA 聚合酶，RNA 聚合酶，逆转录酶，和/或任何上述聚合酶突变形式。

在本发明一实施方案中，每个循环反应中，采用的带有检测标记的核苷酸为多色核苷酸（比如，四种核苷酸分别带不同的待测标记），可同时加入同一个循环反应的反应体系。本发明采用的核苷酸上的检测标记可来自行业内常规标记，包括但不限于：荧光素，罗丹明，花青，Cy5，Cy3，BODIPY，Alexa 及其衍生物等。

以单分子测序为标志的第三代测序的技术，需采用循环可逆终止（cyclic reversible termination, CRT）的办法来实现单个核苷酸的延伸以提高测序准确度。即当某一个带有抑制基团的核苷酸加到 DNA 链上之后，可以阻止下一个核苷酸的延伸；在温和条件下该抑制核苷酸可以被除去从而使该 DNA 链得以继续延伸。每增加一个核苷酸，可以通过对其所带荧光的检测实现对该 DNA 链的实时测序。这样一个带抑制基团的核苷酸被称作终止子（terminator）。在本发明一实施方案中，采用的带有检测标记的核苷酸为可切除荧光标记的单色或者多色可逆末端终止子。在本发明一优选实施方案中，可逆末端终止子为光可断裂的荧光标记可逆终端化合物。在本发明另一优选实施方案中，可逆末端终止子为化学断裂或酶催化断裂的荧光标记可逆终端化合物。

在一些实施方案中，至少 3 个，至少 5 个，至少 10 个，至少 20 个，至少 30 个，至少 50 个，至少 100 个，至少 500 个，至少 1000 个或至少 10000 个连续循环反应用于延伸特异性杂交有模板链的引物，每次循环，延伸 1 个带荧光标记可逆终止子，每进入下一次循环之前，带荧光标记可逆终止子去掉其荧

光标标记及抑制基团。

鉴于边合成边测序的原理需要精确的温度控制和经历多次化学冲洗，测序样品被封装在一个设计好的微流体控制系统，保证精准的温度和试剂流动。为保证测序的通量，在本发明一优选实施方案中，可以设置多个通道。装配好的样品最终被放置在一个可观察单分子信号的全内反射光学显微镜上面。光学信号包括荧光，拉曼，散射等。在本发明一具体实验中，观察的光学信号是单分子的荧光信号。为防止定位信号和测序信号发生重叠，本发明使用不同激发信号分别激发定位荧光分子和测序标记分子。在多次成像过程中，荧光分子会发生淬灭，导致测序信号丢失和测序读长短，为改善这些问题，本发明特别关注了荧光淬灭问题，并在成像时通过加入研发的成像试剂，缩短曝光时间，减弱激发强度等手段来保证测序的准确性。

在本发明一实施方案中，本发明提供的单分子测序方法还包括：图像采集过程。图像采集采用的是全内反射显微系统（TIRF），单分子信号非常弱，TIRF 系统能够显著降低背景噪音，从而提升信噪比。本发明实施例中采用的系统为双色激光光路系统，每次采集图像之前，需要按照化学冲洗流程对封装在微流控系统的样品进行处理，然后进行拍照，为了防止样品漂移，定位信息需要每次延伸反应之前进行拍照，然后碱基延伸后再拍照以获得测序信号。

本发明提供的单分子测序方法中的图像采集步骤优选采用全内反射显微系统（TIRF），提升信噪比。本发明提供的方法在每次步骤(iii)的延伸反应之前进行一次拍照，然后在每次步骤(iii)的碱基延伸后再拍照一次；通过对同一个坐标视野的前后两次成像，纠正进行拍照时，由于载物台的轻微移动或样品漂移产生的些许偏差。

在本发明一具体实施例中，对不同时间点对同一位置拍摄的多个单分子图像的纠偏的方法包括：1、首先读取第一时间点的单分子成像图片，然后再读取第二时间点的单分子成像图片，均在 matlab 里面保存为 uint16 格式的矩阵；2、对第一时间点的单分子成像图片矩阵进行二维傅里叶变换，保存变换后的矩阵 `fft_ref`；3、对第二时间点的单分子成像图片矩阵进行二维傅里叶变换，保存变换后的矩阵 `fft_frame`；4、取两个时间点图片傅里叶变换后的矩阵的卷积 `prod=fft_ref.*conj(fft_frame)`；5、对 `prod` 矩阵进行二维傅里叶反变换得到矩阵 `cc=ifft2(prod)`；6、对 `cc` 这个矩阵进行 `fftshift` 变换，找到变换后矩阵最大值的坐标，再减去原始图片大小的一半，得到的不同时间点图片的偏移量；7、最后再根据偏移量对第二时间点的图片用 `circshift` 函数来矫正偏移量。

在本发明一实施方案中，本发明提供的单分子测序方法还包括：图像处理过程。在成像步骤中，每次核苷酸延伸反应所获的图像可能有几十或者上千个视野。对于图像的处理，需要精准计算出每个反应的坐标位置并记录；在之后的每次碱基延伸过程中所获的图像要经过图像处理软件进行位置纠偏，以校对化学冲洗过程以及样品移动造成的位置漂移。然后再进行图像重叠，对有测序反应的位置进行逐次叠加、计算以获得每个位置的碱基序列。

在本发明一实施方案中，本发明提供的单分子测序方法还包括：生物信息学分析过程。在所获得的碱基序列的基础上，通过碱基判定和比对，最终获得所测 DNA 片段的完整序列。生物信息学介入以完成对该片段的生物学意义的分析，并帮助医生判断药物的选择，疾病的筛查等。

具体实施例

材料及试剂说明：

非特殊说明，本发明实施例采用的试剂均为市售商品，本发明实施例采用的数据库均为公开的在线数据库。

20 x SSC：在 800ml 水中溶解 175.3g NaCl 和 88.2g 柠檬酸钠，加入数滴 10mol/l NaOH 溶液调节 pH 值至 7.0，加水定容至 1L，分装后高压灭菌。SSC 是分子生物学上最为标准的印迹及分子杂交处理液，20*SSC 用于杂交实验变性及清洗常用浓缩型缓冲液。

DNA 芯片固定

如图 3 所示，图 3 为本发明实施例对引物进行固定的原理图。图 3 包括 a-b，a 为在环氧基玻片上固定引物 DNA 示意图，b 为在修饰有其他基团的玻片上固定引物的流程示意图。该技术利用了环氧基团

CAGACACATCCAGCGATAAC 为 SEQUENCE NO. 5 所示。

T10C30-Cy3 (5' → 3'):

AmMC6TTTTTTTTTTTAAAACGCCGCAGACACATCCAGCGATAAC-Cy3,

具体地, 所述

TTTTTTTTTTTAAAACGCCGCAGACACATCCAGCGATAAC 为 SEQUENCE NO. 6 所示。

C30-Cy3 (5' → 3'):

AmMC6AAAACGCCGCAGACACATCCAGCGATAAC-Cy3,

具体地, 所述

AAAACGCCGCAGACACATCCAGCGATAAC 为 SEQUENCE NO. 7 所示。

T10C40-Cy3 (5' → 3'):

AmMC6TTTTTTTTTTAGGAAGATGATAAAAACGCCGCAGACACATCCAGCGATAAC-Cy3,

具体地, 所述

TTTTTTTTTTAGGAAGATGATAAAAACGCCGCAGACACATCCAGCGATAAC 为 SEQUENCE NO. 8 所示。

C40-Cy3 (5' → 3'):

AmMC6AGGAAGATGATAAAAACGCCGCAGACACATCCAGCGATAAC-Cy3,

具体地, 所述

AGGAAGATGATAAAAACGCCGCAGACACATCCAGCGATAAC 为 SEQUENCE NO. 9 所示。

T20C20-Cy3 (5' → 3'):

AmMC6TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCAGACACATCCAGCGATAAC-Cy3,

具体地, 所述

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCAGACACATCCAGCGATAAC 为 SEQUENCE NO. 10 所示。

C20-Cy3 (5' → 3'):

AmMC6CAGACACATCCAGCGATAAC-Cy3,

具体地, 所述

CAGACACATCCAGCGATAAC 为 SEQUENCE NO. 11 所示。

T20C50-Cy3 (5' → 3'):

AmMC6TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCAGGATGCAGAGGAAGATGATAAAAACGCCGCAGACACATCCAGCGATAAC-Cy3,

具体地, 所述

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCAGGATGCAGAGGAAGATGATAAAAACGCCGCAGACACATCCAGCGATAAC 为 SEQUENCE NO. 12 所示。

C50-Cy3 (5' → 3'):

AmMC6CAGGATGCAGAGGAAGATGATAAAAACGCCGCAGACACATCCAGCGATAAC-Cy3,

具体地, CAGGATGCAGAGGAAGATGATAAAAACGCCGCAGACACATCCAGCGATAAC 为 SEQUENCE NO. 13 所示。

采用前述 DNA 芯片固定方法进行固定, 实验结果显示, 上述 DNA 均获得与 T10C50-Cy3 类似的固定效果, 以及“T10C50-Cy3 和 C50-Cy3”类似的固定规律: DNA 由 polyT-(CH₂)_n-DNA-Cy3 换为 -(CH₂)_n-DNA-Cy3 时, 固定密度会由 2000-3500 降为 150 左右; 在-(CH₂)_n-的 5' 端加入 10-30bp 的 polyT 时, 固定密度又增加至 2000-3500, 这说明 DNA 的 5' 端存在一段碱基 T 会大大提高固定的密度。本实施方式中的部分实验结果如图 3 所示。

DNA 芯片的钝化中转速对荧光斑点的影响

按照上述的“DNA 芯片固定”中记载的实验方法进行操作, 不同的是:

步骤 1) 中, 待固定的 DNA 为 T10C50-Cy3, 其浓度分别为 0.4nM、0.8nM、1.6 nM、3.2 nM; 此外, 步骤 4) 中, 在钝化时, 分为两批进行平行试验, 两组实验分别在 0rpm/min 和 80rpm/min 摇晃条件下钝

化。本发明实施例中，“rpm/min”与“r/min”可以互换。

重复三次并统计固定上的序列数目。荧光显微镜拍照结果如图 5 和图 6 所示。图 5 为钝化过程中转速为 0 rpm/min 时荧光显微镜拍照结果，包括 a-d，分别 0.4nM、0.8nM、1.6 nM、3.2 nM 的 T10C50-Cy3 的固定效果。图 6 为钝化过程中转速为 80 rpm/min 时荧光显微镜拍照结果，包括 a-d，分别 0.4nM、0.8nM、1.6 nM、3.2 nM 的 T10C50-Cy3 的固定效果。

图 7 为转速设置为 80 rpm/min，不同浓度固定 DNA 的固定密度。

由图 5-7 可知：

1. 对比对应浓度下 532 荧光照片可以看出，在钝化过程中将摇床的转速设置为 40-80 rpm/min（优选为 80 rpm/min）可以显著消除掉大的荧光斑点；

2. 在钝化过程中转速一定的条件下，固定的密度会随着待固定 DNA 浓度的提高而提高，由此可以根据我们需要的固定浓度来选择最佳的固定浓度。在后续的杂交实验中，当固定的密度高于 4000 以上时，固定 DNA 浓度过高会造成对待杂交的 DNA 分子空间位阻过大，会导致杂交密度过低，故根据杂交实验结果，我们选择较为适宜的固定浓度为 0.8-1.6 nM。

值得注意的是，在 DNA 芯片固定实验中，本发明实施例在引物的 3' 端标记荧光，目的是更好的追踪引物位置，摸索出更合适的固定密度。在应用中，引物的 3' 端没有荧光标记，便于核苷酸在聚合酶的催化下得以延伸。

可以理解的是，本领域技术人员可以根据需要在引物 3' 端之外的其他位置（不影响延伸反应）标记光学检测标记，比如荧光标记。

DNA 单分子测序

具体地，以一具体样品为例，本发明实施例提供一种单分子测序方法包括：

1. 测序反应：测序前需要首先将待的跟疾病相关的测序列打断成小片段，并在其末端标记荧光；同时在基底上随机固定多个靶向设计的引物；将小片段 DNA 模板与固定好的引物进行杂交并精确定位，通过全内反射显微镜（TIRF）采集光学图像来精确定位杂交后模板所处的位置；逐次加入带有可切除荧光标记的单色或者多色末端终止子及聚合酶的混合液孵育，洗涤，进行光学成像，记录本次反应的点位；之后再加入试剂以切除延伸点位的荧光分子，洗涤，加帽，准备好下一个核苷酸的延伸反应。通过延伸反应、成像检测和切除荧光分子的反复循环，就可以实现实时测序。

2. 图像采集：图像采集采用的是全内反射显微系统（TIRF），因为单分子信号非常弱，TIRF 系统能够显著降低背景噪音，从而提升信噪比。这个系统为双色激光光路系统，每次采集图像之前，需要按照化学冲洗流程对封装在微流控系统的样品进行处理，然后进行拍照，为了防止样品漂移，定位信息需要每次延伸反应之前进行拍照，然后碱基延伸后再拍照以获得测序信号。

3. 图像处理：在步骤 1 中，本发明依据所需测序要求进行成像，每次碱基延伸反应所获的图像可能有几十或者上千个视野。对于图像的处理，需要精准计算出每个反应的坐标位置并记录；再之后的每次碱基延伸过程中所获的图像，要经过图像处理软件进行位置纠偏，校对所经历的化学冲洗过程以及样品移动造成的位置漂移。然后再进行图像重叠，对有测序反应的位置进行逐次叠加以获得每个位置的碱基序列。

4. 生物信息学分析：在所获得的碱基序列的基础上，通过碱基判定和比对，最终获得所测 DNA 片段的完整序列。生物信息学介入以完成对该片段的生物学意义的分析，并帮助医生判断药物的选择，疾病的筛查等。

本发明人研发团队在《自然》(nature)杂志 scientific reports 发表的《Single molecule targeted sequencing for cancer gene mutation detection》采用了本发明提供的技术方案对人工合成的 DNA 样品（含有低频突变）进行检测，验证本发明提供的技术方案可以在不扩增原始样品的条件下对样品中的低频、低丰度突变位点的检测效果。文章《Single molecule targeted sequencing for cancer gene mutation detection》所提供的所有数据都可引入本发明，作为本发明实施方式的一部分。

如文章中记载的，我们开发了测序原型机，作为本发明第 [000129]-[000137] 所记载的单分子测序

装置实现方式的一种示例。

具体地，测序原型机包括：全内反射荧光（TIRF）显微镜，其配置有 60 倍物镜（oil）（Nikon Ti-E, Japan），分别率为 512×512 的 EMCCD 相机（Andor, Belfast, UK），2 色激光功率（532nm, 100mW；以及 640 nm, 100mW）光源；以及一个安装在 TIRF 显微镜上的载物台（ASI, Eugene, OR, USA），其用于支撑和控制流路池在测序过程中（Bioptechs, Bulter, PA, USA）的移动；加热装置（Bioptechs, Bulter, PA, USA）则可维持流路池内样品池和物镜的温度在 37 摄氏度左右。

具体地，文章所记载的技术方案采用的 FCS2 流路池包括具备环氧基修饰的玻璃片（Schott, Jena, Germany），玻璃片厚 0.175mm 和直径 40mm。在玻片和渡槽之间设置衬垫形成用于测序反应的样品池（ $3 \text{ mm} \times 23 \text{ mm} \times 0.25 \text{ mm}$ ）。一个具有 12 条通道的 Titan EZ 阀（IDEX Health & Science, Oak Harbor, WA, USA）将测序反应试剂和测序流路池的入口相连，一个注射泵通过抽吸将液体系统从样品池中抽走（Tecan Männedorf, Swiss）。

文章提供了我们开发的测序原型机（单分子测序装置）的测序流程示意图。包括光路模块示意图和测序过程中 TIRF 的单分子检测原理示意图。在光路模块示意图，目标 DNA 片段 3' 端的 Cy3 荧光标记被绿色激光激发；Cy3 荧光标记是非可断裂基团；引物上修饰的可断裂基团 ATTO647N 荧光标记被红色激光激发；EMCCD 拍照系统可独立采集 Cy3 荧光标记和 ATTO647N 荧光标记的荧光图像；在单分子检测原理示意图中，引物共价连接在玻片表面，目标 DNA 片段与引物互补结合，TIRF 的消逝波（evanescent wave）只激发样品池表面上方 200nm 的区域。因此，只有处于消逝波激发区域的待测 DNA 模板链才能被检测到。具体地，文章采用的合成 DNA 模板以及引物的序列如文章表 1（table）所示。

具体地，作为本发明第 [000201]–[000205] 所记载的单分子测序方法实现方式的一种示例，文章所记载的技术方案对合成的野生型 EGFR/KRAS/BRAF 模板 DNA（参见文章表 1 所例序列清单）进行了测序，测序进行了 19–30 个循环以覆盖所有预设的突变位点及缺失位点。每次延伸反应中，采集 300 个视野的图像，每个视野大约有 2200–2500 个序列（reads），约 0.7–0.8 个 reads/ $\mu \text{ m}^2$ 。测序结果经分析后发现，平均测序深度为 1954 倍。可以理解的是，如果获取更高倍数的视场图像，采用本发明提供的单分子测序（SMTS）方法可以获得更高的测序深度。

具体地，在该单分子测序方法示例中，文章所记载的技术方案采用了人工合成目标 DNA 片段，覆盖 EGFR、KRAS、BRAF 三种基因中的 8 个突变位点，包括 6 个点突变（EGFR 外显子 18 中的 G719A，EGFR 外显子 20 中的 T790M，EGFR 外显子 21 中的 L858R 和 L861Q，KRAS 外显子 2 中的 G12S 和 G13D，BRAF 外显子 15 中的 V600E，和 2 个缺失突变（EGFR 外显子 19 中的 Δ E746–A750 和 Δ E747–A753 缺失突变）；我们为每个突变位点设计了野生型和突变型序列；每个目标模板 DNA 片段的长度设计为 70nt，并在 3' 端修饰有 Cy3 荧光基团；这些合成的目标 DNA 片段可与流路池上固定的捕获引物相互杂交结合。

具体地，文章所记载的技术方案采用了的引物与上述人工合成 DNA 模板互补。特别地，引物采用 BatchPrimer3 软件设计，GC 含量在 20–80% 之间， T_m 值大于 65°C ，长度设计为 60nt，5' 端修饰有 dT10（10 个 T）和氨基，并和人工合成 DNA 模板中突变位点的上游序列互补。具体地，文章设计的引物和目标 DNA 片段均由 Sangon 生物技术公司合成（Shanghai, China）。

具体地，在该单分子测序方法示例中，文章所记载的技术方案采用了的可逆终端子（dNTP–ATTO647N）为修饰有可被检测的荧光标签（ATTO647N，通过 –S–S– 连接子连接）和抑制基团的三磷酸核苷酸。可被检测的荧光标签和抑制基团均为可断裂基团。

具体地，在该单分子测序方法示例中，文章记载的技术方案将合成的引物固定在环氧基修饰的玻璃片（芯片）上，具体包括如下步骤：

- 1) 将引物在 95°C 孵育，将待固定序列的芯片用氮气枪吹净待用；
- 2) 37°C 下，将芯片浸泡在含有引物的固定缓冲液 1nM K₂HPO₄ (150 mM, pH = 8.5) 中 2 小时，引物在固定液中的浓度为 0.8nM；
- 3) 然后依次用 3x SSC +0.1% Triton, 3x SSC, 150 mM K₂HPO₄ pH = 8.5, 清洗芯片；
- 4) 再用 pH = 9.0, 1 M K₂HPO₄ 溶液稍稍没过芯片即可，于室温下在摇床上以 80 转/分钟 (r/min)

摇晃 15 小时；

5) 依次用 PBS, 150mM HEPES+150mM NaCl 清洗芯片, 最后再用双蒸水清洗芯片。

具体地, 在该单分子测序方法示例中, 文章记载的技术方案在 5nM 3×SSC, pH=7.0 下将标记有 Cy3 的人工合成 DNA 模板引至测序芯片腔室 (flow cell) 上, 孵育 55°C 2h 以形成 DNA 双链。染料缓冲液 1 (rinse buffer 1) 洗涤测序芯片, 染料缓冲液 2 (rinse buffer 2) 洗涤测序芯片。

具体地, 测序过程自动化控制, 包括使用和存储于两种温度的 9 种预先准备的试剂的流体系统和成像处理。9 种试剂中的 7 种是化学或生物反应试剂, 存储于 4°C, 包括四种核苷酸 (dNTP-ATTO647N) 和 DNA 聚合酶混合物, 切除试剂 (TCEP, 50mM), 加帽试剂 (50mM 碘乙酰胺) 以及成像缓冲液 (包含 50 mM Trolox, 15 mM DABCO, 50 mM NaI, 20 mM 葡萄糖和 5 mM 葡萄糖氧化酶的 HEPES 缓冲液)。另外的两种是染料缓冲液, rinse buffer 1 (150 mM HEPES, 1× SSC 和 0.1% SDS, pH = 7.0) 和 rinse buffer 2 (包含 150 mM NaCl 的 150 mM HEPES, pH = 7.0), 存储于室温。

具体地, 开始测序时, 将 0.25 μM 可逆终止子 (G, C, T 和 A 其中之一) 和 20 nM Klenow 片段 (Exo-) 聚合酶 (New England Biolabs) 混合物引至 flow cell, 37 °C 孵化 4min, rinse buffer 1 和 2 依次洗涤。

接着, 将成像缓冲液加至 flow cell, 捕获 300 个视野 (fields of view, FOVs)。通常地, 利用 0.1s 的曝光时间获得在每个视野 (54.6 μm × 54.6 μm) 的 4 个图像。成像后, 利用 rinse buffer 洗涤 flow cell。将切除试剂加至 flow cell 反应 5 min, 接着加加帽试剂再反应 5 min, 最后再次用 rinse buffer 洗涤 flow cell。以上实现测序反应的第一个循环 (cycle)。利用不同的可逆终止子实现上述测序循环。在该示例中, 终止子的加入顺序为 G、C、T、A。

具体地, 在该单分子测序方法示例中, 文章所记载的技术方案采用了本发明人团队开发的点定位算法对采集的图像进行处理, 包括对图像的定位和纠偏, 获得待测核酸的序列信息。

具体地, 在该单分子测序方法示例中, 文章所记载的技术方案的分析结果显示: 1) 测序深度为 1 倍时, 平均测序精确度为 95%; 测序深度为 5 倍及以上时, 平均测序精确度为 100%; 2) 四轮测序结果显示: 相对碱基缺失误差, 碱基置换误差率更低, 平均碱基置换误差为 0.52%; 3) 可以检测出突变频率低至 3% 的突变。

值得注意的是, 文章记载的 SMTS 测序读长在 10bp 左右, 但这不限定本发明 SMTS 的测序读长, 可以理解的是, 提高测序循环数可以提高本发明 SMTS 可实现的测序读长。

值得注意的是, 文章记载的 SMTS 测序采用的四种可逆终止子 (A、T、C、G) 采用了同一种荧光标记, 可以理解的是, 可以四种可逆终止子 (A、T、C、G) 可采用互不相同的荧光标记。

值得注意的是, 可本领域技术人员对可逆终止子的添加、荧光标记基团的去除反应体系进行的常规优化; 采用其他常规的生物信息分析方法来分析采集的图像, 以降低错读, 提高测序速度和精度, 应纳入本发明的保护范围。

以上所述仅是本发明的优选实施方式, 应当指出, 对于本技术领域的普通技术人员来说, 在不脱离本发明原理的前提下, 还可以做出若干改进和润饰, 这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

权利要求

- 1、一种单分子测序方法，其特征在于，包括：
 - (i) 将末端带第一光学检测标记的模板核酸与引物结合，以获得第一复合物，所述引物连接在基底表面上；
 - (ii) 对所述第一复合物进行成像，获得第一图像；
 - (iii) 将所述第一复合物、聚合酶以及一种或多种带第二光学检测标记的核苷酸混合，通过聚合酶反应将一种或多种带第二光学检测标记的核苷酸添加至所述第一复合物上，获得延伸产物，其中，所述带第二光学检测标记的核苷酸包括依次连接的第二光学检测标记、可断裂的基团和核苷酸；
 - (iv) 对所述延伸产物进行成像，获得第二图像；
 - (v) 除去所述延伸产物上的可断裂的基团，以获得第二复合物；
 - (vi) 以所述第二复合物替代所述第一复合物，重复以上(ii)至(v)一次或多次，以确定所述模板核酸序列。
- 2、如权利要求1所述的单分子测序方法，其特征在于，所述第一光学检测标记非光可断裂标记。
- 3、如权利要求1所述的单分子测序方法，其特征在于，所述引物为5'端具有10-30bp的polyT的核苷酸序列，其中，至少一部分所述引物与至少一部分所述模板核酸互补。
- 4、如权利要求1或3所述的单分子测序方法，其特征在于，所述引物通过5'端修饰的氨基连接到表面修饰有环氧基的基底。
- 5、如权利要求1所述的单分子测序方法，其特征在于，所述模板核酸末端修饰的光学检测标记为荧光标记。
- 6、如权利要求1所述的单分子测序方法，其特征在于，所述可断裂的基团为光可裂解基团、化学断裂基团和/或酶催化断裂基团。
- 7、如权利要求1所述的单分子测序方法，其特征在于，步骤ii包括：
利用不同光源对所述第一复合物进行成像，获得多个第一图像。
- 8、如权利要求1所述的单分子测序方法，其特征在于，步骤iv包括：
利用不同光源对所述延伸产物进行成像，获得多个第二图像。
- 9、如权利要求1-8任一所述的单分子测序方法，其特征在于，还包括：
获取模板核酸；
对模板核酸进行处理，以获得所述末端带第一光学检测标记的模板核酸。
- 10、如权利要求1-8任一所述的单分子测序方法，其特征在于，所述模板核酸为DNA和/或RNA。
- 11、如权利要求1所述的单分子测序方法，其特征在于，还包括：
基于所述第一图像和所述第二图像，确定所述模板核酸序列。
- 12、如权利要求11所述的单分子测序方法，其特征在于，所述基于第一图像和第二图像，确定模板核酸序列，包括，

比较所述第一图像和/或所述第二图像的差异,对所述第一图像和/或所述第二图像进行第一纠偏和/或第二纠偏,获得纠偏后的第一图像和/或纠偏后的第二图像。

13、如权利要求 12 所述的单分子测序方法,其特征在于,所述第一纠偏基于同一轮反应中的第一图像和第二图像进行,所述第二纠偏基于相邻轮反应中的第一图像之间或者第二图像之间进行,定义(ii)至(v)为一轮反应。

14、一种单分子测序装置,其特征在于,包括:

结合模块,用于将末端带第一光学检测标记的模板核酸与引物结合,以获得第一复合物,所述引物连接在基底表面上;

第一成像模块,用于对来自所述结合模块的第一复合物进行成像,获得第一图像;

合成模块,用于将来自所述结合模块的第一复合物、聚合酶以及一种或多种带第二光学检测标记的核苷酸混合,通过聚合酶反应将一种或多种带第二光学检测标记的核苷酸添加至所述第一复合物上,获得延伸产物,其中,所述带第二光学检测标记的核苷酸是通过包括依次连接的第二光学检测标记、可断裂的基团和连接核苷酸;

第二成像模块,用于对来自所述合成模块的延伸产物进行成像,获得第二图像;

切割模块,用于除去来自所述合成模块的延伸产物上的可断裂的基团,以获得第二复合物;

迭代模块,用于以来自切割模块的第二复合物替代来自所述结合模块的第一复合物,依次进入第二成像模块、合成模块、第二成像模块和切割模块一次或者多次,以确定所述模板核酸序列。

15、如权利要求 14 所述的单分子测序装置,其特征在于,所述第一成像模块用于利用不同光源对所述第一复合物进行成像,获得多个第一图像。

16、如权利要求 14 所述的单分子测序装置,其特征在于,所述第二成像模块用于利用不同光源对所述延伸产物进行成像,获得多个第二图像。

17、如权利要求 14 所述的单分子测序装置,其特征在于,还包括图像处理模块,所述图像处理模块用于基于所述第一图像和所述第二图像,确定所述模板核酸序列。

18、如权利要求 14 所述的单分子测序装置,其特征在于,所述图像处理模块用于比较所述第一图像和/或所述第二图像的差异,对所述第一图像和/或所述第二图像进行第一纠偏和/或第二纠偏,获得纠偏后的第一图像和/或纠偏后的第二图像。

19、如权利要求 18 所述的单分子测序装置,其特征在于,所述第一纠偏基于同一轮反应中的第一图像和第二图像进行,所述第二纠偏基于相邻轮反应中的第一图像之间或者第二图像之间进行,定义(ii)至(v)为一轮反应。

20、一种单分子测序系统,其特征在于,包括如权利要求 14-19 任一所述的单分子测序装置。

21、一种单分子测序试剂盒,其特征在于,包括权利要求 1-8 任一方法中的基底和引物。

22、如权利要求 21 所述单分子测序试剂盒,其特征在于,还包括实现权利要求 1-8 任一方法所需要的试剂。

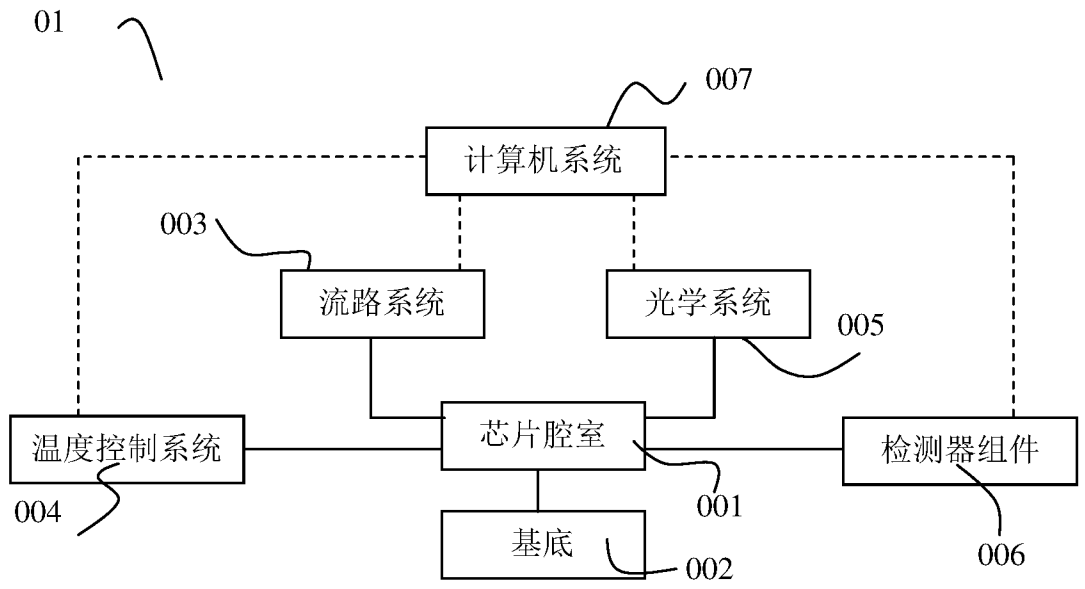


图 1

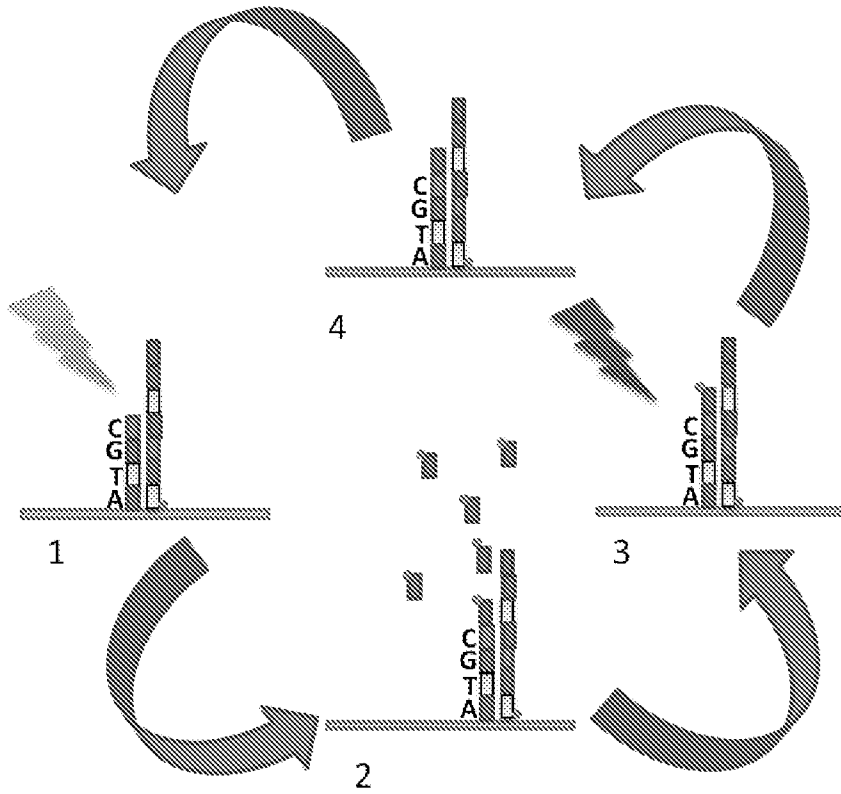
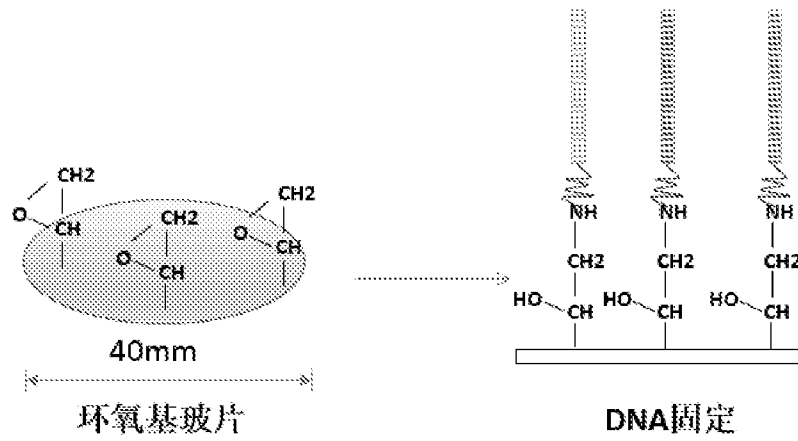
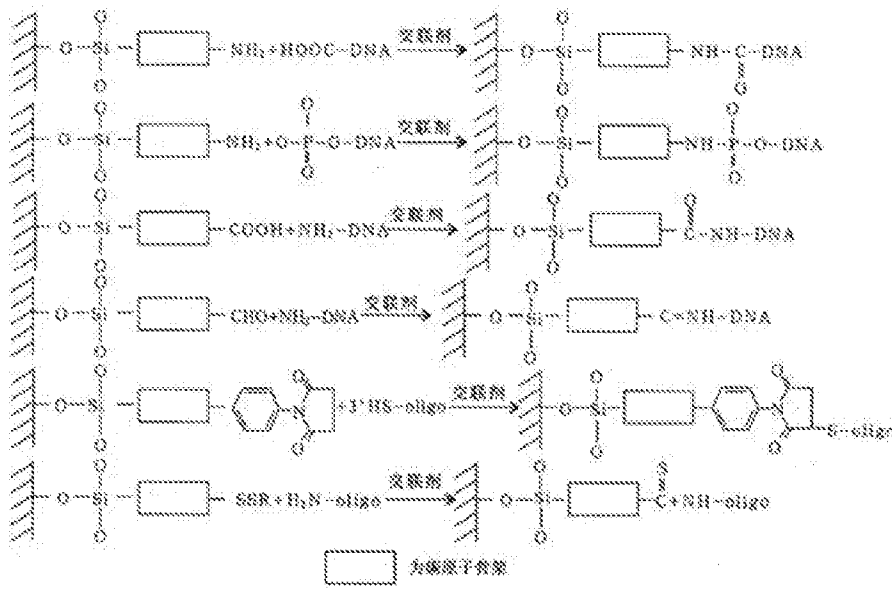


图 2



(a)



(b)

图 3

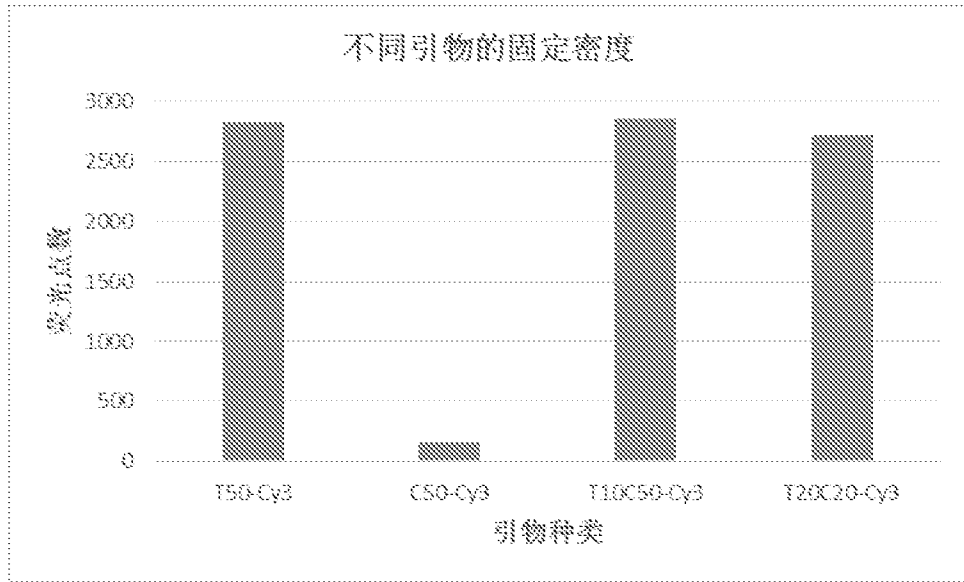
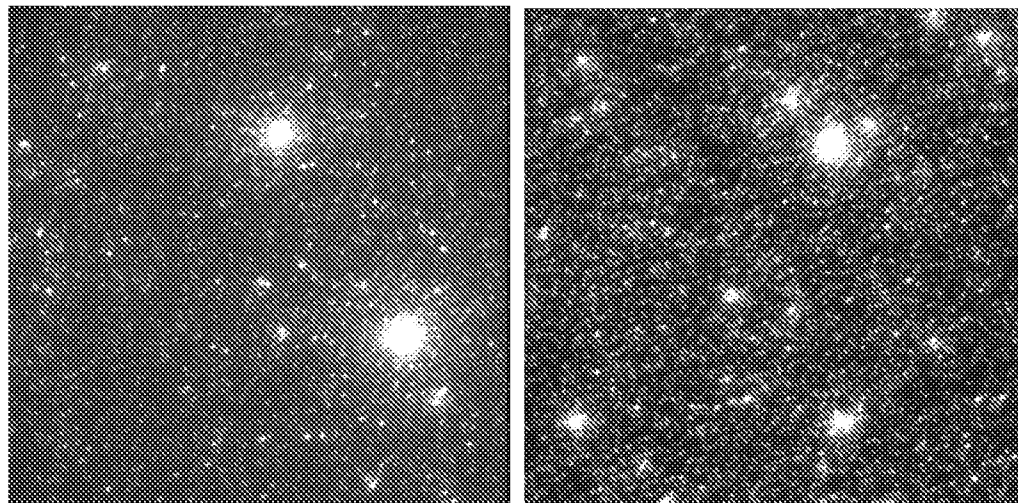
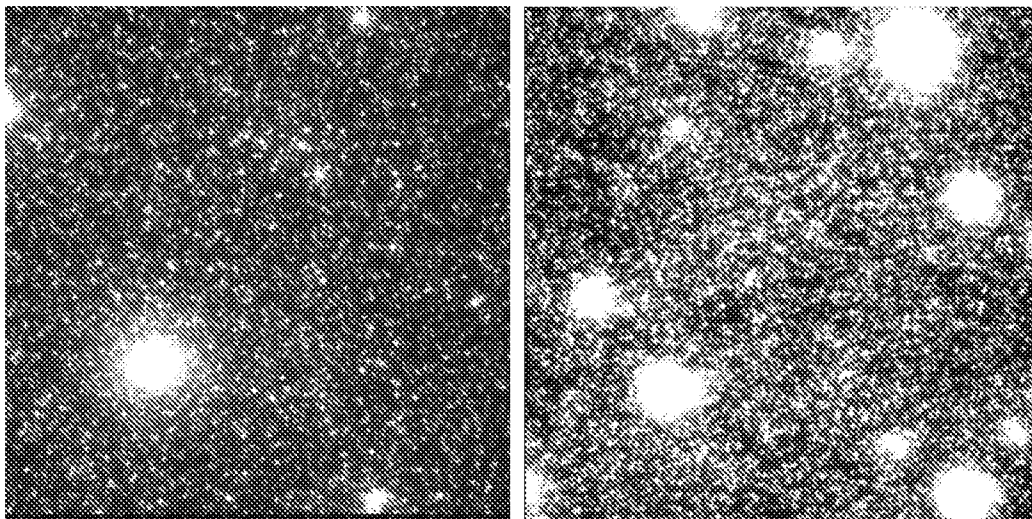


图 4



(a)

(b)



(c)

(d)

图 5

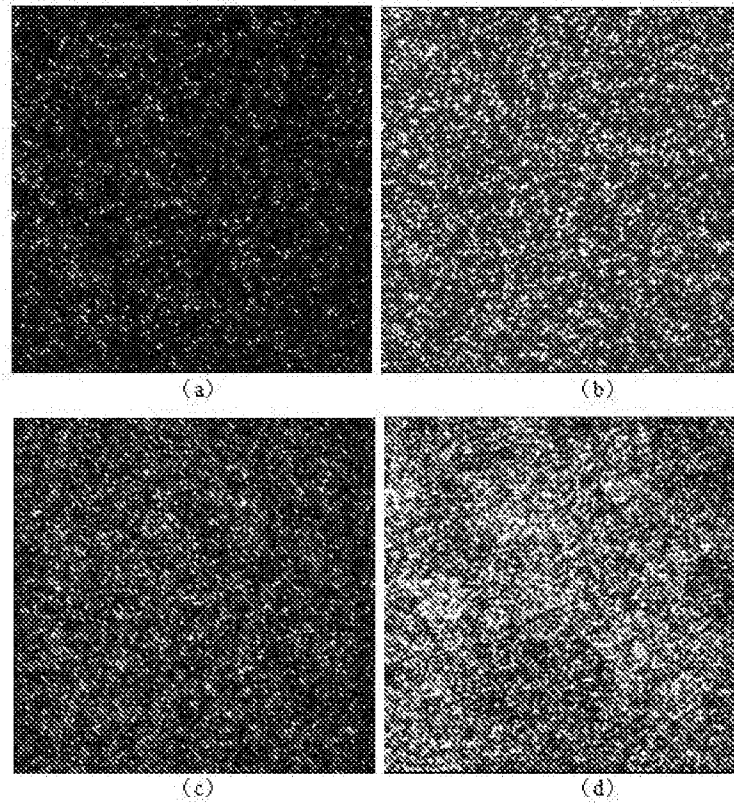


图 6

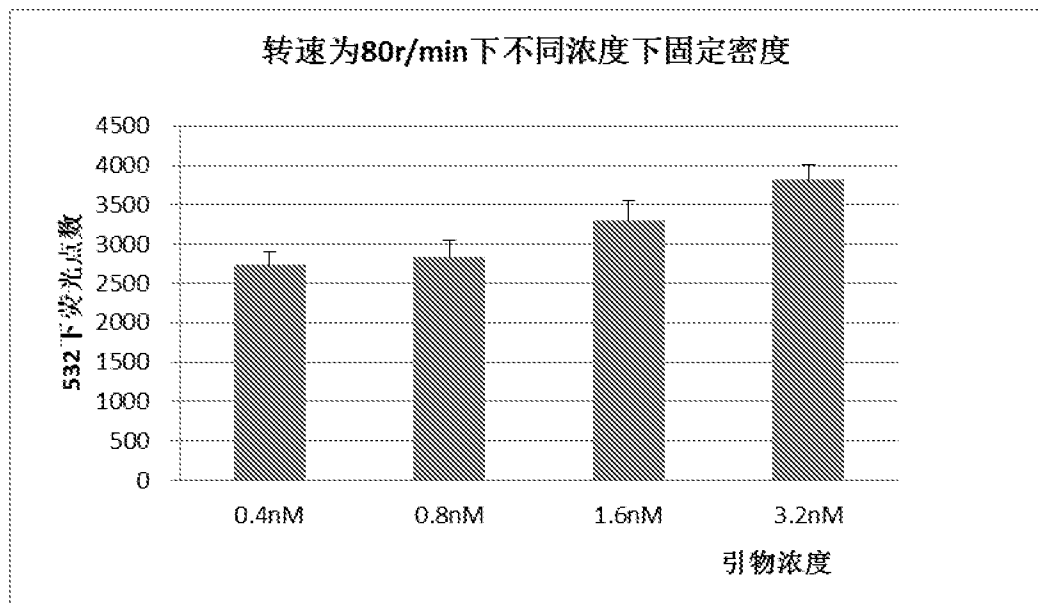


图 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/095053

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/68 (2006.01) i; C12M 1/38 (2006.01) i; C12M 1/36 (2006.01) i; C12M 1/34 (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)

C12Q; C12M

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)

DWPI, SIPOABS, CPRSABS, CPEA, TWABS, CNABS, JPABS, MOABS, HKABS, CNMED, TWMED, KRABS, AUABS, DEABS, RUABS, Wanfang, ISI web of Knowledge: single molecule, single-molecule, sequencing, primer, imag+, +graph+

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 105112516 A (DIRECT GENOMICS BIOTECHNOLOGY COMPANY), 02 December 2015 (02.12.2015), see the whole document	1-22
A	CN 1932033 A (SOUTHEAST UNIVERSITY), 21 March 2007 (21.03.2007), see the whole document	1-22
A	US 2009082212 A1 (PACIFIC BIOSCIENCES), 26 March 2009 (26.03.2009), see the whole document	1-22

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search
11 November 2016 (11.11.2016)

Date of mailing of the international search report
16 November 2016 (16.11.2016)

Name and mailing address of the ISA/CN:
State Intellectual Property Office of the P. R. China
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao
Haidian District, Beijing 100088, China
Facsimile No.: (86-10) 62019451

Authorized officer
XING, Ying
Telephone No.: (86-10) **62411044**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2016/095053

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 105112516 A	02 December 2015	None	
CN 1932033 A	21 March 2007	None	
US 2009082212 A1	26 March 2009	US 2008241833 A1	02 October 2008
		DE 69930310 T3	17 December 2009
		US 8980584 B2	17 March 2015
		JP 4638043 B2	23 February 2011
		WO 0036151 A1	22 June 2000
		DE 69930310 T2	28 December 2006
		US 2003194740 A1	16 October 2003
		CA 2355816 A1	22 June 2000
		WO 0036152 A1	22 June 2000
		EP 1141409 B2	27 May 2009
		US 2015218632 A1	06 August 2015
		EP 1141409 B1	08 March 2006
		US 8530154 B2	10 September 2013
		US 6306607 B2	23 October 2001
		US 6232075 B1	15 May 2001
		AT 319857 T	15 March 2006
		DE 69930310 D1	04 May 2006
		US 2009170074 A1	02 July 2009
		US 8192961 B2	05 June 2012
		JP 2010142250 A	01 July 2010
		US 6255083 B1	03 July 2001
		EP 1141409 A4	26 February 2003
		US 2002115076 A1	22 August 2002
		US 2010093068 A1	15 April 2010
		AU 772281 B2	22 April 2004
		US 7229799 B2	12 June 2007
		US 2001018184 A1	30 August 2001
		AU 2180200 A	03 July 2000
		WO 0036151 A9	02 August 2001
		JP 2002532104 A	02 October 2002
		AU 2360200 A	03 July 2000
		CA 2355816 C	30 October 2007
		US 6762048 B2	13 July 2004
		EP 1141409 A1	10 October 2001

<p>A. 主题的分类</p> <p>C12Q 1/68(2006.01)i; C12M 1/38(2006.01)i; C12M 1/36(2006.01)i; C12M 1/34(2006.01)i</p> <p>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</p>														
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C12Q; C12M</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>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))</p> <p>DWPI, SIPOABS, CPRSABS, CPEA, TWABS, CNABS, JPABS, MOABS, HKABS, CNMED, TWMED, KRABS, AUABS, DEABS, RUABS, 万方, ISI web of Knowledge: 单分子, 测序, 引物, 成像, 图像, single molecule, single-molecule, sequencing, primer, imag+, +graph+</p>														
<p>C. 相关文件</p> <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>PX</td> <td>CN 105112516 A (深圳市瀚海基因生物科技有限公司) 2015年 12月 2日 (2015 - 12 - 02) 参见全文</td> <td>1-22</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 1932033 A (东南大学) 2007年 3月 21日 (2007 - 03 - 21) 参见全文</td> <td>1-22</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2009082212 A1 (PACIFIC BIOSCIENCES) 2009年 3月 26日 (2009 - 03 - 26) 参见全文</td> <td>1-22</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	PX	CN 105112516 A (深圳市瀚海基因生物科技有限公司) 2015年 12月 2日 (2015 - 12 - 02) 参见全文	1-22	A	CN 1932033 A (东南大学) 2007年 3月 21日 (2007 - 03 - 21) 参见全文	1-22	A	US 2009082212 A1 (PACIFIC BIOSCIENCES) 2009年 3月 26日 (2009 - 03 - 26) 参见全文	1-22
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求												
PX	CN 105112516 A (深圳市瀚海基因生物科技有限公司) 2015年 12月 2日 (2015 - 12 - 02) 参见全文	1-22												
A	CN 1932033 A (东南大学) 2007年 3月 21日 (2007 - 03 - 21) 参见全文	1-22												
A	US 2009082212 A1 (PACIFIC BIOSCIENCES) 2009年 3月 26日 (2009 - 03 - 26) 参见全文	1-22												
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>														
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“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)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” 同族专利的文件</p>														
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2016年 11月 11日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2016年 11月 16日</p>												
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>受权官员</p> <p>幸颖</p> <p>电话号码 (86-10)62411044</p>												

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/095053

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	105112516	A	2015年 12月 2日	无	
CN	1932033	A	2007年 3月 21日	无	
US	2009082212	A1	2009年 3月 26日	US	2008241833 A1 2008年 10月 2日
				DE	69930310 T3 2009年 12月 17日
				US	8980584 B2 2015年 3月 17日
				JP	4638043 B2 2011年 2月 23日
				WO	0036151 A1 2000年 6月 22日
				DE	69930310 T2 2006年 12月 28日
				US	2003194740 A1 2003年 10月 16日
				CA	2355816 A1 2000年 6月 22日
				WO	0036152 A1 2000年 6月 22日
				EP	1141409 B2 2009年 5月 27日
				US	2015218632 A1 2015年 8月 6日
				EP	1141409 B1 2006年 3月 8日
				US	8530154 B2 2013年 9月 10日
				US	6306607 B2 2001年 10月 23日
				US	6232075 B1 2001年 5月 15日
				AT	319857 T 2006年 3月 15日
				DE	69930310 D1 2006年 5月 4日
				US	2009170074 A1 2009年 7月 2日
				US	8192961 B2 2012年 6月 5日
				JP	2010142250 A 2010年 7月 1日
				US	6255083 B1 2001年 7月 3日
				EP	1141409 A4 2003年 2月 26日
				US	2002115076 A1 2002年 8月 22日
				US	2010093068 A1 2010年 4月 15日
				AU	772281 B2 2004年 4月 22日
				US	7229799 B2 2007年 6月 12日
				US	2001018184 A1 2001年 8月 30日
				AU	2180200 A 2000年 7月 3日
				WO	0036151 A9 2001年 8月 2日
				JP	2002532104 A 2002年 10月 2日
				AU	2360200 A 2000年 7月 3日
				CA	2355816 C 2007年 10月 30日
				US	6762048 B2 2004年 7月 13日
				EP	1141409 A1 2001年 10月 10日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)