

(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12月21日 (21.12.2017)



(10) 国际公布号
WO 2017/215500 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2017/087414
- (22) 国际申请日: 2017年6月7日 (07.06.2017)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201610420179.5 2016年6月13日 (13.06.2016) CN
- (72) 发明人: 及
- (71) 申请人: 陆欣华 (LU, Xinhua) [CN/CN]; 中国上海市上海市杨浦区政悦路500弄56号101室陆欣华, Shanghai 200438 (CN)。
- (74) 代理人: 南京苏科专利代理有限责任公司 (NANJING SUKE PATENT AGENT LIMITED

LIABILITY COMPANY); 中国江苏省南京市鼓楼区广州路37号江苏科技大厦25层知识产权部蒋慧妮, Jiangsu 210008 (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, 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,

(54) Title: NUCLEIC ACID ISOTHERMAL SELF-AMPLIFICATION METHOD

(54) 发明名称: 一种核酸等温自扩增方法

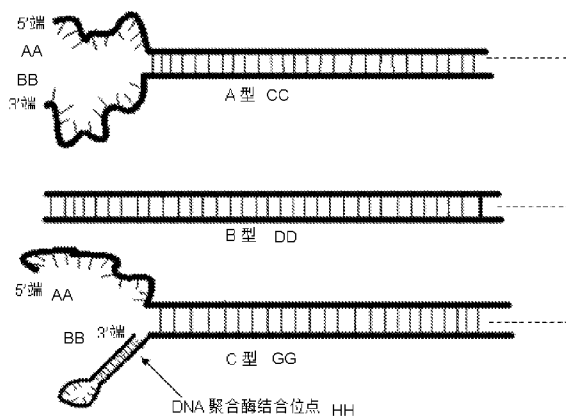


图 1

AA 5' TERMINAL
BB 3' TERMINAL
CC TYPE A
DD TYPE B
EE 5' TERMINAL
FF 3' TERMINAL
GG TYPE C
HH DNA POLYMERASE BINDING SITE

(57) Abstract: Provided is a nucleic acid isothermal self-amplification method comprising, adding suitable palindrome complementary sequences at both ends of a target template to form a stem-loop structure spontaneously, and providing reagents and conditions as needed to perform self-amplification. The method does not require addition of additional amplification primers. The reagents comprise a DNA polymerase having a strand displacement activity. The method does not rely on exogenous amplification primers for amplification, has a constant amplification temperature without a complex temperature control equipment, and achieves rapid amplification. The amplification product is a long single-stranded DNA of a continuous complementary sequence and can be applied to special occasions. In addition, the amplification has no GC bias.



WO 2017/215500 A1

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)。

根据细则4.17的声明:

- 关于发明人身份(细则4.17(i))
- 关于申请人有权申请并被授予专利(细则4.17(ii))
- 关于申请人有权要求在先申请的优先权(细则4.17(iii))

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

(57) 摘要: 提供一种核酸等温自扩增方法, 所述方法通过在目标模板两端添加合适的回文互补序列, 自身自发形成茎环结构; 及提供反应所需的试剂和条件进行自扩增, 该方法不需要添加额外扩增引物; 所述试剂包括具有链置换活性的DNA聚合酶。该方法不依赖于外源扩增引物进行扩增; 扩增温度恒定, 不需要复杂的温控设备, 扩增快速; 扩增产物是连续互补序列的长单链DNA, 可以应用于特殊场合; 扩增没有GC偏好性。

一种核酸等温自扩增方法

技术领域

本发明涉及一种核酸等温自扩增方法，属于核酸扩增技术领域。

背景技术

近几十年来，核酸扩增技术为分子生物研究和病原微生物检测做出了革命性的贡献。

等温扩增技术(Isothermal Amplification Technology)是核酸体外扩增技术，其反应过程始终维持在恒定的温度下，通过添加不同活性的酶和各自特异性引物来达到快速核酸扩增的目的。常见的等温扩增技术有以下几种：环介导核酸等温扩增技术(LAMP)；滚环扩增技术 RCA；单引物等温扩增 SPIA；依赖解旋酶的等温扩增技术 HAD；链替代扩增 SDA，等等；但现有的方法由于具有链置换活性的 DNA 聚合酶在引物存在的情况下，普遍容易产生非特异性扩增。

等温扩增技术，不仅仅在第二代核酸测序技术中广泛使用，在第三代核酸测序技术中也扮演了非常重要的角色，比如在美国 Pacific Biosciences 公司的测序技术中就运用了滚环扩增技术 RCA (专利号：US9404146)，运用这个技术对同一片段反复测序，然后通过软件校准，极大的提高了测序数据的准确性。同样，英国 Oxford Nanopore 公司的测序技术中，如果使用类似技术，也可以极大的提高测序数据的准确性 (INC-Seq: Accurate single molecule reads using nanopore sequencing, Li et al. GigaScience (2016) 5:34)。但由于英国 Oxford Nanopore 公司的测序原理比较特殊，采用了滚环扩增技术 RCA，不仅仅步骤繁杂，而且扩增不够均匀，影响测序结果。

发明内容

本发明的目的在于解决上述问题，提出一种核酸等温自扩增的方法。

本发明的目的通过以下技术方案来实现：

一种核酸等温自扩增方法，包括如下步骤，

- a、在目标模板两端添加所需序列的 DNA 接头；
- c、提供反应所需的试剂和条件；

所述所需序列的 DNA 接头为具有自发形成自身茎环结构的线性核酸片段，所述自扩增方法中不需要添加额外扩增引物；

所述试剂包括具有链置换活性的 DNA 聚合酶或其他具有链置换活性的聚合酶。

优选地，所述 DNA 聚合酶为 Bst 酶，或者其他 DNA 聚合酶。

优选地，所述目标模板两端添加的 DNA 接头为具有回文互补序列的线性核酸片段，能够自发形成自身茎环结构，从而触发 DNA 聚合酶进行延伸扩增。

优选地，所述 DNA 接头的序列可以是但不限于，应用例中碱基 AT 组合的重复序列，或者是 AATT 组合的重复序列，或 GC 组合的重复序列。所述 DNA 接头为可以进行碱基修饰的接头。所述修饰可以为硫代修饰等等。

优选地，所述扩增方法的产物为折叠互补单链 DNA，具有串联的重复序列。

一种核酸等温自扩增方法的应用，所述方法可用于二代测序文库的建立，所述文库建立方法通过将基因组 DNA 长链打断成小片段，在片段两端连接上含有适合序列的接头，进行循环扩增；或者通过转座子，crispr/cas9 系统等选择性的插入接头片段，进行选择性的扩增，扩增产物是串联的重复序列，以这种方法制备的测序文库，使用某些测序机器，比如纳米孔测序仪器，可以增加对目的序列的测序次数，

从而提高测序精度。

本发明的有益效果主要体现在：

- 1、在等温情况下，可以对目的片段快速有效扩增；
- 2、在 DNA 末端引入合适的回文互补序列后，可以不依赖于引物进行扩增；
- 3、扩增产物是连续互补序列的长单链 DNA，可以应用于特殊场合。
- 4、扩增没有 GC 偏好性。

附图说明

下面结合附图对本发明技术方案作进一步说明：

图 1：DNA 双链末端的呼吸机制和构象转换过程示意图。

图 2：DNA 双链末端（3' 端和 5' 端）均有适合自扩增序列的情况下，自扩增的过程示意图。

图 3：在目的基因末端添加合适序列的过程示意图。

图 4：采用非特异性扩增法在目的基因末端添加合适序列的过程示意图。

图 5：二代测序文库构建过程中的序列结构变化示意图。

具体实施方式

本发明揭示了一种核酸等温自扩增方法，所述扩增方法的产物为折叠互补单链 DNA。

包括如下步骤，

一种核酸等温自扩增方法，包括如下步骤，

- a、在目标模板两端添加所需序列的 DNA 接头；
- c、提供反应所需的试剂和条件；

所述所需序列的 DNA 接头为具有自发形成自身茎环结构的线性

核酸片段，所述自扩增方法中不需要添加额外扩增引物；

具体的，所述目标模板两端添加的 DNA 接头为具有回文互补序列的线性核酸片段，能够自发形成自身茎环结构，从而触发 DNA 聚合酶进行延伸扩增。

所述目标模板通过 PCR，连接酶，体外转座子系统等，在 DNA 线性末端添加合适的回文互补序列，从而能够形成自身茎环结构。

本发明中所述自扩增方法中不需要添加额外扩增引物；所述扩增方法的产物为折叠互补单链 DNA。

所述试剂包括具有链置换活性的 DNA 聚合酶，或者其他 DNA 聚合酶。

所述 DNA 聚合酶为以 Bst 酶。Bst 酶对扩增没有 GC 偏好，使得扩增产物具有更好的均一性。

一种核酸等温自扩增方法的应用，所述方法可用于二代测序文库的建立，包括如下步骤，将 DNA 片段化后，通过连接酶反应，在 DNA 两端添加适合自扩增的序列；或者通过转座子，crispr/cas9 系统等选择性的插入片段，最终在 DNA 片段末端连接有适合自扩增的序列，进行等温自扩增。

以下具体阐述下本发明的自扩增原理：

根据 DNA 呼吸机制，双链 DNA 末端处在解链成游离单链和配对互补成双链的动态平衡中，温度升高，呼吸作用加剧，末端双链解开越显著。此时外源的匹配引物可以直接入侵和 DNA 其中的一条链结合，在具有链置换活性的 DNA 聚合酶作用下，延伸扩增(Isothermal amplification method for next-generation sequencing 14320–14323 | PNAS | August 27, 2013 | vol. 110 | no. 35)

本发明首先通过 PCR 或者接头连接，DNA 定向重组等技术，在目的基因片段末端引入特殊的 DNA 序列。这段序列是一段回文序列，

可以自身配对，形成茎环结构，从而利用 DNA 呼吸现象，不需要再添加外源引物，3' 端在具有链置换活性的 DNA 聚合酶作用下，可以直接以自身为模版进行延伸扩增，第一轮扩增完成后，新的 3' 端和原 5' 端序列互补，同样可以形成回文序列，自身互补配对，进行新一轮延伸扩增，新的 3' 端仍然和原 5' 端序列互补，循环扩增。DNA 双链的每条单链同时进行类似反应，最后产物是两条多重复的互补 DNA 单链。

DNA 双链中的互补碱基是通过氢键连接的，由于 A（腺嘌呤）与 T（胸腺嘧啶）中有两个氢键，G（鸟嘌呤）与 C（胞嘧啶）中有三个氢键，所以 GC 配对比 AT 更不易打开。在 DNA 呼吸现象中，要形成 3' 端的发夹结构构象，和 DNA 完全互补的构象相比，不仅末端配对碱基更少，还有环状部分由于空间结构的原因不能配对结合。所以为了增加 3' 端成功形成发夹结构的概率，可以在末端序列中增加 AT 含量，使游离出来的单链长度增加，同时采用短重复序列，比如，TA 重复或者 TAA, TTAA 等重复序列，使配对结合更容易发生。

等温自扩增过程中，一旦在目的片段末端引入合适的序列，即使移除引物后，仍然可以进行自我扩增，而且在扩增的过程中，扩增产物是连续互补的序列，由于空间上的近距离效应，可以迅速配对形成双链结构，几乎没有裸露的单链 DNA 暴露在外，基本消除非特异性扩增。在高通量测序中，比如单细胞测序，利用等温自扩增，和 PCR 方法相比，不仅可以消除 GC 偏好，而且可以有更好的均一性。

等温自扩增的终产物是连续互补序列的单链 DNA，一方面可以通过酶切等手段，转换成短片段，另外一方面这种长重复片段，可以应用在特殊场合，比如测序等。如图 5 所示，二代测序文库构建。基因组 DNA 是长序列的，通过机械剪切（比如添加磁珠震荡），或者酶切等技术，打断成小片段，约几百 bp 长度，然后连接酶作用，在

末端添加接头序列，其中包含适合自扩增的序列，然后等温自扩增。扩增过程没有使用扩增引物，也没有双链完全打开的步骤，所以和 PCR 方法相比，产物具有更好的均一性和没有 GC 偏好性。

以下结合附图具体阐述本发明通过不同的方法产生茎环结构以适用自扩增反应。

如图 1 所示，DNA 双链末端的呼吸机制和构象转换。线性完全互补的 DNA 双链 (B 型)，生理条件下，末端双链打开成游离状态 (A 型)，两种状态互相转换动态平衡。在高温或其他条件下，呼吸强烈，当末端序列自身互补的时候，会产生茎环结构 (C 型)，出现 DNA 聚合酶的结合位点，触发扩增反应

如图 2 所示，DNA 双链末端 (3' 和 5' 端) 均有适合自扩增序列的情况下，自扩增的过程。第一步，双链线性 DNA；第二步，3' 端呈现发夹结构，具有链置换活性的 DNA 聚合酶结合，发生链置换反应；第三步，完成对自身的扩增，反义链被置换下来 (反义链也同步反应)，拷贝数增加一倍，新产生的 3' 端都是以 5' 端为模版，仍然可以呈现发夹结构；第四步，循环扩增 N 轮。第五步，循环扩增后产物是一条长单链 DNA，拷贝数为 2 的 N 次方。

如图 3 所示，采用 PCR 方法在目的基因末端添加合适序列的方法。第一步，引物 A 的 3' 端为目的基因互补序列，5' 端为添加序列，高温解链后引物结合，PCR 扩增形成反义链；第二步，引物 B 的 3' 端为目的基因互补序列，5' 端为添加序列，高温解链后引物结合，PCR 扩增；第三步，高温解链后扩增产物自身成环，成为可以进行等温自扩增的起始物。

如图 4 所示，采用非特异性扩增法进行在目的基因末端添加合适序列的方法。第一步，高温解链后引物 A 结合；第二步，DNA 聚合酶扩增形成反义链；第三步，有些具有链置换活性的 DNA 聚合酶，

比如 Bst 酶，在引物序列和模版不完全匹配的情况下，仍然可以结合并进行扩增，通常这是对反应不利的一面，利用这一特性，如果 DNA 足够长，3' 端弯曲后能够在自身上非特异性结合进行扩增，从而得到 5' 端的互补序列；第四步：成为可以进行等温自扩增的起始物。

扩增效率检测：

为了排除过量引物，模版核酸等干扰，更好的验证 DNA 等温自扩增效率，人工合成一段末端具有等温自扩增序列的单链 DNA，命名 Hind 标准品 1，序列为 SEQ ID NO.1（以下所有 DNA 均从生工生物工程（上海）股份有限公司合成）。

TATATATATATATATATATATATATATATAAGCTTGCAGGGTCCGAG
GTAACAGAGCCAACCTATTTACGTGCTGCAAGCTTGCAGCACGT
AAATAGG

同时人工合成了一段末端不具备等温自扩增序列的单链 DNA（去掉了末端互补序列）命名 Hind 标准品 2。

序列为：SEQ ID NO.2

GCAGGGTCCGAGGTAACAGAGCCAACCTATTTACGTGCTGCAA
GCTTCACGTAAATAGG

恒温扩增反应体系 25 μ l，其中 dNTP 0.2 mM each、Bst DNA Polymerase Buffer 1 \times 、4mM MgSO₄、warm strat Bst DNA Polymerase 8 U (购自 NEB 公司), Hind 标准品约 100pM，60 $^{\circ}$ C 反应 1 小时。

反应产物用限制性内切酶 Hind III(购自 NEB 公司)酶切后，qPCR 检测。

qPCR 前引物序列：CGCGCGTAGCAGCACGTAAATA

qPCR 后引物序列：GTGCAGGGTCCGAGGT

qPCR 反应体系 20 μ l，含引物终浓度 200nM，Fast sybgreen Mix 1 \times ，酶切产物 3 μ l。反应程序，95 $^{\circ}$ C、30 秒，然后 45 个循环 60 $^{\circ}$ C、20

秒，95℃、5秒。

检测数据如表 1 所示：

表 1

	Ct 值			delt Ct 值
	直接 qPCR	等温扩增酶切后 qPCR		
Hind 标准品 1	21	12		-9
Hind 标准品 2	20	23		3

结果显示：Hind 标准品 1 扩增了约 1000 倍，Hind 标准品 2 几乎没有扩增，说明具有特定结构的核酸片段能够进行恒温自扩增。

扩增效率和起始浓度关系检测：

同样为了排除过量引物，模版核酸等的干扰，更好的验证 DNA 等温自扩增，选择人工合成片段 Hind 标准品 1，采用不同的起始浓度。

等温扩增和 qPCR 实验步骤同实施例 1 中描述，60℃下反应 2 小时。

数据如表 2 所示：

表 2

	Ct 值			delt Ct 值
	Hind 标准品 1 起始浓度	直接 qPCR	等温扩增酶切后 qPCR	

表 2

1	500pM	19	7	-12
2	50pM	23	9	-14
3	5pM	26	12	-14
4	500fM	29	16	-13
5	50fM	31	19	-12
6	5fM	31	24	-7
7	0.5fM	31	27	-4
8	0.05fM	31	30	-1
9	0.005fM	31	31	0
10	0	31	31	0

结果显示：即使在溶液中核酸片段接近单拷贝的时候，仍然能够进行扩增，效率约 1000 倍，进一步说明，等温自扩增是自发进行的，不需要添加扩增引物。

扩增效率和末端序列关系：

同样为了排除过量引物，模版核酸等的干扰，更好的验证 DNA 等温自扩增，选择人工合成片段，采用不同长度的末端序列：

Hind 标准品 1：

TATATATATATATATATATATATATATATATAAGCTTGCAGGGTCCGAG
GTAACAGAGCCAACCTATTTACGTGCTGCAAGCTTGCAGCACGT

AAATAGG

Hind 标准品 21:

TATATATATATATATATATAAGCTTGCAGGGTCCGAGGTAACA
GAGCCAACCTATTTACGTGCTGCAAGCTTGCAGCACGTAAATAG
G

Hind 标准品 15:

TATATATATATATAAGCTTGCAGGGTCCGAGGTAACAGAGCC
AACCTATTTACGTGCTGCAAGCTTGCAGCACGTAAATAGG

Hind 标准品 9:

TATATATAAGCTTGCAGGGTCCGAGGTAACAGAGCCAACCT
ATTTACGTGCTGCAAGCTTGCAGCACGTAAATAGG

Hind 标准品 0:

AAGCTTGCAGGGTCCGAGGTAACAGAGCCAACCTATTTACGTG
CTGCAAGCTTGCAGCACGTAAATAGG

等温扩增和 qPCR 实验步骤同实施例 1 中描述，60°C 反应 2 小时。

数据如表 3 所示，

表 3:

		Ct 值		delt Ct 值
		直接 qPCR	等温扩增酶切后 qPCR	
1	Hind 标准品 1	27	13	-14
2	Hind 标准品 21	27	15	-12
3	Hind 标准品 15	29	15	-14
4	Hind 标准品 9	29	22	-7

5	Hind 标准品 0	27	24	-3
---	------------	----	----	----

结果显示：末端 TA 重复序列长度分别为 30，21，15 的时候，扩增效率约 1000 倍，长度为 9 的时候，扩增效率约 100 倍，长度为 0 的时候，几乎没有扩增。说明等温自扩增是末端 TA 重复序列依赖性的。

扩增倍数和时间关系

为了排除过量引物，模版核酸等干扰，更好的验证 DNA 等温自扩增效率，人工合成一段末端具有等温自扩增序列的单链 DNA，Hind 标准品 1。

等温扩增和 qPCR 实验步骤同实施例 1 中描述，60°C 反应不同时间。

数据如表 4 所示，

表 4:

	时间（分钟）	Ct 值（等温扩增酶切后 qPCR）
1	0	28
2	1	26
3	5	23
4	20	20
5	60	17

结果显示：等温自扩增时间越长，扩增倍数越高，起始阶段，扩增效率略高。

本发明尚有多种具体的实施方式，凡采用等同替换或者等效变换而形成的所有技术方案，均落在本发明要求保护的范围之内。

权 利 要 求 书

1. 一种核酸等温自扩增方法，其特征在于：包括如下步骤，
 - a、在目标模板两端添加所需序列的 DNA 接头；
 - c、提供反应所需的试剂和条件；

所述所需序列的 DNA 接头为具有自发形成自身茎环结构的线性核酸片段，所述自扩增方法中不需要添加额外扩增引物；

所述试剂包括具有链置换活性的 DNA 聚合酶或其他具有链置换活性的聚合酶。

2. 根据权利要求 1 所述的一种核酸等温自扩增方法，其特征在于：所述 DNA 聚合酶为 Bst 酶，或者其他 DNA 聚合酶。

3. 根据权利要求 1 所述的一种核酸等温自扩增方法，其特征在于：所述目标模板两端添加的 DNA 接头为具有回文互补序列的线性核酸片段，能够自发形成自身茎环结构，从而触发 DNA 聚合酶进行延伸扩增。

4. 根据权利要求 3 所述的一种核酸等温自扩增方法，其特征在于：所述 DNA 接头的序列可以是但不限于，应用例中碱基 AT 组合的重复序列，或者是 AATT 组合的重复序列，或 GC 组合的重复序列，所述 DNA 接头为可以进行碱基修饰的接头。

5. 根据权利要求 1 所述的一种核酸等温自扩增方法，其特征在于：所述扩增方法的产物为折叠互补单链 DNA，具有串联的重复序列。

6. 一种核酸等温自扩增方法的应用，其特征在于：所述方法可用于二代测序文库的建立，所述文库建立方法通过将基因组 DNA 长链打断成小片段，在片段两端连接上含有适合序列的接头，进行循环扩增；或者通过转座子，crispr/cas9 系统等选择性的插入接头片段，进行选择性的扩增，所述扩增产物是串联的重复序列。

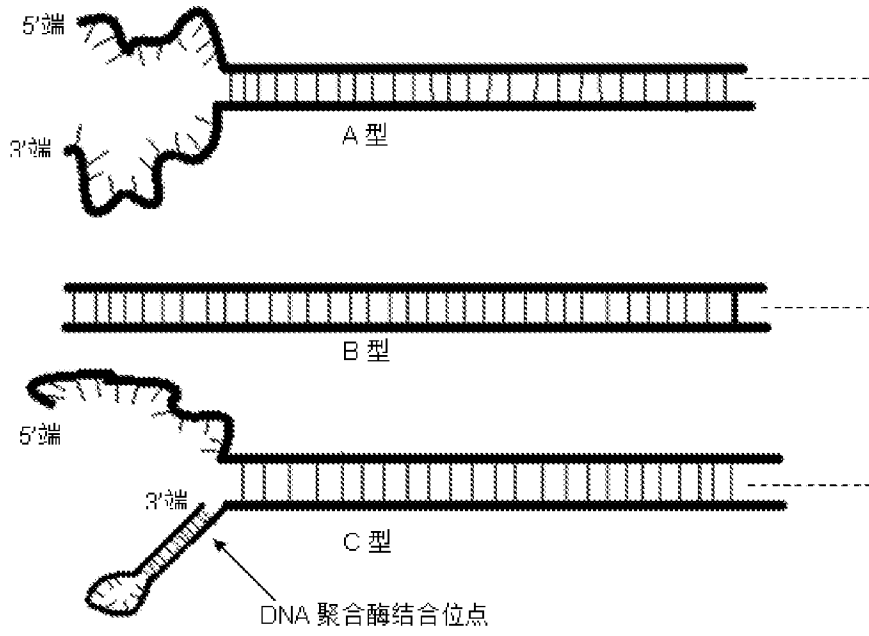


图 1

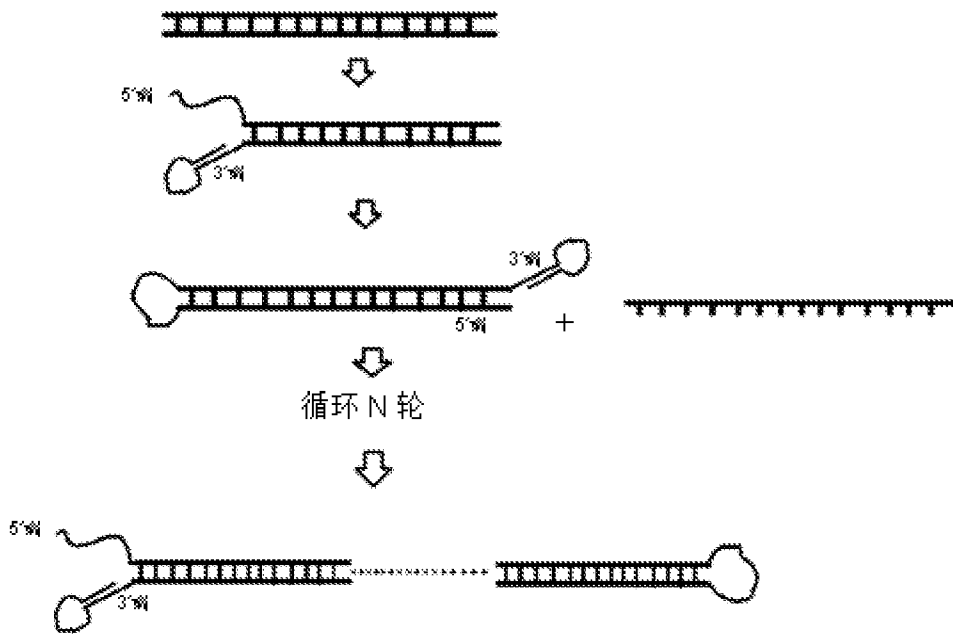


图 2

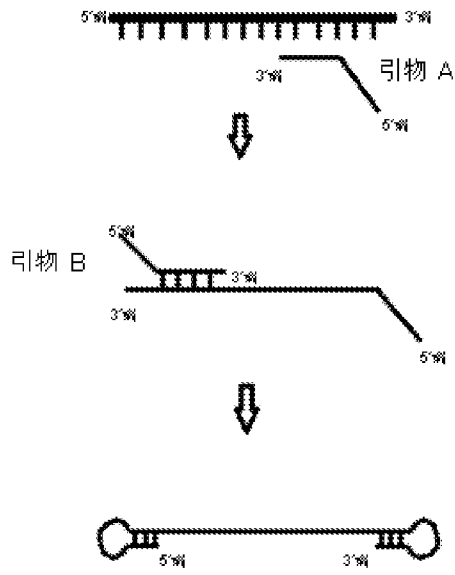


图 3

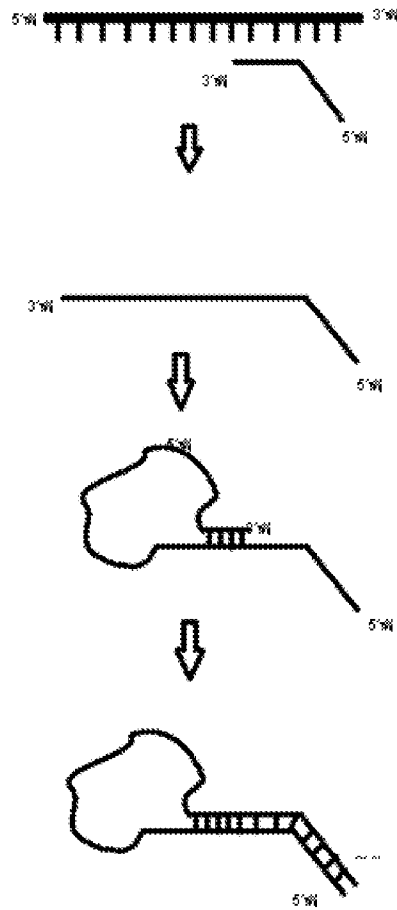


图 4

基因组 DNA

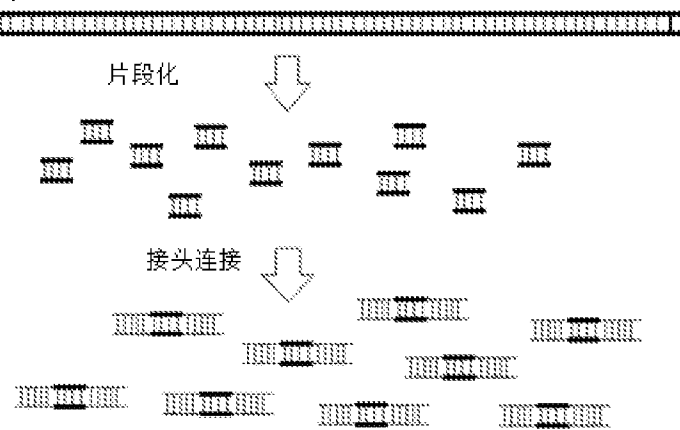


图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/087414

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/68 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

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, VEN, CNKI, WANFANG DATABASE, ISI Web of Knowledge, Google, PubMed: LU, Xinhua; nucleic acid isothermal self-amplification, alindrome, stem-loop, connector, DNA polymerase, isothermal, amplification, self-amplification, adaptor, stem, loop, hairpin, strand displacement, Lu X

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 102084001 A (PACIFIC BIOSCIENCES OF CALIFORNIA, INC.), 01 June 2011 (01.06.2011), the whole document	1-6
A	WO 2016022557 A1 (TWIST BIOSCIENCE CORPORATION), 11 February 2016 (11.02.2016), the whole document	1-6
A	WO 2016028887 A1 (PACIFIC BIOSCIENCES CALIFORNIA, INC.), 25 February 2016 (25.02.2016), the whole document	1-6
A	CN 105442054 A (HANGZHOU GUKUN BIOTECHNOLOGY CO., LTD.), 30 March 2016 (30.03.2016), the whole document	1-6
A	CN 101415838 A (CIRCLEAMP INC.), 22 April 2009 (22.04.2009), the whole document	1-6
A	WO 2013096802 A1 (IBIS BIOSCIENCES, INC.), 27 June 2013 (27.06.2013), the whole document	1-6

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

14 August 2017 (14.08.2017)

Date of mailing of the international search report

01 September 2017 (01.09.2017)

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

WU, Xuemei

Telephone No.: (86-10) **62414290**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/087414

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TRAVERS, K.J. et al., "A Flexible and Efficient Template Format for Circular Consensus Sequencing and SNP Detection", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol.38, no. 15, 22 June 2010 (22.06.2010), e159	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2017/087414

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 102084001 A	01 June 2011	US 2016376647 A1	29 December 2016
		US 2016237485 A1	18 August 2016
		EP 2274449 A4	18 April 2012
		US 8455193 B2	04 June 2013
		BR PI0909212 A2	18 August 2015
		US 9542527 B2	10 January 2017
		US 8309330 B2	13 November 2012
		WO 2009120372 A2	01 October 2009
		CN 104862383 A	26 August 2015
		AU 2009229157 A1	01 October 2009
		US 2016348167 A1	01 December 2016
		EP 2274449 B1	23 December 2015
		WO 2009120372 A3	07 January 2010
		JP 2011515102	19 May 2011
		CA 2719747 A1	01 October 2009
		US 2015159196 A1	11 June 2015
		US 9404146 B2	02 August 2016
		EP 3045542 A1	20 July 2016
		US 2011281768 A1	17 November 2011
		CN 102084001	18 March 2015
		AU 2009229157 B2	29 January 2015
		US 2016321397 A1	03 November 2016
		US 8153375 B2	10 April 2012
		EP 3170904 A1	24 May 2017
		US 9600626 B2	21 March 2017
		US 2013309678 A1	21 November 2013
		US 9582640 B2	28 February 2017
		EP 2274449 A2	19 January 2011
		US 2009298075 A1	03 December 2009
		US 2012289408 A1	15 November 2012
		EP 3045542 B1	16 November 2016
		US 2016251651 A1	01 September 2016
		WO 2016022557 A1	11 February 2016
WO 2016028887 A1	25 February 2016	US 2016208241 A1	21 July 2016
CN 105442054 A	30 March 2016	None	
CN 101415838 A	22 April 2009	EP 1664328 A2	07 June 2006
		US 2005112639 A1	26 May 2005
		WO 2005030983 A3	16 April 2009
		US 2005069938 A1	31 March 2005
		US 2005074804 A1	07 April 2005
		WO 2005030983 A2	07 April 2005
		US 2005069939 A1	31 March 2005
		CA 2540087 A1	07 April 2005
WO 2013096802 A1	27 June 2013	EP 2794927 A1	29 October 2014
		ES 2626058 T3	21 July 2017
		EP 2794927 B1	12 April 2017
		EP 2794927 A4	05 August 2015
		US 2015329855 A1	19 November 2015

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/087414

<p>A. 主题的分类 C12Q 1/68(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) C12Q</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)) CNABS, DWPI, VEN, CNKI, 万方数据库, ISI Web of Knowledge, Google, PubMed: 陆欣华, 核酸等温自扩增, 回文, 茎环, 发夹, 接头, 连接器, 链置换, DNA聚合酶, isothermal, amplification, self-amplification, adaptor, stem, loop, hairpin, strand displacement, Lu X</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>A</td> <td>CN 102084001 A (加利福尼亚太平洋生物科学股份有限公司) 2011年 6月 1日 (2011 - 06 - 01) 全文</td> <td>1-6</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2016022557 A1 (TWIST BIOSCIENCE CORPORATION) 2016年 2月 11日 (2016 - 02 - 11) 全文</td> <td>1-6</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2016028887 A1 (PACIFIC BIOSCIENCES CALIFORNIA, INC.) 2016年 2月 25日 (2016 - 02 - 25) 全文</td> <td>1-6</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 105442054 A (杭州谷坤生物技术有限公司) 2016年 3月 30日 (2016 - 03 - 30) 全文</td> <td>1-6</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 101415838 A (首科安普有限公司) 2009年 4月 22日 (2009 - 04 - 22) 全文</td> <td>1-6</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2013096802 A1 (IBIS BIOSCIENCES, INC.) 2013年 6月 27日 (2013 - 06 - 27) 全文</td> <td>1-6</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	A	CN 102084001 A (加利福尼亚太平洋生物科学股份有限公司) 2011年 6月 1日 (2011 - 06 - 01) 全文	1-6	A	WO 2016022557 A1 (TWIST BIOSCIENCE CORPORATION) 2016年 2月 11日 (2016 - 02 - 11) 全文	1-6	A	WO 2016028887 A1 (PACIFIC BIOSCIENCES CALIFORNIA, INC.) 2016年 2月 25日 (2016 - 02 - 25) 全文	1-6	A	CN 105442054 A (杭州谷坤生物技术有限公司) 2016年 3月 30日 (2016 - 03 - 30) 全文	1-6	A	CN 101415838 A (首科安普有限公司) 2009年 4月 22日 (2009 - 04 - 22) 全文	1-6	A	WO 2013096802 A1 (IBIS BIOSCIENCES, INC.) 2013年 6月 27日 (2013 - 06 - 27) 全文	1-6
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																					
A	CN 102084001 A (加利福尼亚太平洋生物科学股份有限公司) 2011年 6月 1日 (2011 - 06 - 01) 全文	1-6																					
A	WO 2016022557 A1 (TWIST BIOSCIENCE CORPORATION) 2016年 2月 11日 (2016 - 02 - 11) 全文	1-6																					
A	WO 2016028887 A1 (PACIFIC BIOSCIENCES CALIFORNIA, INC.) 2016年 2月 25日 (2016 - 02 - 25) 全文	1-6																					
A	CN 105442054 A (杭州谷坤生物技术有限公司) 2016年 3月 30日 (2016 - 03 - 30) 全文	1-6																					
A	CN 101415838 A (首科安普有限公司) 2009年 4月 22日 (2009 - 04 - 22) 全文	1-6																					
A	WO 2013096802 A1 (IBIS BIOSCIENCES, INC.) 2013年 6月 27日 (2013 - 06 - 27) 全文	1-6																					
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																							
<p>* 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</p>																							
国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期																						
2017年 8月 14日	2017年 9月 1日																						
ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员																						
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	武雪梅																						
传真号 (86-10)62019451	电话号码 (86-10)62414290																						

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	TRIVERS, K.J. 等. "A flexible and efficient template format for circular consensus sequencing and SNP detection." Nucleic Acids Research., 第38卷, 第15期, 2010年 6月 22日 (2010 - 06 - 22), e159	1-6

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/087414

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	102084001	A	2011年 6月 1日	US	2016376647	A1	2016年 12月 29日
				US	2016237485	A1	2016年 8月 18日
				EP	2274449	A4	2012年 4月 18日
				US	8455193	B2	2013年 6月 4日
				BR	PI0909212	A2	2015年 8月 18日
				US	9542527	B2	2017年 1月 10日
				US	8309330	B2	2012年 11月 13日
				WO	2009120372	A2	2009年 10月 1日
				CN	104862383	A	2015年 8月 26日
				AU	2009229157	A1	2009年 10月 1日
				US	2016348167	A1	2016年 12月 1日
				EP	2274449	B1	2015年 12月 23日
				WO	2009120372	A3	2010年 1月 7日
				JP	2011515102	A	2011年 5月 19日
				CA	2719747	A1	2009年 10月 1日
				US	2015159196	A1	2015年 6月 11日
				US	9404146	B2	2016年 8月 2日
				EP	3045542	A1	2016年 7月 20日
				US	2011281768	A1	2011年 11月 17日
				CN	102084001	B	2015年 3月 18日
				AU	2009229157	B2	2015年 1月 29日
				US	2016321397	A1	2016年 11月 3日
				US	8153375	B2	2012年 4月 10日
				EP	3170904	A1	2017年 5月 24日
				US	9600626	B2	2017年 3月 21日
				US	2013309678	A1	2013年 11月 21日
				US	9582640	B2	2017年 2月 28日
				EP	2274449	A2	2011年 1月 19日
				US	2009298075	A1	2009年 12月 3日
				US	2012289408	A1	2012年 11月 15日
				EP	3045542	B1	2016年 11月 16日
WO	2016022557	A1	2016年 2月 11日	US	2016251651	A1	2016年 9月 1日
WO	2016028887	A1	2016年 2月 25日	EP	3183367	A1	2017年 6月 28日
				US	2016208241	A1	2016年 7月 21日
CN	105442054	A	2016年 3月 30日	无			
CN	101415838	A	2009年 4月 22日	EP	1664328	A2	2006年 6月 7日
				US	2005112639	A1	2005年 5月 26日
				WO	2005030983	A3	2009年 4月 16日
				US	2005069938	A1	2005年 3月 31日
				US	2005074804	A1	2005年 4月 7日
				WO	2005030983	A2	2005年 4月 7日
				US	2005069939	A1	2005年 3月 31日
				CA	2540087	A1	2005年 4月 7日
WO	2013096802	A1	2013年 6月 27日	EP	2794927	A1	2014年 10月 29日
				ES	2626058	T3	2017年 7月 21日
				EP	2794927	B1	2017年 4月 12日
				EP	2794927	A4	2015年 8月 5日
				US	2015329855	A1	2015年 11月 19日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)