

滚环扩增方法、测序文库制备方法及制得的 DNA 纳米球

技术领域

本发明涉及测序技术领域，具体涉及一种制备 DNA 纳米球的滚环扩增方法、测序文库制备方法及制得的 DNA 纳米球。

背景技术

滚环扩增（RCA）是以单链环状 DNA/RNA 为模版，将 DNA/RNA 进行大量复制的过程。因其具有快速、准确、所需模板量少等特点，目前已成为生物医学技术和生物纳米技术领域重要的研究手段。华大基因（BGI）基于 RCA 方法形成的 DNA 纳米球（DNB）的测序方法，扩增发生的错误率不累积，从而在测序准确性的源头上就优于其他测序平台，得到了越来越广泛的应用。但是，由于 DNB 需要以单链环状 DNA 为模板制备而成，在文库制备中需要额外增加单链环化的制备过程，增加了文库制备的复杂度。具体而言，在样品制备中，必须先得到单链环状 DNA，其文库制备流程包括 DNA 提取，打断，加接头，PCR 扩增（可选），纯化，单链环化，纯化等步骤。如图 1 所示，现有制备 DNB 的技术中，双链 DNA 经变性后的单链两端与介导序列（Splint oligo）互补配对，在 T4 连接酶的作用下环化，然后消化线性 DNA 并进行磁珠纯化，之后再在 Phi 29 聚合酶的作用下滚环扩增（RCA）得到 DNB。

由于基于 DNB 的测序方法多了后期环化和纯化两个步骤，增加了样品制备难度及时间，同时增加了样品制备的成本。另外，由于环化效率和纯化效率等综合因素影响，此两步的效率仅 10%~30%，大大增加了样品投入量。因而目前基于 DNB 的测序技术所需要的样品量偏多，限制了其在珍稀样品测序的使用范围。虽然可以通过 PCR 扩增来弥补样品量不足的缺陷，但是 PCR 会引入错误，越来越不被业界人士所认可。

发明内容

本发明提供一种滚环扩增方法、测序文库制备方法及制得的 DNA 纳米球，该方法不再以单链环化 DNA 为模版，而是直接以双链 DNA 为模板进行 DNB 制备，省去 DNB 制备过程中单链环化过程，简化了 DNB 制备流程，缩短了制备时间，节约了制备成本，且降低了样品的使用量。

根据第一方面，一种实施例中提供一种滚环扩增方法，包括：将双链 DNA 和介导序列（Splint oligo）在同一体系中依次进行变性和退火，使介导序列与变性的单链 DNA 两端互补配对；在上述体系中同时引入连接酶和聚合酶，在上述连接酶作用下使上述单链 DNA 两端连接，同时在上上述聚合酶作用下以上述介导序列为引物、以上述单链 DNA 为模板进行滚环扩增反应，得到扩增产物，在优选实施例中为 DNA 纳米球。

在优选实施例中，上述双链 DNA 选自 PCR 扩增得到的双链 DNA、连接产物，其中连接产物为 DNA 打断后加上接头的 DNA。

在优选实施例中，上述介导序列仅与上述双链 DNA 变性后的两条单链中的一条单链 DNA 两端互补配对。

在优选实施例中，上述连接酶是 T4 DNA 连接酶。

在优选实施例中，上述聚合酶是 Phi 29 聚合酶。

在优选实施例中，上述变性在 95℃ 下进行。

在优选实施例中，上述退火在 40℃ 下进行。

在优选实施例中，上述连接酶和聚合酶作用下的反应在 30℃ 下进行。

在优选实施例中，上述连接酶和聚合酶作用下的反应进行 20min 以上。

在优选实施例中，上述体系中还引入 ATP 为上述连接酶提供能量。

在优选实施例中，上述双链 DNA 在体系中的加入量是飞摩尔（fmol）水平。

在优选实施例中，上述双链 DNA 在体系中的加入量是 1 飞摩尔以上，优选 10 飞摩尔以上，更优选 40 飞摩尔以上。

在优选实施例中，上述方法是用于 BGI 测序平台上的滚环扩增方法。

根据第二方面，一种实施例中提供一种测序文库制备方法，包括制备 DNA 纳米球的步骤，该步骤包括：将双链 DNA 和介导序列（Splint oligo）在同一体系中依次进行变性和退火，使介导序列与变性的单链 DNA 两端互补配对；在上述体系中同时引入连接酶和聚合酶，在上述连接酶作用下使上述单链 DNA 两端连接，同时在上聚合酶作用下以介导序列为引物、以单链 DNA 为模板进行滚环扩增反应，得到 DNA 纳米球。

在优选实施例中，上述双链 DNA 选自 PCR 扩增得到的双链 DNA、连接产物，其中连接产物为 DNA 打断后加上接头的 DNA。

在优选实施例中，上述方法在制备 DNA 纳米球的步骤之前，还包括 DNA 打断、加接头步骤以得到上述双链 DNA，任选地，在加接头之后还包括 PCR 步骤。

在优选实施例中，上述介导序列仅与上述双链 DNA 变性后的两条单链中的一条单链 DNA 两端互补配对。

在优选实施例中，上述连接酶是 T4 DNA 连接酶；上述聚合酶是 Phi 29 聚合酶。

在优选实施例中，上述变性在 95℃ 下进行；上述退火在 40℃ 下进行。

在优选实施例中，上述连接酶和聚合酶作用下的反应在 30℃ 下进行。

在优选实施例中，上述连接酶和聚合酶作用下的反应进行 20min 以上。

在优选实施例中，上述体系中还引入 ATP 为上述连接酶提供能量。

在优选实施例中，上述双链 DNA 在体系中的加入量是飞摩尔水平。

在优选实施例中，上述双链 DNA 在体系中的加入量是 1 飞摩尔以上，优选

10 飞摩尔以上，更优选 40 飞摩尔以上。

在优选实施例中，上述方法是用于 BGI 测序平台上的测序文库制备方法。

根据第三方面，一种实施例中提供一种第一方面的滚环扩增方法或第二方面的测序文库制备方法得到的 DNA 纳米球。

根据第四方面，一种实施例中提供一种第三方面的 DNA 纳米球在测序中的用途。

在优选实施例中，第一方面的滚环扩增方法或第二方面的测序文库制备方法在文库制备中用于降低 DNA 的起始量。

本发明的滚环扩增方法，以双链 DNA 为模板，PCR 纯化后或加接头的双链 DNA 即可用于 DNB 制备，无需进行单链环化和纯化步骤，简化了样品制备流程，节省时间和成本。更具优势的地方在于，由于无需后续单链环化和纯化的步骤，样品所需量大大减少，即使不做 PCR 扩增，也能满足后续测序所需，避免了 PCR 扩增引入的错误。因此，此方法利于发展无需 PCR (PCR free) 的样品制备方法，针对无需 PCR 的样品以及珍稀样品的 DNB 制备，此方法的优势更为明显。

附图说明

图 1 为现有技术中制备 DNA 纳米球的滚环扩增方法原理示意图；

图 2 为本发明实施例中制备 DNA 纳米球的滚环扩增方法原理示意图；

图 3 为现有技术和本发明方法制备的 DNB 在第一循环 (cycle1) 测序中装载效率 (BIC)、装载质量 (Fit) 和反映 DNB 质量值的 ESR 值的情况；

图 4 为现有技术制备的 DNB 测序显示的四种碱基分布曲线图，其中曲线 1-4 分别表示碱基 A、T、C、G 百分含量；

图 5 为本发明方法制备的 DNB 测序显示的四种碱基分布曲线图，其中曲线

1-4 分别表示碱基 A、T、C、G 百分含量。

具体实施方式

下面通过具体实施方式结合附图对本发明作进一步详细说明。在以下的实施方式中，很多细节描述是为了使得本发明能被更好的理解。然而，本领域技术人员可以毫不费力的认识到，其中部分特征在不同情况下是可以省略的，或者可以由其他元件、材料、方法所替代。

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

如图 2 所示，本发明实施例中制备 DNA 纳米球的滚环扩增方法，包括：将双链 DNA 和介导序列（Splint oligo）在同一体系中依次进行变性和退火，使介导序列与变性的单链 DNA 两端互补配对；在体系中同时引入连接酶和聚合酶，在连接酶作用下使单链 DNA 两端连接，同时在聚合酶作用下以介导序列为引物、以单链 DNA 为模板进行滚环扩增反应，得到 DNA 纳米球。

本发明实施例中，介导序列两端分别与变性的单链 DNA 两端互补配对，因此能够将变性的单链 DNA 两端拉在一起，然后在连接酶的作用下单链 DNA 两端连接形成环状 DNA，作为滚环扩增反应的模板。本发明实施例中，介导序列可以是一条仅与双链 DNA 变性后的两条单链中的一条单链 DNA 两端互补配对的序列，选择两条单链中的一条单链进行环化，并以此环化单链作为滚环扩增反应的模板生成 DNA 纳米球。当然，作为优选方式，介导序列可能是两种或以上的序列，能够与双链 DNA 变性后的两条单链 DNA 两端互补配对，这样两条单链均能发生环化并作为滚环扩增反应的模板。

本发明实施例中，双链 DNA 可以是任何来源的双链 DNA。作为优选实施例，双链 DNA 是 PCR 扩增得到的双链 DNA，尤其是来源于建库过程（如测序文库建库过程）中 PCR 扩增步骤得到的双链 DNA。该方法以双链 DNA 为模板，PCR 纯化后的双链 DNA 即可用于 DNB 制备，无需进行单链环化和纯化步骤，简化了样品制备流程，节省时间和成本。

本发明实施例中，用于使单链 DNA 两端连接的连接酶可以是任何适合单链 DNA 环化连接的连接酶，例如，T4 DNA ligase（连接酶），T3 DNA ligase（连接酶），T7 DNA ligase（连接酶），Taq DNA ligase（连接酶）等，在优选实施例中，连接酶是 T4 DNA 连接酶。

本发明实施例中，用于催化滚环扩增反应的聚合酶可以是任何适合滚环扩增反应的聚合酶，例如，phi29 聚合酶，bst 聚合酶等，在优选实施例中，聚合酶是 Phi 29 聚合酶。

本发明实施例中，双链 DNA 可以通过任何合适的方式变性，包括但不限于热变性和碱变性等。但是从操作的便捷性和不对后续反应产生负面影响的角度，在优选实施例中，选用热变性对双链 DNA 进行变性处理。例如，在一个优选实施例中，变性在 95℃ 下进行。变性时间可以是 1 分钟以上，优选 3 分钟以上，特别优选 3 分钟。

本发明实施例中，介导序列与变性的单链 DNA 的退火可以在合适的温度进行，具体可以根据介导序列两端和变性的单链 DNA 两端互补配对的碱基序列长度、碱基组成等因素确定，一般而言，两端互补配对的碱基序列长度越长，相应的退火温度可以相对越高；两端互补配对的碱基中 GC 含量越高，相应的退火温度可以相对越高。在一个优选实施例中，退火在 40℃ 下进行。

本发明实施例中，连接酶和聚合酶作用下的反应的条件，如反应温度和时间等，可以根据选用的连接酶和聚合酶的种类来确定。为保证反应效率，尽量保证所选用的连接酶和聚合酶的最适反应条件（特别是反应温度）基本一致或

尽量接近。例如，在一个优选实施例中，连接酶选用 T4 DNA 连接酶，聚合酶选用 Phi 29 聚合酶，反应在 30℃ 下进行效果较好。相应地，反应时间也可以根据连接酶和聚合酶的种类来确定，一般而言，尽量保证连接酶和聚合酶催化的反应都能获得比较充分的反应程度。在一个优选实施例中，在连接酶选用 T4 DNA 连接酶、聚合酶选用 Phi 29 聚合酶的情况下，反应时间 20min 以上效果较好，特别是在 30℃ 下进行 20min 的反应效果更佳。

本发明实施例中，根据选用的连接酶的具体种类，还可能加入 ATP 为连接酶提供能量。例如，在一个优选实施例中，连接酶选用 T4 DNA 连接酶，体系中引入 ATP 为 T4 DNA 连接酶提供能量。

由于本发明方法无需进行单链环化和纯化步骤，简化了样品制备流程的同时，更具优势的地方在于，样品所需量大大减少，即使不做 PCR 扩增，也能满足后续测序所需，避免了 PCR 扩增引入的错误。在优选实施例中，双链 DNA 在体系中的加入量可以低至飞摩尔 (fmol) 水平，例如，在一些优选实施例中，双链 DNA 在体系中的加入量是 1 飞摩尔以上，优选 10 飞摩尔以上，更优选 40 飞摩尔以上。本发明方法利于发展无需 PCR (PCR free) 的样品制备方法，针对无需 PCR 的样品以及珍稀样品的 DNB 制备，此方法的优势更为明显。

本发明方法广泛适用于各种基于 DNB 的测序平台，特别是适用于华大基因 (BGI) 测序平台，测序策略可以是 BGISEQ-500 SE50 测序等。

本发明的一种实施例中提供一种测序文库制备方法，包括制备 DNA 纳米球的步骤，该步骤包括：将双链 DNA 和介导序列 (Splint oligo) 在同一体系中依次进行变性和退火，使介导序列与变性的单链 DNA 两端互补配对；在上述体系中同时引入连接酶和聚合酶，在上述连接酶作用下使上述单链 DNA 两端连接，同时上述聚合酶作用下以介导序列为引物、以单链 DNA 为模板进行滚环扩增反应，得到 DNA 纳米球。

在优选实施例中，上述双链 DNA 是 PCR 扩增得到的双链 DNA。在优选实

实施例中，上述方法在制备 DNA 纳米球的步骤之前，还包括 DNA 打断、加接头和 PCR 步骤以得到上述双链 DNA。在优选实施例中，上述介导序列仅与上述双链 DNA 变性后的两条单链中的一条单链 DNA 两端互补配对。在优选实施例中，上述连接酶是 T4 DNA 连接酶；上述聚合酶是 Phi 29 聚合酶。在优选实施例中，上述变性在 95℃ 下进行；上述退火在 40℃ 下进行。在优选实施例中，上述连接酶和聚合酶作用下的反应在 30℃ 下进行 20min 以上。在优选实施例中，上述体系中还引入 ATP 为上述连接酶提供能量。在优选实施例中，上述双链 DNA 在体系中的加入量是飞摩尔水平。在优选实施例中，上述双链 DNA 在体系中的加入量是 1 飞摩尔以上，优选 10 飞摩尔以上，更优选 40 飞摩尔以上。在优选实施例中，上述方法是用于 BGI 测序平台上的测序文库制备方法。

本发明实施例制备得到的 DNA 纳米球，可以直接上机测序，因此在本发明的一个实施例中，提供本发明实施例制备得到的 DNA 纳米球在测序中的用途。

以下通过实施例对本发明进行详细描述，需要说明的是，该实施例仅是示例性的，不能理解为对本发明保护范围的限制。

实施例 1：两种方法比较

(1) DNB 制备

大肠杆菌(E.coli)样品，按照 BGISEQ-500 SE50 测序的文库制备试剂盒(深圳华大智造科技有限公司)(插入片段平均 170bp)说明书，进行 DNA 提取，打断，加接头，PCR 扩增，纯化，定量等过程。

取 1pmol PCR 产物，按照文库制备试剂盒说明书，采用介导序列(Splint oligo)进行环化及以及磁珠(beads)纯化，qubit 定量，此过程用时约 1h 至 1.5h，获得 250fmol 单链环化 DNA。按照 BGISEQ-500 SE50 测序试剂盒的说明书，取其中 40fmol 单链环化 DNA 制备 DNB。使用 qubit 进行定量，DNB 浓度为 12ng/ul，DNB 命名为 A 待用。

按照本发明方法，分别取 120fmol、80fmol、40fmol PCR 产物，按照以下步

骤进行 DNB 制备。

(a) 配置以下表 1 的反应体系：

表 1

组分	用量 (ul)
DNB 制备缓冲液 I(来自 BGISEQ-500 SE50 测序的文库制备试剂盒, 内含 Splint oligo)	20
PCR 产物	X
H ₂ O	20-X
总体积	40

(b) 将表1的反应体系置于PCR仪中, 按照如下表2的程序进行变性及退火。当程序进入第一个4℃时, 按照BGISEQ-500 SE50测序试剂盒的说明书加入酶混合物 (Enzyme mix) I和II, 其中含有Phi 29聚合酶, 并加入1ul BGI的T4 DNA连接酶 (60U/ul) 和1ul ATP (Thermo), 混匀后按“skip (跳过)”键, 进入30℃进行20min, 进入4℃后加入DNB制备试剂盒中的终止缓冲液, 进行qubit定量。120fmol、80fmol和40fmol PCR产物得到的DNB浓度分别是37ng/ul、23ng/ul、11ng/ul, 分别命名为B、C、D待用。

表 2

温度	时间
95℃	3min
40℃	2min
4℃	∞
30℃	20min

4°C	∞
-----	---

比较上述不同的 DNB 制备方法，从 PCR 产物到 DNB，现有方法需要 1.5h 至 2h，而本发明方法仅需 30min 内即可得到 DNB，且缩短了很多的手动操作，减少了人工误差。从样品投入量来计算，本发明方法使用 40fmol PCR 产物得到的 DNB 量与现有方法使用 160fmol PCR 产物得到的 DNB 量相当，即本发明方法样品所需量仅为现有技术的 25%。

(2) DNB 装载

将现有 DNB 制备方法所得 DNB A 和本发明方法 DNB 制备方法所得 DNB D 按照 BGISEQ500 SE50 测序试剂盒说明书进行 DNB 装载，并进行第一循环 (cycle1) 测序。比较根据两种方法所得 DNB 的装载情况，分析两种方法的 DNB 装载效率和质量。如图 3 所示，两种方法在装载效率 (BIC) 和装载质量 (Fit) 上无明显差异，同时比较 ESR (反映 DNB 质量值)，也无明显差异。说明本发明的 DNB 制备方法不会影响 DNB 质量和装载效率。

实施例 2：本发明方法的适用性

实施例 1 使用大肠杆菌 (E.coli) 文库，平均插入片段为 170bp，为了证明本发明方法的广泛适用性，使用人的文库 NA12878 制备平均插入片段 320bp 和 400bp 进行测试。按照 BGISEQ500 PE100 和 PE150 文库制备试剂盒，进行 DNA 提取，打断，加接头，PCR 扩增，纯化，定量等过程。

两种文库各取 40fmol，按照实施例 1 中本发明的 DNB 制备方法进行 DNB 制备与定量，分别标记为 H400 文库和 H320 文库，然后按照测序说明书进行 SE50 测序。BGI500 下机报告显示，此方法制备的 DNB，无论是 H400 还是 H320，其测序质量都表现良好，Q30 大于 90% 且 ESR 大于 85%，芯片的产出率大于 85%，都超出了该文库测序的标准参数 ($\geq 90\%$ Q30, $\geq 80\%$ ESR, $\geq 80\%$ 芯片产出率)，其他测序指标 (如 lag, runon)，也都符合基础参数 (≤ 0.1)。这些结果表明，本发明的 DNB 制备方法能够适用于不用插入片段及不同物种的文库。以上结果显示本发明方法不影响测序质量。

为测试本发明方法是否会引入 CG 和 AT 偏好 (bias)，使用 H400 文库，用现有方法和本发明方法分别进行 PE100 测序。其中 DNB 制备方法如实施例 1，两种方法所制备的 DNB 分别装载到一张芯片的两条测序泳道 (lane)，PE100 测序按照 BGISEQ500 PE100 试剂盒进行装载和测序。现有方法测序数据统计结果如表 3 和图 4 所示；本发明方法测序数据统计结果如表 4 和图 5 所示。二者在 Q30，错误率 (error rate) 和 GC 含量上无明显区别，但是比较碱基分布的情况，现有方法存在 AT 偏好 (bias)，尤其是读长 2 (read2) 表现更为明显，而本发明方法几乎不存在 AT 偏好。

表 3

名称	Phred 值	读长数	碱基数	N 占比%	GC%	Q10%	Q20%	Q30%	错误%
读长 1	33	714080801	71408080100	0.1	41.44	99.10	96.71	88.84	0.41
读长 2	33	714080801	71408080100	0.13	41.35	98.54	93.92	82.56	0.66
读 长 总数	33	714080801	142816160200	0.11	41.44	98.82	95.31	85.70	0.53

表 4

名称	Phred 值	读长数	碱基数	N 占比%	GC%	Q10%	Q20%	Q30%	错误%
读长 1	33	753093992	75309399200	0.22	40.89	99.47	98.13	92.94	0.37
读长 2	33	753093992	75309399200	0.19	41.32	97.80	92.46	80.93	0.93
读 长 总数	33	753093992	150618798400	0.2	41.19	98.63	95.30	86.59	0.65

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

权 利 要 求 书

1. 一种滚环扩增方法，其特征在于，所述方法包括：将双链 DNA 和介导序列在同一体系中依次进行变性和退火，使介导序列与变性的单链 DNA 两端互补配对；在所述体系中同时引入连接酶和聚合酶，在所述连接酶作用下使所述单链 DNA 两端连接，同时在所述聚合酶作用下以所述介导序列为引物、以所述单链 DNA 为模板进行滚环扩增反应，得到扩增产物。

2. 根据权利要求 1 所述的滚环扩增方法，其特征在于，所述双链 DNA 选自 PCR 扩增得到的双链 DNA、连接产物，其中所述连接产物为 DNA 打断后加上接头的 DNA。

3. 根据权利要求 1 所述的滚环扩增方法，其特征在于，所述介导序列仅与所述双链 DNA 变性后的两条单链中的一条单链 DNA 两端互补配对。

4. 根据权利要求 1 所述的滚环扩增方法，其特征在于，所述连接酶是 T4 DNA 连接酶。

5. 根据权利要求 1 所述的滚环扩增方法，其特征在于，所述聚合酶是 Phi 29 聚合酶。

6. 根据权利要求 1 所述的滚环扩增方法，其特征在于，所述变性在 95℃ 下进行。

7. 根据权利要求 1 所述的滚环扩增方法，其特征在于，所述退火在 40℃ 下进行。

8. 根据权利要求 1 所述的滚环扩增方法，其特征在于，所述连接酶和聚合酶作用下的反应在 30℃ 下进行；

任选地，所述连接酶和聚合酶作用下的反应进行 20min 以上。

9. 根据权利要求 1 所述的滚环扩增方法，其特征在于，所述体系中还引入 ATP 为所述连接酶提供能量。

10. 根据权利要求 1 所述的滚环扩增方法，其特征在于，所述双链 DNA 在

体系中的加入量是飞摩尔水平。

11. 根据权利要求 10 所述的滚环扩增方法，其特征在于，所述双链 DNA 在体系中的加入量是 1 飞摩尔以上，优选 10 飞摩尔以上，更优选 40 飞摩尔以上。

12. 根据权利要求 1 所述的滚环扩增方法，其特征在于，所述方法是用于 BGI 测序平台上的滚环扩增方法。

13. 一种测序文库制备方法，其特征在于，所述方法包括制备 DNA 纳米球的步骤，该步骤包括：将双链 DNA 和介导序列在同一体系中依次进行变性和退火，使介导序列与变性的单链 DNA 两端互补配对；在所述体系中同时引入连接酶和聚合酶，在所述连接酶作用下使所述单链 DNA 两端连接，同时在所述聚合酶作用下以所述介导序列为引物、以所述单链 DNA 为模板进行滚环扩增反应，得到 DNA 纳米球。

14. 根据权利要求 13 所述的测序文库制备方法，其特征在于，所述双链 DNA 选自 PCR 扩增得到的双链 DNA、连接产物，其中所述连接产物为 DNA 打断后加上接头的 DNA。

15. 根据权利要求 13 所述的测序文库制备方法，其特征在于，所述方法在制备 DNA 纳米球的步骤之前，还包括 DNA 打断、加接头步骤以得到所述双链 DNA，任选地，加接头后还包括 PCR 扩增步骤。

16. 根据权利要求 13 所述的测序文库制备方法，其特征在于，所述介导序列仅与所述双链 DNA 变性后的两条单链中的一条单链 DNA 两端互补配对。

17. 根据权利要求 13 所述的测序文库制备方法，其特征在于，所述连接酶是 T4 DNA 连接酶；所述聚合酶是 Phi 29 聚合酶。

18. 根据权利要求 13 所述的测序文库制备方法，其特征在于，所述变性在 95℃ 下进行；所述退火在 40℃ 下进行。

19. 根据权利要求 13 所述的测序文库制备方法，其特征在于，所述连接酶和聚合酶作用下的反应在 30℃ 下进行；

任选地，所述连接酶和聚合酶作用下的反应进行 20min 以上。

20. 根据权利要求 13 所述的测序文库制备方法，其特征在于，所述体系中还引入 ATP 为所述连接酶提供能量。

21. 根据权利要求 13 所述的测序文库制备方法，其特征在于，所述双链 DNA 在体系中的加入量是飞摩尔水平。

22. 根据权利要求 21 所述的测序文库制备方法，其特征在于，所述双链 DNA 在体系中的加入量是 1 飞摩尔以上，优选 10 飞摩尔以上，更优选 40 飞摩尔以上。

23. 根据权利要求 13 所述的测序文库制备方法，其特征在于，所述方法是用于 BGI 测序平台上的测序文库制备方法。

24. 根据权利要求 1 至 12 所述的滚环扩增方法或权利要求 13 至 23 所述的测序文库制备方法得到的 DNA 纳米球。

25. 权利要求 24 所述的 DNA 纳米球在测序中的用途。

26. 根据权利要求 1 至 12 所述的滚环扩增方法或权利要求 13 至 23 所述的测序文库制备方法在文库制备中用于降低 DNA 的起始量。