

皂苷类化合物在核酸测序中的用途

技术领域

本发明涉及核酸测序领域。特别地，本发明涉及包含皂苷类化合物的扫描试剂，
5 皂苷类化合物在核酸测序中作为光损伤保护剂的用途，以及一种核酸测序方法。

背景技术

边合成边测序是多核酸测序的理论基础，在测序的过程中对于碱基的识别至关重要。一般情况下，碱基的识别是通过识别标记在不同碱基上的荧光染料类型来确定的，
10 过程包括：使核苷酸暴露于紫外-可见光的照射之下，荧光染料中的生色团发出荧光，之后荧光信号被检测并拍照，进而可以确定荧光染料的类型。

可以使用波长在紫外-可见光范围内的激光作为光源。但是，激光会对模板核苷酸产生损伤，这会严重影响多核酸测序的质量。

在碱基识别过程中所使用的缓冲溶液被称为扫描试剂或拍照试剂。可以通过向扫描试剂中添加光损伤保护剂来阻止激光对模板核苷酸的损伤。然而，现有技术中，扫描试剂中光损伤保护剂成分的浓度较高。高浓度光损伤保护剂的使用使得扫描试剂在低温保存时或者在长时间的测序过程出现盐析出现象。此外，在长时间储放过程中，有些光损伤保护成分被氧化后会出现变色现象，从而影响扫描质量，进而影响多核苷酸的测序质量。另外，高浓度的光损伤保护剂的使用会使得产品成本增加。
15

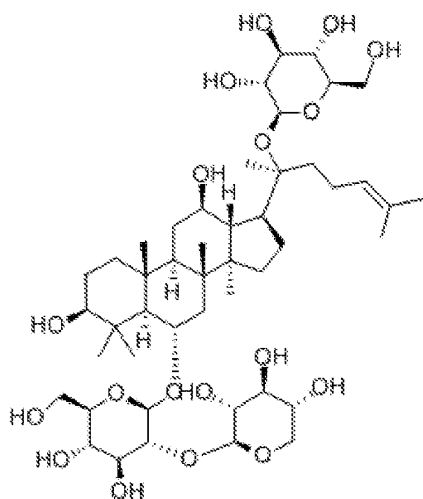
20

发明内容

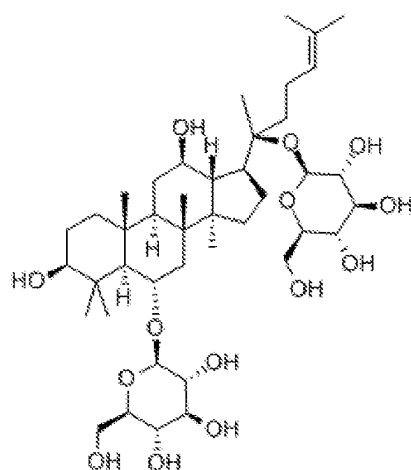
本发明使用皂苷类化合物（例如三七皂苷和人参皂苷）作为光损伤保护剂，在很低的工作浓度下，也可以达到对模板核苷酸的保护。本发明使用的皂苷类化合物在紫外可见光区没有吸收，不存在对碱基识别信号干扰，即使长期储存过程中被氧化也不会出现变色现象。
25

本申请提供了以下发明：

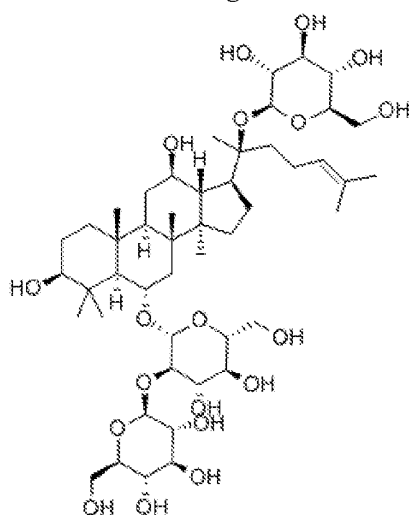
在一个方面，本申请提供了一种扫描试剂，其包含皂苷类化合物，以及 Tris 缓冲溶液，所述皂苷类化合物选自以下化合物中的一个或多个：



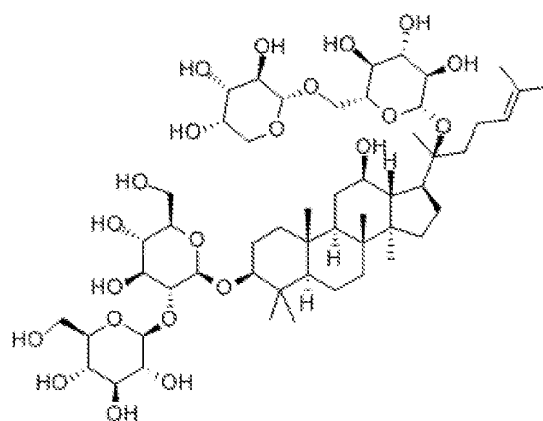
三七皂苷 R1 (Notoginsenoside R1)



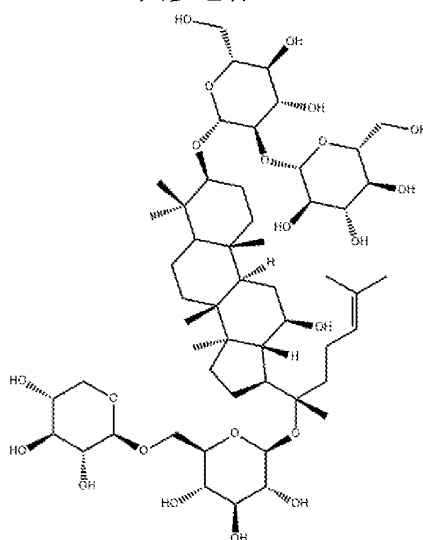
人参皂苷 Rg1



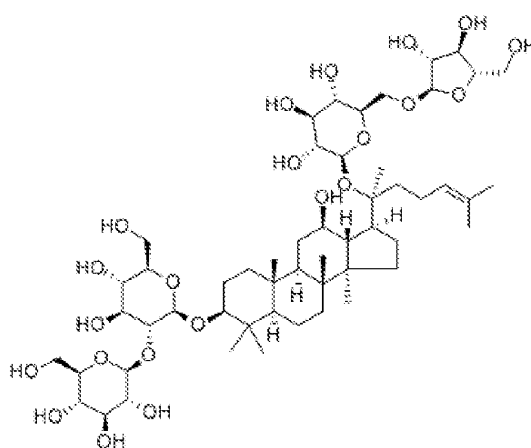
人参皂苷 Rd



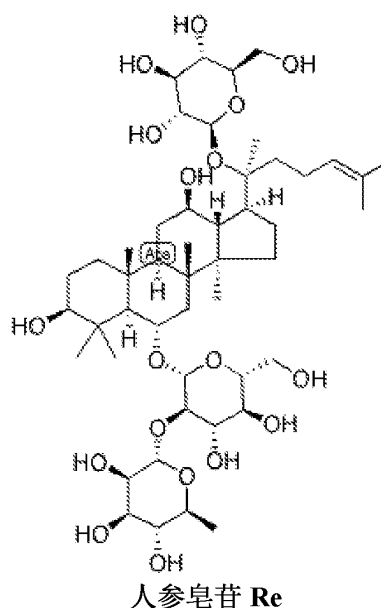
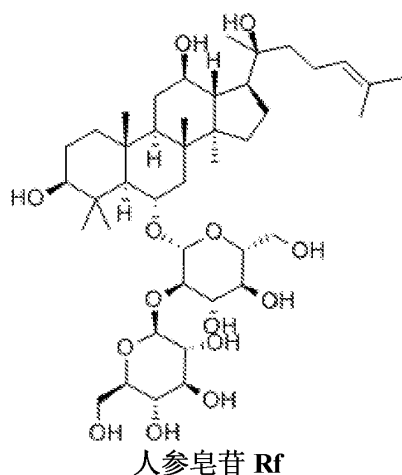
人参皂苷 Rb2



人参皂苷 Rb3



人参皂苷 Rc



。

本发明中，Tris 缓冲溶液指的是以三羟甲基氨基甲烷（Tris）作为缓冲体系的缓冲溶液。

Tris 被广泛用于生物化学和分子生物学的缓冲溶液的制备。Tris 为弱碱，其碱的水溶液 pH 在 10.5 左右，加入盐酸调节 pH 值至所需值，即可获得该 pH 值的缓冲液。也可使用 Tris 与其盐酸盐（Tris-HCl）配制缓冲溶液。

Tris 缓冲溶液的有效缓冲范围在 pH7.0 到 9.2 之间。Tris 缓冲溶液可用作溶解核酸的溶剂。

本发明中，皂苷类化合物在很低的使用浓度下，也可以达到对模板核苷酸的保护。在某些实施方案中，所述皂苷类化合物的浓度为 0.01-10 mM 或 10-100 mM，例如 0.01-0.02mM、0.02-0.03mM、0.03-0.04mM、0.04-0.05mM、0.05-0.06mM、0.06-0.07mM、0.07-0.08mM、0.08-0.09mM、0.09-0.1mM、0.1-0.2mM、0.2-0.3mM、0.3-0.4mM、0.4-0.5mM、0.5-0.6mM、0.6-0.7mM、0.7-0.8mM、0.8-0.9mM、0.9-1.0mM、1-2mM、2-3mM、3-4mM、4-5mM、5-6mM、6-7mM、7-8mM、8-9、9-10mM、10-20mM、20-30mM、30-40mM、40-50mM、50-60mM、60-70mM、70-80mM、80-90 或 90-100mM。

在某些实施方案中，三七皂苷 R1（Notoginsenoside R1）的浓度可以为 0.01-10 mM，例如 0.01-0.5mM、0.5-1mM、1-2mM、2-3mM、3-4mM、4-5mM、5-6mM、6-7mM、7-8mM、8-9 或 9-10mM。

在某些实施方案中，人参皂苷 Rg1 的浓度可以为 10-100 mM，例如 10-20mM、20-30mM、

30-40mM、40-50mM、50-60mM、60-70mM、70-80mM、80-90 或 90-100mM。

在某些实施方案中，所述扫描试剂还包含其他光损伤保护剂，例如奎诺二甲基丙烯酸酯 ((±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid)、乙二胺四乙酸四钠盐二水合物 (Ethylenediaminetetraacetic acid tetrasodium salt dihydrate)、L-二硫苏糖醇 (L-Dithiothreitol) 或其任意组合。一种以上的光损伤保护剂加入到扫描试剂中将更利于 DNA 测序质量的提高。

在某些实施方案中，所述扫描试剂包含奎诺二甲基丙烯酸酯，例如，包含三七皂苷 R1 和奎诺二甲基丙烯酸酯，或包含人参皂苷 Rg1 和奎诺二甲基丙烯酸酯。

在某些实施方案中，所述扫描试剂包含奎诺二甲基丙烯酸酯和乙二胺四乙酸四钠盐二水合物，例如，包含三七皂苷 R1、奎诺二甲基丙烯酸酯和乙二胺四乙酸四钠盐二水合物，或包含人参皂苷 Rg1、奎诺二甲基丙烯酸酯和乙二胺四乙酸四钠盐二水合物。

在某些实施方案中，所述扫描试剂包含奎诺二甲基丙烯酸酯、乙二胺四乙酸四钠盐二水合物和 L-二硫苏糖醇，例如包含三七皂苷 R1、奎诺二甲基丙烯酸酯、乙二胺四乙酸四钠盐二水合物和 L-二硫苏糖醇，或包含人参皂苷 Rg1、奎诺二甲基丙烯酸酯、乙二胺四乙酸四钠盐二水合物和 L-二硫苏糖醇。

在某些实施方案中，所述扫描试剂中的奎诺二甲基丙烯酸酯、乙二胺四乙酸四钠盐二水合物或 L-二硫苏糖醇的浓度各自独立地为 5-50 mM，例如各自独立地选自 5-10mM、10-20mM、20-30mM、30-40mM、40-50mM。

在某些实施方案中，所述扫描试剂还包含氯化钠和/或 DNA 的稳定剂（例如吐温-20）。氯化钠的作用是提供盐溶液背景，保护测序中的引物。

在某些实施方案中，所述 Tris 缓冲溶液包含水，三羟甲基氨基甲烷 (Tris Base)，氯化钠，吐温-20 和三羟甲基氨基甲烷盐酸盐 (Tris-HCl)。

在某些实施方案中，所述 Tris 缓冲溶液通过以下方法制得：将 Tris Base (粉末)，氯化钠 (粉末)，Tween-20，Tris-HCl (粉末) 按一定的配比溶解在超纯水中。

在某些实施方案中，本发明的扫描试剂中，各组分的浓度如下表所示。

试剂组成名称	英文名称	浓度范围
乙二胺四乙酸四钠盐二水合物	Ethylenediaminetetraacetic Acid Tetrasodium Salt Dihydrate	5-50 mM
奎诺二甲基丙烯酸酯	(±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid	5-50 mM
三七皂苷 R1	Notoginsenoside R1	0.01-10 mM

L-二硫苏糖醇	L-Dithiothreitol	5-50 mM
人参皂苷 Rg1	Ginsenoside Rg1	10-100 mM

在另一个方面，本申请提供了皂苷类化合物（例如三七皂苷或人参皂苷）在核酸测序中作为光损伤保护剂的用途，所述皂苷类化合物选自三七皂苷 **R1**、人参皂苷 **Rg1**、人参皂苷 **Rd**、人参皂苷 **Rb2**、人参皂苷 **Rb3**、人参皂苷 **Rc**、人参皂苷 **Rf**、人参皂苷 **Re**，各化合物结构式如上文所示。

5 在另一个方面，本申请提供了一种试剂盒，其包含本发明的扫描试剂。

在某些实施方案中，本发明的试剂盒还可以包含：用于将待测序的核酸分子与支持物固定（例如，通过共价或非共价连接进行固定）的试剂；用于起始核苷酸聚合反应的引物；用于进行核苷酸聚合反应的聚合酶；一种或多种缓冲溶液；一种或多种洗涤溶液；或其任何组合。

10 在某些实施方案中，本发明的试剂盒还可以包含，用于从样品中提取核酸分子的试剂和/或装置。用于从样品中提取核酸分子的方法是本领域熟知的。因此，可根据需要，在本发明的试剂盒中配置各种用于提取核酸分子的试剂和/或装置，例如用于破碎细胞的试剂，用于沉淀 **DNA** 的试剂，用于洗涤 **DNA** 的试剂，用于溶解 **DNA** 的试剂，用于沉淀 **RNA** 的试剂，用于洗涤 **RNA** 的试剂，用于溶解 **RNA** 的试剂，用于去除蛋白的试剂，用于去除 **DNA** 的试剂（例如当目的核酸分子为 **RNA** 时），用于去除 **RNA** 的试剂（例如当目的核酸分子为 **DNA** 时），及其任何组合。

在某些实施方案中，本发明的试剂盒还包含，用于预处理核酸分子的试剂。在本发明的试剂盒中，用于预处理核酸分子的试剂不受额外限制，并且可根据实际需要选择。所述用于预处理核酸分子的试剂包括例如，用于核酸分子片段化的试剂（例如 **DNA** 酶 **I**），用于补齐核酸分子末端的试剂（例如 **DNA** 聚合酶，例如 **T4 DNA** 聚合酶，**Pfu DNA** 聚合酶，**Klenow DNA** 聚合酶），接头分子，标签分子，用于将接头分子与目的核酸分子相连接的试剂（例如连接酶，例如 **T4 DNA** 连接酶），用于修复核酸末端的试剂（例如，丧失 **3'-5'** 核酸外切酶活性但显示 **5'-3'** 核酸外切酶活性的 **DNA** 聚合酶），用于扩增核酸分子的试剂（例如，**DNA** 聚合酶，引物，**dNTP**），用于分离和纯化核酸分子的试剂（例如层析柱），以及其任何组合。

在某些实施方案中，本发明的试剂盒还包含用于固定待测序的核酸分子的支持物。在通常情况下，用于固定待测序的核酸分子的支持物呈固相，以便于操作。因此，在本公开内容中，“支持物”有时也被称为“固体支持物”或“固相支持物”。然而，应当理解的是，本文

所提及的“支持物”并不限于固体，其还可以是半固体（例如凝胶）。

如本文所用的，术语“装载”“固定”和“附着”当提及核酸使用时，意指经由共价键或非共价键直接或间接附接至固体支持物。在本公开内容的某些实施方案中，本发明的方法包括经由共价附接将核酸固定在固体支持物上。但是通常地，仅需要的是在期望使用固体支持物的条件下（例如在需要核酸扩增和/或测序的应用中），核酸保持固定或附接至固体支持物。在某些实施方案中，将核酸固定在固体支持物上可以包括将待用作捕获引物或扩增引物的寡核苷酸固定在固体支持物上，使得 3' 末端对于酶促延伸是可利用的并且该引物序列的至少一部分能够杂交至互补核酸序列；然后将待固定的核酸杂交至所述寡核苷酸，在这种情况下固定的寡核苷酸或多核苷酸可以为 3'-5' 方向。在某些实施方案中，将核酸固定在固体支持物上可以包括通过氨基化修饰将核酸结合蛋白质结合在固体支持物上，并通过核酸结合蛋白质捕获核酸分子。可选地，装载可以通过除碱基配对杂交之外的其他方式发生，例如上文描述的共价附接。核酸与固体支持物附接方式的非限制性示例包括核酸杂交、生物素链霉亲和素结合、巯基结合、光活化结合、共价结合、抗体-抗原、经由水凝胶或其他多孔聚合物的物理限制等。用于将核酸固定在固体支持物上的各种示例性方法可参见例如 G.Steinberg-Tatman 等人, *Bioconjugate Chemistry* 2006, 17, 841-848; Xu X.等人 *Journal of the American Chemical Society* 128(2006)9286-9287; 美国专利申请 US 5639603、US 5641658、US2010248991; 国际专利申请 WO 2001062982、WO 2001012862、WO 2007111937、WO0006770，为了所有目的，特别是为了与制备形成其上固定有核酸的固体支持物有关的全部教导，以上文献均通过引用全文并入本文。

在本发明中，所述支持物可以由各种合适的材料制成。此类材料包括例如：无机物、天然聚合物、合成聚合物，以及其任何组合。具体的例子包括但不限于：纤维素、纤维素衍生物（例如硝化纤维素）、丙烯酸树脂、玻璃、硅胶、二氧化硅、聚苯乙烯、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、乙烯基和丙烯酰胺的共聚物、与二乙烯基苯等交联的聚苯乙烯（参见例如，Merrifield *Biochemistry* 1964, 3, 1385-1390）、聚丙烯酰胺、乳胶、葡聚糖、橡胶、硅、塑料、天然海绵、金属塑料、交联的葡聚糖（例如，SephadexTM）、琼脂糖凝胶(SepharoseTM)，以及本领域技术人员已知的其他支持物。

在某些优选的实施方案中，用于固定待测序的核酸分子的支持物可以是包括惰性基底或基质（例如，载玻片、聚合物珠等）的固体支持物，所述惰性基底或基质已例如通过应用含有活性基团的中间材料而被功能化，所述活性基团允许共价连接诸如多核苷酸的生物

分子。此类支持物的实例包括但不限于，负载于诸如玻璃的惰性基底上的聚丙烯酰胺水凝胶，特别是 WO 2005/065814 和 US 2008/0280773 中描述的聚丙烯酰胺水凝胶，其中，所述专利申请的内容通过引用以其全文并入本文。在此类实施方案中，生物分子（例如多核苷酸）可被直接地共价地连接至中间材料（例如水凝胶），而中间材料其自身可被非共价地连接至基底或基质（例如，玻璃基底）。在某些优选的实施方案中，所述支持物为表面修饰了一层亲和素、氨基、丙烯酰胺硅烷或醛基化学基团的玻片或硅片。

在本发明中，支持物或固体支持物不受限于其大小、形状和构造。在一些实施方案中，支持物或固体支持物是平面结构，例如载片、芯片、微芯片和/或阵列。此类支持物的表面可以是平面层的形式。

在某些优选的实施方案中，用于固定待测序的核酸分子的支持物为珠或孔的阵列（其也被称为芯片）。所述阵列可以使用本文概述的用于制备固体支持物的任何材料来制备，并且优选地，阵列上的珠或孔的表面进行了官能化，以利于核酸分子的固定。阵列上的珠或孔的数目不受限制。例如，每一个阵列可包含 $10\text{-}10^2$ 、 $10^2\text{-}10^3$ 、 $10^3\text{-}10^4$ 、 $10^4\text{-}10^5$ 、 $10^5\text{-}10^6$ 、 $10^6\text{-}10^7$ 、 $10^7\text{-}10^8$ 、 $10^8\text{-}10^9$ 、 $10^{10}\text{-}10^{11}$ 、 $10^{11}\text{-}10^{12}$ 或更多个珠或孔。在某些示例性实施方案中，每个珠或孔的表面可固定一个或多个核酸分子。相应地，每一个阵列可固定 $10\text{-}10^2$ 、 $10^2\text{-}10^3$ 、 $10^3\text{-}10^4$ 、 $10^4\text{-}10^5$ 、 $10^5\text{-}10^6$ 、 $10^6\text{-}10^7$ 、 $10^7\text{-}10^8$ 、 $10^8\text{-}10^9$ 、 $10^{10}\text{-}10^{11}$ 、 $10^{11}\text{-}10^{12}$ 或更多个核酸分子。因此，此类阵列可特别有利地用于核酸分子的高通量测序。

在某些优选的实施方案中，本发明的试剂盒还包含用于将待测序的核酸分子与支持物固定（例如，通过共价或非共价连接进行固定）的试剂。此类试剂包括例如对核酸分子（例如其 5'端）进行活化或修饰的试剂，例如磷酸、硫醇、胺、羧酸或醛；对支持物的表面进行活化或修饰的试剂，例如氨基-烷氧基硅烷（例如氨基丙基三甲氧基硅烷、氨基丙基三乙氧基硅烷、4-氨基丁基三乙氧基硅烷等）；交联剂，例如琥珀酰酐、苯基二异硫氰酸盐(Guo 等人，1994)、马来酸酐(Yang 等人，1998)、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐(EDC)、间-马来酰亚胺基苯甲酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBS)、N-琥珀酰亚胺基[4-碘代乙酰基]氨基苯甲酸(SIAB)、4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺(SMCC)、N-γ-马来酰亚胺基丁酰氧基-琥珀酰亚胺酯(GMBS)、4-(p-马来酰亚胺基苯基)丁酸琥珀酰亚胺(SMPB)；以及其任何组合。

在某些优选的实施方案中，本发明的试剂盒还包含用于起始核苷酸聚合反应的引物。在本发明中，引物不受额外的限制，只要它能够特异地退火到目标核酸分子的一个区域上。在一些示例性实施方案中，所述引物的长度可以为 5-50bp，例如 5-10、10-15、15-20、

20-25、25-30、30-35、35-40、40-45、45-50bp。在一些示例性实施方案中，所述引物可包含天然存在或非天然存在的核苷酸。在一些示例性实施方案中，所述引物包含天然存在的核苷酸或者由天然存在的核苷酸组成。在一些示例性实施方案中，所述引物包含经修饰的核苷酸，例如锁核酸（LNA）。在某些优选的实施方案中，所述引物包含通用引物序列。

- 5 在某些优选的实施方案中，本发明的试剂盒还包含用于进行核苷酸聚合反应的聚合酶。在本发明中，可使用各种合适的聚合酶进行聚合反应。在一些示例性实施方案中，所述聚合酶能够以 DNA 为模板合成新的 DNA 链（例如 DNA 聚合酶）。在一些示例性实施方案中，所述聚合酶能够以 RNA 为模板合成新的 DNA 链（例如反转录酶）。在一些示例性实施方案中，所述聚合酶能够以 DNA 或 RNA 为模板合成新的 RNA 链（例如 RNA 聚合酶）。因此，在某些优选的实施方案中，所述聚合酶选自 DNA 聚合酶，RNA 聚合酶，和反转录酶。

在某些优选的实施方案中，本发明的试剂盒还包含一种或多种切除试剂。在某些实施方案中，所述切除试剂选自内切酶 IV 和碱性磷酸酶。

- 在某些优选的实施方案中，本发明的试剂盒还包含一种或多种缓冲溶液。此类缓冲溶液包括但不限于，用于 DNA 酶 I 的缓冲溶液，用于 DNA 聚合酶的缓冲溶液，用于连接酶的缓冲溶液，用于洗脱核酸分子的缓冲溶液，用于溶解核酸分子的缓冲溶液，用于进行核苷酸聚合反应（例如 PCR）的缓冲溶液，和用于进行连接反应的缓冲溶液。本发明的试剂盒可包含上述缓冲溶液的任一种或多种。

- 在某些实施方案中，所述用于 DNA 聚合酶的缓冲溶液包含一价盐离子（例如钠离子、氯离子）和/或二价盐离子（例如镁离子、硫酸根离子，锰离子）。在某些实施方案中，所述一价盐离子或二价盐离子在所述缓冲溶液中的浓度为 10 μ M -200mM，例如 10 μ M、50 μ M、100 μ M、200 μ M、500 μ M、1 mM、3mM、10mM、20mM、50mM、100mM、150mM 或 200mM。

- 在某些实施方案中，所述用于 DNA 聚合酶的缓冲溶液包含三羟甲基氨基甲烷(Tris)。在某些实施方案中，Tris 在所述缓冲溶液中的浓度为 10mM-200mM，例如 10mM、20mM、50mM、100mM、150mM 或 200mM。

在某些实施方案中，所述用于 DNA 聚合酶的缓冲溶液包含有机溶剂，例如 DMSO 或丙三醇（甘油）。在某些实施方案中，所述有机溶剂在所述缓冲溶液中的质量含量为 0.01%-10%，例如 0.01%、0.02%、0.05%、1%、2%、5%或 10%。

- 在某些实施方案中，所述用于 DNA 聚合酶的缓冲溶液的 pH 为 7.0-9.0，例如 7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9

或 9.0。

在某些实施方案中，所述用于 DNA 聚合酶的缓冲溶液包含：一价盐离子（例如钠离子、氯离子）、二价盐离子（例如镁离子、硫酸根离子、锰离子）、Tris 和有机溶剂（例如 DMSO 或甘油）。在某些实施方案中，所述缓冲溶液相的 pH 为 8.8。

- 5 在某些优选的实施方案中，本发明的试剂盒还包含一种或多种洗涤溶液。此类洗涤溶液的实例包括但不限于，磷酸盐缓冲液，柠檬酸盐缓冲液，Tris-HCl 缓冲液，醋酸盐缓冲液，碳酸盐缓冲液等。本发明的试剂盒可包含上述洗涤溶液的任一种或多种。

在另一个方面，本申请提供了本发明的扫描试剂或试剂盒用于测定目标多核苷酸的序列的用途。

- 10 在另一个方面，本申请提供了制备本发明的扫描试剂的方法，包括将扫描试剂的各成分溶解在超纯水中，制成透明均一的溶液，之后对溶液进行过滤，得到本发明的扫描试剂。可使用超声辅助溶解。

- 在另一个方面，本申请提供了一种核酸测序的方法，所述方法包括使用本发明的扫描试剂。在某些实施方案中，本发明的测序方法包括一边合成目标单链多核苷酸互补的生长的多核苷酸，一边进行扫描拍照检测。
- 15

在某些实施方案中，所述测定目标单链多核苷酸的序列的方法包括：

（a）提供双链体、核苷酸、聚合酶和切除试剂；所述双链体包含生长的核酸链以及待测序的核酸分子；

（b）进行包含以下步骤（i）、（ii）和（iii）的反应循环：

- 20 步骤（i）：使用聚合酶，使核苷酸并入生长的核酸链，形成包含阻断基团和可检测标记的核酸中间体；

步骤（ii）：对所述核酸中间体上的可检测标记进行检测；

步骤（iii）：使用切除试剂将核酸中间体上的阻断基团除去。

- 在某些实施方案中，所述反应循环还包括步骤（iv）：使用切除试剂将核酸中间体上的可检测标记除去。
- 25

在某些实施方案中，所述方法包括以下步骤：

第一步，将 DNA 纳米球（DNA nanoball，简称 DNB）加载到准备好的测序芯片上；

第二步，将准备好的 dNTP 分子混合溶液泵入芯片用 DNA 聚合酶将 dNTP 加入到待测 DNA 的互补链上；

- 30 第三步，拍照扫描，由于 dNTP 是被修饰的带有荧光基团分子，用激光作为激发波长

进行拍照；由于激光对于 DNA 有光损伤作用，因此在拍照这一步骤加入包含光损伤保护剂的扫描试剂进行拍照；

第四步，通过切除试剂将碱基端荧光基团和 3' 的阻断切除并洗脱干净，使得 3'-OH 裸露从而进行下一轮反应；

5 第五步，通过对拍照结果进行分析，确定待测核酸分子的碱基序列。

本发明中，核酸可以包括核苷酸或核苷酸类似物。核苷酸通常含有糖、核碱基和至少一个磷酸基。核苷酸包括脱氧核糖核苷酸、修饰的脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、修饰的核糖核苷酸、肽核苷酸、修饰的肽核苷酸、修饰磷酸盐糖主链核苷酸及其混合物。核苷酸的实例包括(例如)腺苷一磷酸(AMP)、腺苷二磷酸(ADP)、腺苷三磷酸(ATP)、胸苷一磷酸(TMP)、胸苷二磷酸(TDP)、胸苷三磷酸(TTP)、胞苷酸(CMP)、胞苷二磷酸(CDP)、胞苷三磷酸(CTP)、鸟苷一磷酸(GMP)、鸟苷二磷酸(GDP)、鸟苷三磷酸(GTP)、尿苷一磷酸(UMP)、尿苷二磷酸(UDP)、尿苷三磷酸(UTP)、脱氧腺苷酸(dAMP)、脱氧腺苷二磷酸(dADP)、脱氧腺苷三磷酸(dATP)、脱氧胸腺嘧啶核苷一磷酸(dTMP)、脱氧胸腺嘧啶核苷二磷酸(dTDP)、脱氧胸腺嘧啶核苷三磷酸(dTTP)、去氧胞二磷酸(dCDP)、脱氧胞苷三磷酸(dCTP)、脱氧鸟苷一磷酸(dGMP)、脱氧鸟苷二磷酸(dGDP)、脱氧鸟苷三磷酸(dGTP)、脱氧尿苷一磷酸(dUMP)、脱氧尿苷二磷酸(dUDP)和脱氧尿苷三磷酸(dUTP)。还可以在本文所述的方法中使用包含修饰的核碱基的核苷酸类似物。无论是具有天然主链还是类似结构，可以包含在多核苷酸中的示例性修饰的核碱基包括(例如)肌苷、黄嘌呤、次黄嘌呤、异胞嘧啶、异鸟嘌呤、2-氨基嘌呤、5-甲基胞嘧啶、5-羟甲基胞嘧啶、2-氨基腺嘌呤、6-甲基腺嘌呤、6-甲基鸟嘌呤、2-丙基鸟嘌呤、2-丙基腺嘌呤、2-硫脲嘧啶、2-硫胸腺嘧啶、2-硫胞嘧啶、15-卤代脲嘧啶、15-卤代胞嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶、5-丙炔基胞嘧啶、6-偶氮尿嘧啶、6-偶氮胞嘧啶、6-偶氮胸腺嘧啶、5-尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、8-卤代腺嘌呤或鸟嘌呤、8-氨基腺嘌呤或鸟嘌呤、8-硫腺嘌呤或鸟嘌呤、8-硫烷基腺嘌呤或鸟嘌呤、8-羟基腺嘌呤或鸟嘌呤、5-卤素取代的尿嘧啶或胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤、7-甲基腺嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤、8-氮杂腺嘌呤、7-去氮鸟嘌呤、7-去氮腺嘌呤、3-去氮鸟嘌呤、3-去氮腺嘌呤等。如本领域中已知的，某些核苷酸类似物不能引入多核苷酸，例如，核苷酸类似物，如腺苷 5'-磷酰硫酸。

10
15
20
25

在本发明的方法中，待测序的核酸分子不受其长度的限制。在某些优选的实施方案中，待测序的核酸分子的长度可以为至少 10bp，至少 20bp，至少 30bp，至少 40bp，至少 50bp，至少 100bp，至少 200bp，至少 300bp，至少 400bp，至少 500bp，至少 1000bp，或者至

30

少 2000bp。在某些优选的实施方案中,待测序的核酸分子的长度可以为 10-20bp, 20-30bp, 30-40bp, 40-50bp, 50-100bp, 100-200bp, 200-300bp, 300-400bp, 400-500bp, 500-1000bp, 1000-2000bp, 或者超过 2000bp。在某些优选的实施方案中, 待测序的核酸分子可具有 10-1000bp 的长度, 以利于进行高通量测序。

- 5 在某些优选的实施方案中, 在将核酸分子固定于支持物之前, 可以对核酸分子进行预处理。此类预处理包括但不限于, 核酸分子的片段化, 末端的补齐, 接头的添加, 标签的添加, 核酸分子的扩增, 核酸分子的分离和纯化, 以及其任何组合。

如本文所用的术语“纳米球”一般表示大分子或复合体, 其具有紧凑的, 例如内径范围典型地在大约 1 nm 与大约 1000 nm 之间, 优选地大约 50 nm 与大约 500 nm 之间的 (近似) 球形形状。

如本文所用的术语“核酸纳米球”通常是包含多拷贝的靶核酸分子的多联体。这些核酸拷贝典型地一个接一个地布置在核苷酸的连续线型链中, 但是本发明的核酸纳米球还可以利用本文描述的方法由任何核酸分子制成。该串联重复结构连同 DNA 的单链性质引起纳米球折叠(folding)配置。一般而言, 核酸纳米球中的多拷贝的靶核酸分子各自包含序列已知的接头序列, 以便于对其进行扩增或测序。各靶核酸分子的接头序列通常是相同的, 但也可以不同。核酸纳米球通常包括 DNA 纳米球, 在本文中也称为 DNB (DNA nanoball)。

核酸纳米球可以使用例如滚环复制(RCA)来产生。RCR 过程曾被用于制备多个连续拷贝的 M13 基因组(Blanco 等人, (1989)J Biol Chem 264:8935-8940)。在这种方法中, 核酸经线性多联体化复制。本领域技术人员可以在许多参考文献中找到关于选择 RCR 反应的条件和试剂的指南, 包括美国专利 US5,426,180、US5,854,033、US6,143,495 和 US5,871,921, 为了所有目的, 特别是为了与利用 RCR 或其他方法制备核酸纳米球有关的全部教导, 这些文献均通过引用全文并入本文。

核酸纳米球可以装载在如本文所述的固体支持物的表面上。纳米球可以通过任何合适的方法附着到固体支持物的表面, 这样的方法的非限制性示例包括核酸杂交、生物素链霉亲和素结合、巯基结合、光活化结合、共价结合、抗体-抗原、经由水凝胶或其他多孔聚合物的物理限制等, 或它们的组合。在一些情况下, 纳米球可以用核酸酶(例如, DNA 核酸酶)消化, 以便从纳米球产生较小的纳米球或片段。

某些实施方案中, 固体支持物表面可能带有反应性官能团, 所述反应性官能团与多核苷酸分子上的互补官能团反应形成共价键, 例如采用与附着 cDNA 到微阵列上所

用的技术相同的方式进行，例如参见 Smirnov 等人 (2004), *Genes, Chromosomes&Cancer*, 40:72-77 和 Beaucage(2001), *Current Medicinal Chemistry*, 8:1213_1244, 这两份文献通过引用并入本文。DNB 还可以有效地附着到疏水性表面，例如带有低浓度的各种反应官能团(例如-OH 基团)的干净的玻璃表面。经由多核苷酸分子和表面上的反应性官能团之间形成的共价键的附着在本文中又称为“化学附着”。

在其他实施方案中，多核苷酸分子可以吸附到表面上。在这种实施方式中，多核苷酸通过与表面的非特异性相互作用，或者通过诸如氢键、范德华力等的非共价相互作用被固定。

在其它实施方案中，核酸文库可以是双链核酸片段，通过与固定在固体支持物表面的寡核酸发生连接反应固定在固体支持物表面，然后进行桥式扩增反应制备测序文库。

有益效果

本发明可以实现以下有益效果：

本发明使用皂苷类化合物作为核酸的光损伤保护剂，即使用很低的浓度也可以达到对模板核苷酸的保护。本发明使用的皂苷类化合物在紫外可见光区没有吸收，即使在多轮测序反应之后，数据质量依然很高，不存在对碱基识别信号干扰，而且长期储存过程中被氧化也不会出现变色现象。通过使用本发明优化的扫描试剂可以大大提高核酸测序，特别是多核苷酸测序的质量。

下面将结合附图和实施例对本发明的实施方案进行详细描述，但是，本领域技术人员将理解，下列附图和实施例仅用于说明本发明，而不是对本发明的范围的限定。根据附图和优选实施方案的下列详细描述，本发明的各种目的和有利方面对于本领域技术人员来说将变得显然。

附图说明

图 1 显示了实施例中扫描试剂组成对测序质量的影响。

图 2 显示了实施例中三七皂苷 R1 的浓度对测序质量的影响。

图 3 显示了实施例中 Trolox 的浓度对测序质量的影响。

图 4 显示了实施例中 EDTA-4Na 的浓度对测序质量的影响。

图 5 显示了实施例中 DTT 的浓度对测序质量的影响。

图 6 显示了实施例中不同浓度的人参皂苷 **Rg1** 测序质量的影响。

具体实施方式

下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述，但是本领域技术人员将会理解，
5 下列实施例仅用于说明本发明，而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。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。

实施例

1. 实验器材

10 **MGISEQ-2000RS** 测序仪，**MGIDL-200H** 加载仪，**MGISEQ-2000RS** 测序载片，仪器的激发波长：分别为 **532nm, 650nm**。

2. 实验所用试剂和原料

Tris Base (粉末)，**氯化钠** (粉末)，**Tween-20**，**Tris-HCl** (粉末)，三七皂苷 **R1**，奎诺二甲基丙烯酸酯 (**Trolox**)，乙二胺四乙酸四钠盐二水合物，**L-二硫苏糖醇**，人参皂苷 **Rg1**。
15 以上试剂均购于合规化学试剂供应公司。**MGISEQ-2000RS** 高通量测序试剂盒，货号为 **1000012536**，品牌为 **MGI**。大肠杆菌单链环 DNA 为模板即标准文库试剂 **V3.0**，引物序列：
CAACTCCTTGGCTCACAGAACATGGCTACGATCCGACTT。**dATP-1**，其是指同时具有可逆阻断基团修饰和 **Cy5** 荧光修饰的腺嘌呤核苷酸；**dTTP-1**，其是指同时具有可逆阻断基团修饰和 **ROX** 荧光修饰的胸腺嘧啶核苷酸；**dGTP-1**，其是指同时具有可逆阻断基团
20 修饰和 **Cy3** 荧光修饰的鸟嘌呤核苷酸；以及 **dCTP-1**，其是指同时具有可逆阻断基团修饰和 **EF700** 荧光修饰的胞嘧啶核苷酸，均来自 **MGISEQ-2000RS** 高通量测序试剂盒 **MGI**。

3. 实验方法：

(a) 扫描试剂的配制

将 **Tris Base** (粉末)，**氯化钠** (粉末)，**Tween-20**，**Tris-HCl** (粉末)，三七皂苷 **R1**，奎诺二甲基丙烯酸酯，乙二胺四乙酸四钠盐二水合物，**L-二硫苏糖醇**，人参皂苷 **Rg1** 按照每组
25 实验的所需配比溶解在超纯水中。超声溶解 20 分钟，将上述试剂溶解成透明均一的溶液，经过 0.22 微米的滤膜过滤以待备用。

(b) DNA 测序方法：

测序流程：第一步，将 **DNB** 纳米球加载到准备好的测序芯片上。

30 第二步，将准备好的 **dNTP** 分子混合溶液泵入芯片用 **DNA** 聚合酶将 **dNTP** 加入到

DNA 母链的互补链上。

第三步，拍照扫描，由于 dNTP 是被修饰的带有荧光基团分子，用激光作为激发波长进行拍照。由于激光对于 DNA 有光损伤作用，因此在拍照这一步骤应用扫描试剂作为保护剂进行拍照，拍照结束后进行碱基类型的确认。

- 5
- 第四步，通过切除试剂将碱基端荧光基团和 3’的阻断切除并洗脱干净，使得 3’-OH 裸露从而进行下一轮反应。

使用MGISEQ-2000RS高通量测序试剂盒，试剂盒中#10号孔试剂作为扫描试剂的对照品，按照上述的实验流程在MGISEQ-2000RS测序平台进行PE100+70测序，简言

- 10
- 之，每次将配制好的扫描试剂作为实验组将试剂盒中#10号的扫描试剂替换作为考察对象,然后统计每个循环的Q30下降幅度,每个循环的测序错误率曲线来评估测序质量。

实验 1 评价扫描试剂组成对测序质量的影响

- 按照表 1 所示的组成配制 Base 缓冲溶液，总体积为 1L，pH 为 7.03。向 Base 缓冲液中
- 15
- 加入不同的化合物，配制扫描试剂，之后进行测序。各组测序实验所使用的扫描试剂的组成如表 2 所示，其中，三七皂苷 R1 的浓度均为 1.7 MM，Trolox 的浓度均为 8MM，EDTA-4Na 的浓度均为 10MM，L-二硫苏糖醇的浓度为 8MM。图 1 显示了扫描试剂组成对测序质量的影响。

表 1

	化合物	添加量	工作液浓度
1	Tris-Base	9.40g	0.077M
2	氯化钠	12.17g	0.200M
3	10% Tween	5.00mL	0.05%（体积比）
4	Tris-HCl	72.50g	0.4600M

表 2

20

组别	扫描试剂的组成
Base+S	Base 缓冲溶液+三七皂苷 R1
Base+S+T	Base 缓冲溶液+三七皂苷 R1+Trolox
Base+S+T+EDTA-4Na	Base 缓冲溶液+三七皂苷 R1+Trolox+乙二胺四乙酸四钠盐二水合物
Base+S+T+EDTA-4Na+D	Base 缓冲溶液+三七皂苷 R1+ Trolox+乙二胺四乙酸四钠盐二水合物+L-二硫苏糖醇

图 1 中，横坐标为测序循环反应数，纵坐标为碱基准确率大于 99.9%的概率，曲线的

中数据纵坐标值越大说明测序的质量越高，也就是趋势越往上走说明数据越好。在溶液为 **Base** 缓冲溶液的条件下，将每一个单因素实验（见实验 2-6）优化的结果叠加一起进行测试，结果发现，在优化的浓度条件下，**Base+S+T+EDTA-4Na** 的测序质量最好，一链二链 **Q30** 以及保持的时间都是最好的。

5

实验 2-6 用单因素实验考察了不同添加物的浓度对测序质量的影响，所使用的 **Base** 缓冲溶液的组成均与实施例 1 相同。

实验 2 评价三七皂苷 **R1** 的浓度对测序质量的影响

10 向 **Base** 缓冲溶液中加入不同浓度的三七皂苷 **R1** 得到扫描试剂，进行测序。各组测序实验中，使用的扫描试剂的组成如表 3 所示。

表 3

组别	扫描试剂的组成
1.70mM 三七皂苷 R1	Base 缓冲溶液+1.7mM 三七皂苷 R1
2.00mM 三七皂苷 R1	Base 缓冲溶液+2.0mM 三七皂苷 R1

图 2 显示了三七皂苷 **R1** 的浓度对测序质量的影响。从图 2 中可以看出，在三七皂苷 **R1** 的浓度为 1.70 mM 的条件下测序质量更高，二连下降缓慢。因此，三七皂苷 **R1** 的浓度为 1.70 mM 对于提高测序质量更为适宜。

15

实验 3 评价 **Trolox** 的浓度对测序质量的影响

向 **Base** 缓冲溶液中加入不同浓度的 **Trolox** 得到扫描试剂，进行测序。各组测序实验中，使用的扫描试剂的组成如表 4 所示。

表 4

组别	扫描试剂的组成
8 mM Trolox	Base 缓冲溶液+8.00 mM Trolox
10 mM Trolox	Base 缓冲溶液+10.00 mM Trolox

20

图 3 显示了 **Trolox** 的浓度对测序质量的影响。从图 3 可以看出，在 **Trolox** 浓度为 8 mM 的条件下测序质量更高，二连下降缓慢。因此，**Trolox** 的浓度为 8 mM 对于提高测序质量更为适宜。

25 实验 4 评价 **EDTA-4Na** 的浓度对测序质量的影响

向 **Base** 缓冲溶液中加入 8 mM **Trolox**、1.7mM 三七皂苷 **R1** 以及不同浓度的

EDTA-4Na 得到扫描试剂，进行测序。EDTA-4Na 的浓度分别为 0 mM，7 mM，10 mM，20 mM，30 mM，50 mM。各组测序实验中，使用的扫描试剂的组成如表 5 所示。

表 5

组别	扫描试剂的组成
0 EDTA-4Na	Base 缓冲溶液 +8.00 mM Trolox+1.70mM 三七皂苷 R1
7 mM EDTA-4Na	Base 缓冲溶液 +8.00 mM Trolox+1.70mM 三七皂苷 R1+7.00 mM EDTA-4Na
10 mM EDTA-4Na	Base 缓冲溶液 +8.00 mM Trolox+1.70mM 三七皂苷 R1+10.00 mM EDTA-4Na
20 mM EDTA-4Na	Base 缓冲溶液 +8.00 mM Trolox+1.70mM 三七皂苷 R1+20.00 mM EDTA-4Na
30 mM EDTA-4Na	Base 缓冲溶液 +8.00 mM Trolox+1.70mM 三七皂苷 R1+30.00 mM EDTA-4Na
50 mM EDTA-4Na	Base 缓冲溶液 +8.00 mM Trolox+1.70mM 三七皂苷 R1+50.00mM EDTA-4Na

图 4 显示了 EDTA-4Na 对测序质量的影响。从图 4 中可以看出，EDTA-4Na 浓度为 10 mM 的条件下测序质量更高，一链 Q30 最高，二链 Q30 下降缓慢。因此 EDTA-4Na 的浓度为 10 mM 对于提高测序质量更为适宜。

实验 5 评价 DTT 的浓度对测序质量的影响

向 Base 缓冲溶液中加入 8.00 mM Trolox、1.70mM 三七皂苷 R1 以及不同浓度的 DTT 得到扫描试剂，进行测序。DTT 的浓度分别为 0 mM，5Mm，8 mM，10 mM，20 mM。各组测序实验中，使用的扫描试剂的组成如表 6 所示。

表 6

组别	扫描试剂的组成
0 mM DTT	Base 缓冲溶液 +8.00 mM Trolox+1.7mM 三七皂苷 R1
5 mM DTT	Base 缓冲溶液 +8.00 mM Trolox+1.7mM 三七皂苷 R1+5.00 mM DTT
8 mM DTT	Base 缓冲溶液 +8.00 mM Trolox+1.7mM 三七皂苷 R1+8.00 mM DTT
10 mM DTT	Base 缓冲溶液 +8.00 mM Trolox+1.7mM 三七皂苷 R1+10.00 mM DTT
20 mM DTT	Base 缓冲溶液 +8.00mM Trolox+1.7mM 三七皂苷 R1+20.00 mM DTT

图 5 显示了 DTT 浓度对测序质量的影响。从图 5 中可以看出，DTT 的浓度为 10 mM 的条件下测序质量更高。综合一链、二链 Q30 数值，DTT 的浓度为 8 mM 对于提高测序质量更为适宜。

实验 6 评价不同浓度的人参皂苷 Rg1 测序质量的影响

以 Base+S+T+EDTA-4Na+D 溶液（Base 缓冲溶液+1.70 mM 三七皂苷 R1+ 8.00 mM Trolox+10.00 mM 乙二胺四乙酸四钠盐二水合物+8.00 mM L-二硫苏糖醇）为基础，向溶液中添加不同浓度的人参皂苷 Rg1，得到扫描试剂，进行测序。人参皂苷 Rg1 的浓度分别为 10mM，15mM，40 mM，60 mM。各组测序实验中，使用的扫描试剂的组成如表 7 所示。标准上市试剂盒中维生素 C 钠盐作为光损伤保护剂。本实验以标准试剂盒中 10#号孔位作为对照。

表 7

组别	扫描试剂的组成
10 mM 人参皂苷 Rg1	Base+S+T+EDTA-4Na+D+10.00 mM 人参皂苷 Rg1
15 mM 人参皂苷 Rg1	Base+S+T+EDTA-4Na+D+15.00 mM 人参皂苷 Rg1
40 mM 人参皂苷 Rg1	Base+S+T+EDTA-4Na+D+40.00 mM 人参皂苷 Rg1
40 mM 维生素 C 钠盐	标准试剂盒中 10#号孔位
60 mM 人参皂苷 Rg1	Base+S+T+EDTA-4Na+D+60.00 mM 人参皂苷 Rg1

图 6 显示了人参皂苷 Rg1 浓度对测序质量的影响。从图 6 中可以看出，在人参皂苷 Rg1 的浓度为 60.00 mM 的条件下，使用本发明的扫描试剂的测序质量已经超越了使用维生素 C 钠盐作为光损伤保护剂的效果，一链、二链 Q30 以及保持的时间均高于对照组维生素 C 钠盐。

结论：最终优化的扫描试剂组成如表 8 示。

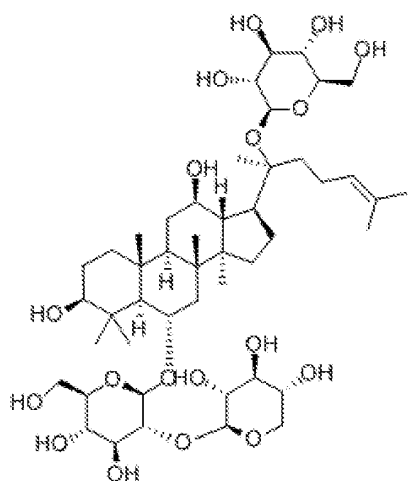
表 8

化合物	添加量	工作浓度
Tris-Base	9.40g	0.077M
氯化钠	12.17g	0.20M
10% Tween	5.00mL	0.05%（体积比）
Tris-HCl	72.50 g	0.46M
Trolox	2.00 g	8.00 mM
DTT	1.23 g	8.00 mM
EDTA-4Na	4.16 g	10.0 mM
三七皂苷 R1	1.55 g	1.70 mM
人参皂苷 Rg1	48.00 g	60.00 mM

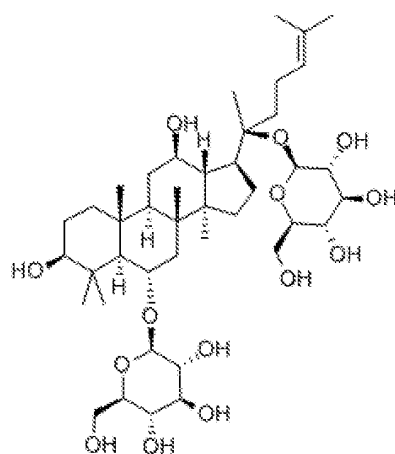
以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制，对本发明的技术方案进行修改或者等同替换，而不脱离本发明技术方案的宗旨和范围的，其均应涵盖在本发明的保护范围之内。

权 利 要 求

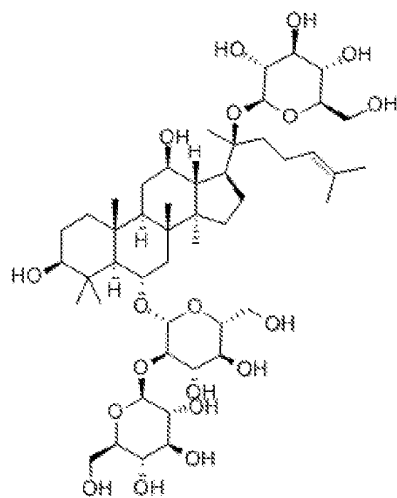
1、一种扫描试剂，其包含皂苷类化合物，以及 Tris 缓冲溶液，所述皂苷类化合物选自以下化合物中的一个或多个：



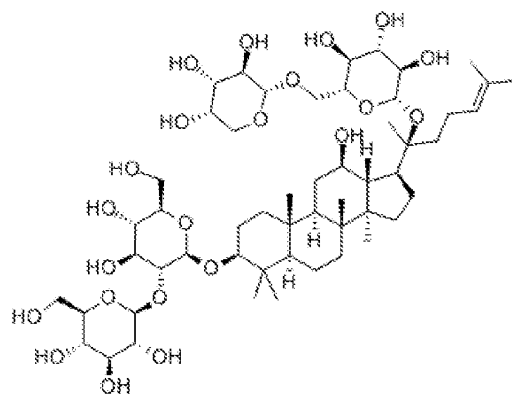
三七皂苷 R1 (Notoginsenoside R1)



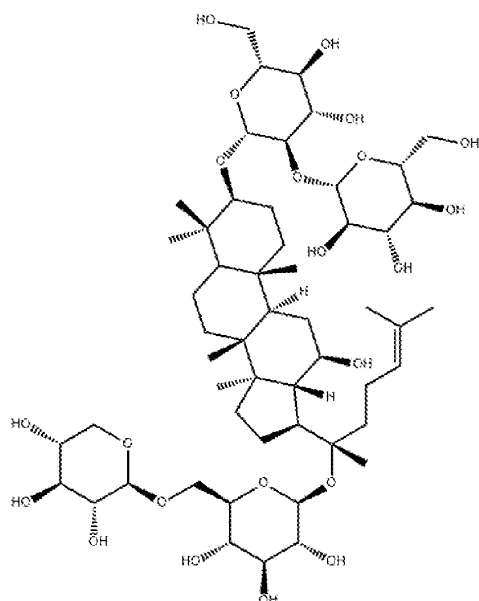
人参皂苷 Rg1



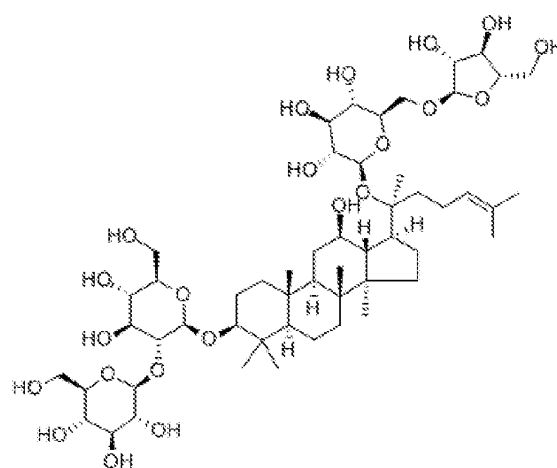
人参皂苷 Rd



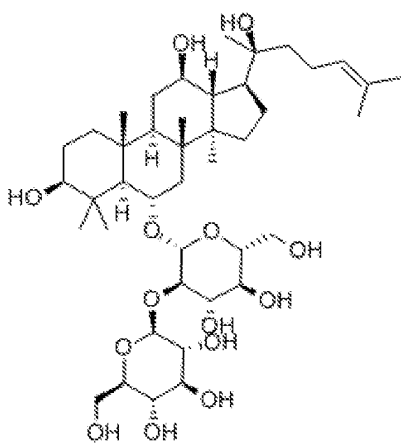
人参皂苷 Rb2



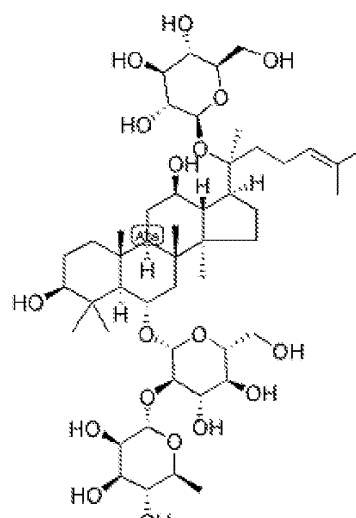
人参皂苷 Rb3 的结构式



人参皂苷 Rc



人参皂苷 Rf



人参皂苷 Re

。

2、权利要求 1 的扫描试剂，所述皂苷类化合物的浓度为 0.01-10 mM 或 10-100 mM。

3、权利要求 1 或 2 的扫描试剂，所述扫描试剂还包含其他光损伤保护剂，例如奎诺二甲基丙烯酸酯、乙二胺四乙酸四钠盐二水合物、L-二硫苏糖醇或其任意组合；

优选地，所述扫描试剂包含奎诺二甲基丙烯酸酯；

优选地，所述扫描试剂包含奎诺二甲基丙烯酸酯和乙二胺四乙酸四钠盐二水合物；

优选地，所述扫描试剂包含奎诺二甲基丙烯酸酯、乙二胺四乙酸四钠盐二水合物和

L-二硫苏糖醇；

优选地，所述扫描试剂中的奎诺二甲基丙烯酸酯、乙二胺四乙酸四钠盐二水合物或 L-二硫苏糖醇的浓度各自独立地为 5-50 mM。

4、权利要求 1-3 任一项的扫描试剂，所述扫描试剂还包含氯化钠和/或 DNA 的稳定剂（例如吐温-20）；

优选地，所述 Tris 缓冲溶液包含水，三羟甲基氨基甲烷，氯化钠，吐温-20 和三羟甲基氨基甲烷盐酸盐。

5、一种核酸测序的方法，所述方法包括使用权利要求 1-4 任一项的扫描试剂。

6、皂苷类化合物在核酸测序中作为光损伤保护剂的用途，所述皂苷类化合物选自三七皂苷 R1、人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Rd、人参皂苷 Rb2、人参皂苷 Rb3、人参皂苷 Rc、人参皂苷 Rf、人参皂苷 Re，其结构式如权利要求 1 所示。

7、一种试剂盒，所述试剂盒包含权利要求 1-4 任一项的扫描试剂。

8、权利要求 7 的试剂盒，还包含：用于将待测序的核酸分子与支持物固定的试剂；用于起始核苷酸聚合反应的引物；用于进行核苷酸聚合反应的聚合酶；一种或多种缓冲溶液；一种或多种洗涤溶液；或其任何组合。

9、权利要求 1-4 任一项的扫描试剂或权利要求 7 或 8 的试剂盒用于测定目标多核苷酸的序列的用途。

10、制备权利要求 1-4 任一项的扫描试剂的方法，包括将扫描试剂的各成分溶解在超纯水中，制成透明均一的溶液，之后对溶液进行过滤。