

在固体支持物上装载核酸分子的方法

技术领域

本申请涉及核酸检测领域。具体地，本申请涉及在固体支持物上装载核酸分子，例如
5 核酸纳米球（例如 DNA 纳米球（DNB））的方法以及用于所述方法的试剂盒。

背景技术

目前，基因芯片或 DNA 微阵列大量用于高通量测序中，它们由规则阵列载片或单纯
的一块带有 DNA 微阵列涂层的特殊玻璃片组成，在数平方厘米的面积上安装数千或数万
10 个核酸探针，在一次测验中即可提供大量基因序列相关资讯，是基因组学和遗传学研究
的重要工具。

高通量测序技术包括 DNA 和 RNA 测序，一般需要将待测的 DNA 或 RNA 样本构
建成文库，比如单链环化文库或线性文库，然后将文库直接或者是以一定的方式（比如制
备成 DNB）装载到基因芯片上进行测序，从而可一次并行对几十万到几百万条 DNA 分子
15 进行序列测定。这其中，装载技术对于测序的通量和质量都至关重要，高效和稳定的装
载技术可大幅度提高测序的通量和质量。另外，装载的 DNB 或 DNA 产生的信号是否足
够也至关重要，足够大的信噪比可以有更高的辨别率，从而便以进行信号提取，提高
测序质量。

使用 DNB 为模板进行测序或研究时，需要将 DNB 装载到对应的载体上。例如，DNB
测序一般需要将 DNB 装载到测序载片上，然后对测序载片进行上机检测。当前，一般
20 的流程为制备单链环文库，进行滚环扩增形成包含一定拷贝核酸分子的 DNB，然后将
DNB 直接装载到测序载片上，最后进行测序和数据采集分析。然而，每个 DNB 包含
的拷贝数有所差异，有的可能拷贝数较低，有的可能拷贝数又较高，从而形成了许多
大小不一的 DNB。而这些大小不一的 DNB 在装载过程中会受限于布朗/热运动和剪切
等的影响，导致大的 DNB 可能会装载到载片上两个相邻的位点（即占用两个位点），
25 小的 DNB 可能会多个同时加载在载片上同一个位点，甚至个别 DNB 可能会丢失到
溶液中，造成空载。特别的，在超高密度的载片上，上述现象表现的更为明显，这些
现象在一定程度上降低了载片的利用率，造成了数据的浪费。

在高通量测序或检测过程中，对于某些较为珍贵的样本或存在量有限的文库（如
PCRfree 文库，stLFR 文库，插入片段大的文库，肿瘤，血浆等）来说，准确加载的
30 需求就更高，不仅要考虑载片的利用率还需要考虑每个 DNB 产生的信号是否均匀，
信号是否

足够强，尤其是遇到激光功率很低的情况下，需要达到容易被探测的目的。因此，需要开发一种能够将 DNB 高效、稳定加载至载片或其他承载工具上的方法，并且加载的 DNB 能够产生足够均匀、足够强的信号以便检测。

5 发明内容

在本发明中，除非另有说明，否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且，本文中所用的实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的常规步骤。同时，为了更好地理解本发明，下面提供相关术语的定义和解释。

术语定义

10 如本文所用的，术语“核酸”可以是任何类型的核酸。例如，核酸可以是脱氧核糖核酸（DNA）、核糖核酸（RNA）或由例如核苷酸类似物制成的 DNA 或 RNA 的类似物。核酸可以是单链的、双链的或含有单链和双链序列两者。核酸分子可以来源于双链 DNA（dsDNA）形式（例如，基因组 DNA、PCR 和扩增产物等），或者可以来源于如 DNA（ssDNA）或 RNA 的单链形式。此外，核酸分子可以线性的或者环化的。在某些实施方案中，核酸
15 分子可以是单链环化的核酸分子（例如，单链环化的 DNA）。

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（近似）球形形状，其内径范围例如典型地在大约 1 nm 与大约 1000 nm 之间，例如 1-10nm，10-20nm，20-50nm，50-100nm，100-200nm，200-500nm，500-1000nm，优选地在大约 50 nm 与大约 500 nm 之间。

20 如本文所用的，术语“核酸纳米球”通常是指包含多拷贝的核酸分子的复合体或多联体。在某些典型方案中，这些核酸拷贝可以一个接一个地布置在核苷酸的连续线型链中。该串联重复结构连同核酸（例如 DNA）的单链性质看引起纳米球折叠（folding）。易于理解，核酸纳米球中的多拷贝的核酸分子各自可以包含序列已知的接头序列，以便于对其进行扩增或测序。各核酸分子的接头序列通常是相同的，但也可以不同。核酸纳米球包括但
25 不限于 DNA 纳米球（DNA nanoball），其在本文中也称为 DNB。

如本文所使用的，术语“固体支持物”意指核酸可以与其附接的任何不可溶的基底或基质，诸如例如，乳胶珠、葡聚糖珠、聚苯乙烯表面、聚丙烯表面、聚丙烯酰胺凝胶、金表面、玻璃表面、芯片和硅晶片。固体支持物的表面可以是任何所需形状，所述形状包括，例如，适合用于特定应用的平面的、球形的或多孔的。例如，固体支持物可以是平面的玻
30 璃表面。固体支持物可以是固定的，例如，被安装在流动池的内部，以允许与包含试剂的

溶液相互作用。或者，固体支持物也可以是可移动的，以便于与不同反应容器中的溶液接触。

通常，固体支持物可包含以预定模式排布的点位的阵列，其中，每一个点位各自可附接或容纳核酸分子（例如，核酸纳米球）。当附接的核酸分子（例如，核酸纳米球）的尺寸超出了单个点位能够容纳的最大尺寸或者超出了阵列中相邻点位的间距时，所述核酸分子（例如，核酸纳米球）可占据两个或更多个点位，这可导致阵列点位的使用率下降，并且可影响测序效率和测序质量。

如本文所用，术语“核酸聚合酶”具有本领域技术人员通常理解的含义，其包括 DNA 聚合酶和 RNA 聚合酶。在某些优选的实施方案中，核酸聚合酶是 DNA 聚合酶。

如本文中所使用的，术语“具有链置换活性的 DNA 聚合酶”是指一种 DNA 聚合酶，其在向下游延伸/合成核酸链的过程中，如下游存在核酸双链，则用自身新合成的核酸单链将已存在的下游核酸单链置换出去，从而将所述下游核酸单链剥离，并产生游离的单链。具有链置换活性的 DNA 聚合酶已被用于多种扩增技术中，例如，链置换扩增、滚环扩增（RCA）、多重置换扩增、环介导的等温扩增。具有链置换活性的 DNA 聚合酶包括但不限于 Bst DNA 聚合酶，phi29 DNA 聚合酶和 exo-Klenow。

如本文中所使用的，术语“phi29 DNA 聚合酶”是指一种在枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）的噬菌体 phi29 中克隆获得的具有链置换活性的 DNA 聚合酶。phi29 DNA 聚合酶用于滚环扩增时，其 C 端结构域行使聚合功能，N 端结构域行使 3' 到 5' 外切酶校读功能和链置换功能。phi29 DNA 聚合酶的具体应用可参见 Lieberman, K.R., G.M. Cherf. Processive replication of single DNA molecules in a nanopore catalyzed by phi29 DNA polymerase. J Am Chem Soc. 2010. 132(50): 17961-72。phi29 DNA 聚合酶是市售可得的，参见例如，New England Biolabs 公司，货号 M0269L。

如本文中所使用的，术语“Bst DNA 聚合酶”是指在嗜热脂肪芽孢杆菌（*Bacillus stearothermophilus*）中克隆获得的具有链置换活性的 DNA 聚合酶，其具备 5' 至 3' DNA 聚合酶活性，但不具有 5' 至 3' 外切核酸酶活性，因此没有纠错功能。Bst DNA 聚合酶是市售可得的，参见例如，New England Biolabs 公司的 Bst DNA 聚合酶系列，如 Bst1.0, Bst2.0, Bst3.0。

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。可选地，装载可以通过碱基配对杂交或其他方式发生，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; 美国专利或专利申请 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。

如本文所使用的, 术语“芯片”与“载片”具有相同的含义, 可互换使用。

如本文中所用, 术语“引物”指在合适的缓冲液中和在适当的温度下, 在合适的条件下（也即, 存在 4 种不同的核苷三磷酸和用于聚合的试剂, 如 DNA 或 RNA 聚合酶或逆转录酶时）, 能充当核酸合成的起始点的多核苷酸。因此, 引物包括与靶核酸(模板)杂交的靶结合区域。引物一般是寡核苷酸, 而且是单链的, 然而, 引物可指具有双链区段的多核苷酸（例如, 部分双链的寡核苷酸）。引物的靶结合区域的合适长度取决于引物的预期用途。短的引物分子通常需要较低的温度, 以与模板形成足够稳定的杂交复合物。引物不必反映核酸模板的确切序列, 但是必须是充分互补的, 以便与核酸模板杂交。

在第一方面, 本发明提供了一种用于在固体支持物上装载核酸分子或用于构建固定于固体支持物上的核酸文库的方法, 其包括:

- (1) 提供包含核酸分子的组合物, 以及, 固体支持物;
- (2) 对组合物中的核酸分子进行第一次扩增, 获得包含核酸分子的扩增产物;
- (3) 中止或减缓第一次扩增;
- (4) 将包含核酸分子的扩增产物装载至固体支持物; 和
- (5) 对装载至固体支持物的扩增产物中的核酸分子进行第二次扩增。

在某些实施方案中, 所述包含核酸分子的扩增产物为核酸纳米球。

在某些实施方案中, 所述固体支持物具有用于装载扩增产物（例如核酸纳米球）的点位的阵列。在某些实施方案中, 所述点位以预定的模式排布于所述固体支持物上。

在某些实施方案中, 所述核酸分子可以是任何类型的核酸。例如, 核酸分子可以是脱

氧核糖核酸(DNA)、核糖核酸(RNA)或由核苷酸类似物制成的 DNA 或 RNA 的类似物。核酸分子可以是单链的、双链的或含有单链和双链序列两者。核酸分子可以来源于双链 DNA (dsDNA) 形式(例如, 基因组 DNA、PCR 和扩增产物等), 或者可以来源于如 DNA (ssDNA) 或 RNA 的单链形式。此外, 核酸分子可以线性的或者环化的。在某些实施方案中, 核酸分子可以是单链环化的核酸分子(例如, 单链环化的 DNA)。在某些实施方案中, 所述组合物包含单链环状核酸分子。在某些实施方案中, 所述组合物包含单链环状 DNA 分子。

在某些实施方案中, 所述组合物包含一种或多种核酸分子, 例如至少 10 种, 至少 20 种, 至少 50 种, 至少 100 种, 至少 1000 种, 至少 10^4 种, 至少 10^5 种, 至少 10^6 种, 至少 10^7 种或更多种核酸分子。在某些实施方案中, 所述核酸分子是单链环化的 DNA。在某些实施方案中, 所述核酸分子含有长度为至少 100bp, 至少 200bp, 至少 500bp, 至少 800bp, 至少 1000bp, 至少 2000bp 的目的核酸片段。

在某些实施方案中, 在步骤(2)中, 所获得的扩增产物(例如核酸纳米球)的尺寸不超过预定的尺寸。在某些实施方案中, 在步骤(2)中, 所获得的扩增产物(例如核酸纳米球)是线性核酸分子, 例如线性 DNA。

在某些实施方案中, 所述预定的尺寸为所述固体支持物中单个点位能够容纳或附接的核酸分子(例如, 核酸纳米球)的最大尺寸或者所述固体支持物中相邻点位的间距。

在某些实施方案中, 所获得的核酸纳米球的尺寸不超过所述最大尺寸或者所述相邻点位的间距的 95%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20% 或 10%。

在某些实施方案中, 在步骤(2)中, 通过滚环扩增对组合物中的核酸分子进行第一次扩增。在某些实施方案中, 通过控制扩增(例如滚环扩增)的时间, 使得扩增产物(例如核酸纳米球)的尺寸不超过预定的尺寸。

在某些实施方案中, 在步骤(3)中, 通过选自以下的一种或多种方法来中止或减缓第一次扩增:

- (a) 控制或降低进行第一次扩增的反应混合物中 dNTPs 的量; 和/或
- (b) 抑制第一次扩增所使用的核酸聚合酶的活性或使所述核酸聚合酶失活。

在某些实施方案中, 通过抑制第一次扩增所使用的核酸聚合酶的活性或使所述核酸聚合酶失活来中止或减缓第一次扩增。

在某些实施方案中, 抑制第一次扩增所使用的核酸聚合酶的活性, 使核酸聚合酶的活性降低至少 40%, 至少 50%, 至少 60%, 至少 70%, 至少 80%, 至少 90%, 或至少 95%。

在某些实施方案中，通过选自以下的一种或多种方法来抑制所述核酸聚合酶的活性或使所述核酸聚合酶失活：

- (a) 添加所述核酸聚合酶的活性抑制剂或变性剂；
- (b) 去除所述核酸聚合酶发挥功能所需的辅因子；
- 5 (c) 调整进行第一次扩增的反应混合物的温度，使之偏离（例如高于或低于）所述核酸聚合酶的工作温度范围；
- (d) 调整进行第一次扩增的反应混合物的 pH 值，使之偏离（例如高于或低于）所述核酸聚合酶的工作 pH 值范围；

在某些实施方案中，所述核酸聚合酶为 DNA 聚合酶，例如具有链置换活性的 DNA 聚合酶，例如，Bst DNA 聚合酶，phi29 DNA 聚合酶和 *exo*-Klenow。

易于理解，酶（核酸聚合酶）的生物学活性及稳定性受到许多因素的影响，例如温度、pH、蛋白浓度、盐条件、溶剂或其它因素等。本领域技术人员能够根据实际需要改变这些因素，从而影响（例如降低或恢复）酶（核酸聚合酶）的活性。因此，本发明的方法可通过各种合适的手段来影响酶活性（例如，降低或恢复酶活性），而并不局限于上文描述的示例性方案或手段。例如，可通过改变核酸聚合酶的工作条件（例如，工作温度和工作 pH 值）来影响（例如降低或恢复）核酸聚合酶的活性。核酸聚合酶的合适的工作条件可由本领域技术人员容易地确定。例如，phi29 DNA 聚合酶的合适的工作条件可参见 Nelson J.R. phi29 DNA polymerase-based methods for genomics applications[J]. Journal of Clinical Ligand Assay, 2002, 25(3): 276-279，其以全部引用的方式纳入本文中。

在某些实施方案中，可通过去除所述核酸聚合酶发挥功能所需的辅因子来抑制所述核酸聚合酶的活性或使所述核酸聚合酶失活。在某些实施方案中，所述辅因子为阳离子（例如镁离子）。在某些实施方案中，通过添加阳离子螯合剂（例如镁离子螯合剂）来去除所述辅因子，从而抑制所述核酸聚合酶的活性或使所述核酸聚合酶失活。在某些实施方案中，镁离子螯合剂选自 NTA, EDTA, HEDP, EDTMPS, DTPMPA, EDDHA, STPP, 葡萄糖酸钠和偏硅酸钠。在某些实施方案中，所述螯合镁离子的试剂为 EDTA。

在某些实施方案中，可通过调整进行第一次扩增的反应混合物的温度，使之偏离（例如高于或低于）所述核酸聚合酶的工作温度范围，从而抑制所述核酸聚合酶的活性或使所述核酸聚合酶失活。在某些实施方案中，使所述反应混合物的温度高于所述核酸聚合酶的工作温度的上限，例如高至少 5℃，至少 10℃，至少 15℃或更多；或者，使所述反应混合物的温度低于所述核酸聚合酶的工作温度的下限，例如低至少 5℃，至少 10℃，至

少 15℃或更多。在某些实施方案中，使所述反应混合物的温度降至 $\leq 20^{\circ}\text{C}$ ， $\leq 10^{\circ}\text{C}$ ， $\leq 4^{\circ}\text{C}$ ，或更低的温度；或者，使所述反应混合物的温度升至 $\geq 50^{\circ}\text{C}$ ， $\geq 60^{\circ}\text{C}$ ， $\geq 70^{\circ}\text{C}$ ， $\geq 80^{\circ}\text{C}$ ，或更高的温度。

在某些实施方案中，可通过添加酸性或碱性缓冲液来调整进行第一次扩增的反应混合物的 pH 值，使之偏离（例如高于或低于）所述核酸聚合酶的工作 pH 值范围，从而抑制所述核酸聚合酶的活性或使所述核酸聚合酶失活。在某些实施方案中，使所述反应混合物的 pH 值高于所述核酸聚合酶的工作 pH 值上限，例如高至少 1 个，至少 2 个，至少 3 个或更多个 pH 单位；或者，使所述反应混合物的 pH 值低于所述核酸聚合酶的工作 pH 值下限，例如低至少 1 个，至少 2 个，至少 3 个或更多个 pH 单位。在某些实施方案中，所述酸性或碱性缓冲液选自柠檬酸盐缓冲液，磷酸盐缓冲液，乙酸盐缓冲液，碳酸盐缓冲液和 Tris 盐酸缓冲液。

在某些实施方案中，可通过添加所述核酸聚合酶的活性抑制剂或变性剂，从而抑制所述核酸聚合酶的活性或使所述核酸聚合酶失活。在某些实施方案中，所述核酸聚合酶的活性抑制剂或变性剂为表面活性剂，例如选自脱氧胆酸钠，十二烷基肌氨酸钠，十二烷基硫酸钠，Tween20，NP-40 和 Triton-100。

在某些实施方案中，可通过上述的一种或多种方式来抑制所述核酸聚合酶的活性或使所述核酸聚合酶失活。

在某些实施方案中，所述固体支持物选自乳胶珠、葡聚糖珠、聚苯乙烯表面、聚丙烯表面、聚丙烯酰胺凝胶、金表面、玻璃表面、芯片、传感器、电极和硅晶片。在某些实施方案中，所述固体支持物为平面的、球形的或多孔的。在某些实施方案中，所述固体支持物中单个点位能够容纳或附接的核酸分子（例如，核酸纳米球）的最大尺寸 $\leq 5000\text{nm}$ ， $\leq 2000\text{nm}$ ， $\leq 1000\text{nm}$ ， $\leq 700\text{nm}$ ， $\leq 500\text{nm}$ ， $\leq 300\text{nm}$ ，或 $\leq 100\text{nm}$ 。在某些实施方案中，所述固体支持物中相邻点位的间距 $\leq 5000\text{nm}$ ， $\leq 2000\text{nm}$ ， $\leq 1000\text{nm}$ ， $\leq 700\text{nm}$ ， $\leq 500\text{nm}$ ， $\leq 300\text{nm}$ ，或 $\leq 100\text{nm}$ 。

在某些实施方案中，在步骤（2）中，通过滚环扩增对组合物中的核酸分子进行第一次扩增。在某些实施方案中，在步骤（5）中，通过滚环扩增对扩增产物中的核酸分子进行第二次扩增。在某些实施方案中，第一次扩增和第二次扩增使用相同或者不相同（优选相同）的核酸聚合酶（例如 DNA 聚合酶）。

在某些实施方案中，在进行步骤（4）之前，对所述固体支持物进行预处理；例如，

使用泊洛沙姆，酶（例如，DNA 聚合酶（例如 phi29 DNA 聚合酶），T4 连接酶，BSA），或其任何组合预处理所述固体支持物。

在某些实施方案中，在步骤（5）中，第二次扩增所获得的扩增产物是线性核酸分子，例如线性 DNA。在某些实施方案中，步骤（5）所获得的产物用作核酸测序文库。在某些
5 实施方案中，在步骤（5）之后，对所述装载至固体支持物的核酸分子进行测序。

在某些实施方案中，在步骤（5）中，通过添加进行核酸扩增所需的试剂，从而对装载至固体支持物的扩增产物中的核酸分子进行第二次扩增。在某些实施方案中，所述试剂选自核酸聚合酶（例如 DNA 聚合酶），dNTPs，核酸聚合酶的工作缓冲液，及其任何组合。

10 在某些实施方案中，在步骤（5）中，通过消除步骤（3）中导致第一次扩增中止或减缓的条件，从而对装载至固体支持物的扩增产物中的核酸分子进行第二次扩增。

在某些实施方案中，在步骤（3）中，通过抑制第一次扩增所使用的核酸聚合酶的活性来中止或减缓第一次扩增，并且，在步骤（5）中，通过恢复所述核酸聚合酶活性（例如，通过消除抑制所述核酸聚合酶活性的条件）来进行第二次扩增。在某些实施方案中，
15 在步骤（5）中，所述核酸聚合酶的活性被恢复至正常活性的至少 60%，至少 70%，至少 80%，至少 90%，至少 95%或更高。

在某些实施方案中，在步骤（3）中，通过添加所述核酸聚合酶的活性抑制剂来中止或减缓第一次扩增，并且，在步骤（5）中，通过去除所述活性抑制剂来恢复所述核酸聚合酶活性，并进行第二次扩增。

20 在某些实施方案中，在步骤（3）中，通过去除所述核酸聚合酶发挥功能所需的辅因子来中止或减缓第一次扩增，并且，在步骤（5）中，通过添加所述辅因子来恢复所述核酸聚合酶活性，并进行第二次扩增。

在某些实施方案中，在步骤（3）中，通过调整反应混合物的温度使之偏离（例如高于或低于）所述核酸聚合酶的工作温度范围来中止或减缓第一次扩增，并且，在步骤（5）
25 中，通过将反应混合物的温度调整至所述核酸聚合酶的工作温度范围来恢复所述核酸聚合酶活性，并进行第二次扩增。

在某些实施方案中，在步骤（3）中，通过调整反应混合物的 pH 值使之偏离（例如高于或低于）所述核酸聚合酶的工作 pH 值范围来中止或减缓第一次扩增，并且，在步骤（5）
30 中，通过将反应混合物的 pH 值调整至所述核酸聚合酶的工作 pH 值范围来恢复所述核酸聚合酶活性，并进行第二次扩增。

在某些实施方案中，在步骤（3）中，通过使所述核酸聚合酶变性来中止或减缓第一次扩增，并且，在步骤（5）中，通过添加所述核酸聚合酶来进行第二次扩增。

在第二方面，本发明提供了一种试剂盒，其包含：用于扩增核酸的试剂，用于中止或抑制核酸扩增的试剂，和，用于将核酸分子装载至固体支持物的试剂。易于理解，所述试剂盒可用于实施如上所述的本发明的方法。例如，所述试剂盒可用于在固体支持物上装载核酸分子或用于构建固定于固体支持物上的核酸文库。

在某些实施方案中，所述用于扩增核酸的试剂可包括核酸聚合酶，核酸聚合酶的工作缓冲液（浓缩的或非浓缩的），核酸聚合酶发挥功能所需的辅因子，dNTPs，或其任何组合。在某些实施方案中，所述核酸聚合酶为 DNA 聚合酶，例如具有链置换活性的 DNA 聚合酶，例如，Bst DNA 聚合酶，phi29 DNA 聚合酶和 exo-Klenow。在某些实施方案中，所述辅因子为阳离子（例如镁离子）。在某些实施方案中，所述工作缓冲液是浓缩的。例如，所述工作缓冲液可以被浓缩至少 2 倍，至少 5 倍或至少 10 倍。

在某些实施方案中，用于中止或抑制核酸扩增的试剂可包括选自下列的一种或多种：

- （1）核酸聚合酶的活性抑制剂或变性剂；
- （2）能够去除核酸聚合酶发挥功能所需的辅因子的试剂；
- （3）能够调节溶液 pH 值的酸性或碱性缓冲液。

在某些实施方案中，用于中止或抑制核酸扩增的试剂可包括核酸聚合酶的活性抑制剂或变性剂。在某些实施方案中，所述核酸聚合酶的活性抑制剂或变性剂为表面活性剂，例如选自脱氧胆胺酸钠，十二烷基肌氨酸钠，十二烷基硫酸钠，Tween20，NP-40 和 Triton-100。

在某些实施方案中，用于中止或抑制核酸扩增的试剂可包括能够去除核酸聚合酶发挥功能所需的辅因子的试剂。在某些实施方案中，所述辅因子为阳离子（例如镁离子）。在某些实施方案中，所述能够去除核酸聚合酶发挥功能所需的辅因子的试剂为阳离子螯合剂（例如镁离子螯合剂）。在某些实施方案中，所述阳离子螯合剂（例如镁离子螯合剂）选自 NTA，EDTA，HEDP，EDTMPs，DTPMPA，EDDHA，STPP，葡萄糖钠和偏硅酸钠。在某些实施方案中，所述阳离子螯合剂（例如镁离子螯合剂）为 EDTA。

在某些实施方案中，用于中止或抑制核酸扩增的试剂可包括能够调节溶液 pH 值的酸性或碱性缓冲液。在某些实施方案中，所述酸性或碱性缓冲液选自柠檬酸盐缓冲液，磷酸盐缓冲液，乙酸盐缓冲液，碳酸盐缓冲液和 Tris 盐酸缓冲液。

在某些实施方案中，用于将核酸分子装载至固体支持物的试剂包括柠檬酸三钾，柠檬

酸, phi29 聚合酶, Pluronic F68。

在某些实施方案中,所述试剂盒还包含用于预处理固体支持物的试剂。在某些实施方案中,所述预处理固体支持物的试剂选自泊洛沙姆,酶(例如,DNA 聚合酶(例如 phi29 DNA 聚合酶),T4 连接酶,BSA),或其任何组合。

有益效果

与现有技术相比,本发明提供的在固体支持物上装载核酸纳米球(例如 DNB)的方法具有更高的加载密度与加载稳定性。同时,本发明的方法对核酸纳米球(例如 DNB)中的靶核酸分子进行了两次扩增,在载片上形成了更多拷贝的靶核酸分子,能够产生更强、更稳定的信号,利于检测。

本发明的方法可以提高高密度阵列上加载的 DNB 的质量,增加阵列位点的测序目标拷贝数,提高阵列位点的信噪比,并允许更长的读取长度,更短的成像曝光时间,以及更好的整体数据质量。这对于高通量测序是特别有利的。

附图说明

图 1 显示了将 DNB 装载在载片上的一般流程。在示例性实施方案中,使用单链环化 DNA 文库,用引物,dNTP 和 phi29 DNA 聚合酶或其他具有链置换活性的聚合酶在合适的条件下进行滚环扩增,从而获得 DNB;在滚环扩增完成后,将 DNB 直接加载到测序载片上。由于每个 DNB 包含的核酸分子的拷贝数可能存在差异(有些 DNB 包含的拷贝数高,有些 DNB 包含的拷贝数低),导致不同 DNB 的尺寸大小不一。在装载过程中,受到布朗/热运动和剪切等所产生的影响,尺寸大的 DNB 可能会加载到载片上两个或更多个相邻的位点,尺寸小的 DNB 可能会多个同时加载在载片上的同一个位点,个别 DNB 甚至可能会丢失到溶液中,造成空载。这显著影响了后续的测序结果(测序效率和测序质量)。

图 2 显示了使用本发明方法将 DNB 装载在载片上的流程。在示例性实施方案中,使用单链环化 DNA 文库,用引物,dNTP 和 phi29 DNA 聚合酶或其他具有链置换活性的聚合酶在合适的条件下进行第一次滚环扩增,从而获得 DNB。控制第一次滚环扩增的条件和时间,以得到尺寸合适的 DNB。在优选实施方案中,DNB 的尺寸不超过载片上相邻位点的间距,由此 DNB 可高效地加载至载片上,避免多个 DNB 同时加载至同一个位点,或者一个 DNB 加载到载片上两个或更多个相邻的位点。例如,当芯片的位点间距为 700nm

时,可采用不超过 20min 的滚环扩增时间;当芯片的位点间距为 500nm 时,可采用不超过 10min 的滚环扩增时间;当芯片的位点间距进一步缩小时,可采用更少的滚环扩增时间,从而得到尺寸合适的 DNB。

在进行预定时间的滚环扩增后,可使用各种方法来中止或减缓第一次滚环扩增。例如,5 可使用的方法包括但不限于:(1)在反应混合物中加入一定浓度的 EDTA,以螯合镁离子,减弱或终止 phi29 DNA 聚合酶的聚合能力,使 DNB 停止或减慢增长;(2)将反应混合物的温度调整至低温(例如 20℃以下,例如 4℃),以减弱或终止 phi29 DNA 聚合酶的聚合能力,使 DNB 停止或减慢增长;(3)将反应混合物的 pH 值调整至酸性(例如使用 pH=4.7 的柠檬酸三钾和柠檬酸混合液),以减弱或终止 phi29 DNA 聚合酶的聚合能力,使 DNB 10 停止或减慢增长。

随后,将 DNB 加载到测序载片上,然后在载片上继续进行第二次滚环扩增,以提高 DNB 包含的核酸分子拷贝数。可使用各种方法来进行第二次滚环扩增。在某些实施方案中,可通过消除抑制 phi29 DNA 聚合酶活性的条件来重启滚环扩增。例如,当在前一步骤中使用 EDTA 来螯合镁离子并减弱或终止 phi29 DNA 聚合酶的聚合能力时,可在将 DNB 15 加载到测序载片上之后,添加合适浓度的镁离子缓冲液,以恢复 phi29 DNA 聚合酶的聚合能力,使其在载片上继续进行滚环扩增。例如,当在前一步骤中利用低温(例如 20℃以下,例如 4℃)来减弱或终止 phi29 DNA 聚合酶的聚合能力时,可在将 DNB 加载到测序载片上之后,升高反应体系的温度(例如 30-37℃),以恢复 phi29 DNA 聚合酶的聚合能力,使其在载片上继续进行滚环扩增。例如,当在前一步骤中利用酸性缓冲液(例如 pH=4.7 20 的柠檬酸三钾和柠檬酸混合液)来减弱或终止 phi29 DNA 聚合酶的聚合能力时,可在将 DNB 加载到测序载片上之后,提高反应体系的 pH 值(例如使用 phi29 DNA 聚合酶的工作缓冲液或添加碱性缓冲液),以恢复 phi29 DNA 聚合酶的聚合能力,使其在载片上继续进行滚环扩增。

通过使用本发明的上述装载方案,不但有效避免了因此装载过程中所使用的 DNB 尺 25 寸不合适(例如尺寸过大)而导致的装载效率低的问题,有效地保障每个位点对应一个 DNB;而且每个位点上装载的 DNB 所包含的核酸分子拷贝数更高,产生的信号更强。由此,本发明的方法可以提高芯片(高密度阵列)各位点的 DNB 装载效率和装载质量,提高每个位点的信噪比,并允许更长的读取长度,更短的成像曝光时间,以及更好的整体数据质量。

30 图 3 显示了实验组 1 芯片、实验组 2 芯片与对照组芯片的第一个测序循环的碱基信号。

图 4 显示了对照组芯片（图 4A）与实验组 1 芯片（图 4B），实验组 2 芯片（图 4C）中相邻位点的 DNB 重复率（即，一个 DNB 在载片上占两个孔位的概率）。

具体实施方式

5 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，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。

10 本申请实施例中所使用的主要器材如下：DNBSEQ-T7RS 测序仪（购自深圳华大智造科技有限公司（MGI）），MGIDL-T7RS（购自 MGI），DNBSEQ-T7RS 芯片（700nm，购自 MGI），Qubit® 3.0 荧光定量仪（购自 thermo），PCR 仪（购自 Trobot），高速离心机（购自 eppendorf）。

本申请实施例中使用的关键试剂如下表 1 所示：

表 1. 使用的试剂

试剂名称	品牌
一链测序引物	MGI
DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂盒	MGI
DNBSEQ-T7RS 清洗试剂盒	MGI
phi29 DNA 聚合酶	MGI
DNB 快速制备试剂盒	MGI
DNBSEQ-T7RS DNB 快速加载试剂盒	MGI
25mM dNTP Mix	生工
10%Pluronic F68	Sigma
1X TE buffer	MGI
柠檬酸	Sigma
柠檬酸三钾	Sigma
10X phi29 buffer	MGI
DNA 纳米球装载缓冲液 II	MGI
大肠杆菌文库	MGI

15

实施例 1：扩增 DNB 并加载

本实施例共分为实验组 1、实验组 2 和对照组

（1）实验组 1 的实施方案如图 2 所示，具体实验过程如下所示：

1.1 第一次扩增

20 根据制造商的说明书，采用 MGIEasy™ DNA 文库制备试剂盒（深圳华大智造科技有限公司）制备插入片段主带在 300bp 的大肠杆菌单链环 DNA 文库。所使用的文库接头的

两条核酸链的序列分别为：5'-AGT CGG AGG CCA AGC GGT CTT AGG AAG ACA ATC CTT TTG TAC AAC TCC TTG GCT CAC A-3' (SEQ ID NO: 1); 和 5'-TTG TCT TCC TAA GGA ACG ACA TGG CTA CGA TCC GAC TT-3' (SEQ ID NO: 2)。然后，根据 DNB 快速制备试剂盒（深圳华大智造科技有限公司）的说明书，取 2 fmol/uL 的单链环 DNA 文库，然后加入 20 uL 的 DNB 引物混合液（其具体配方如表 2 所示），其中 RCA 引物序列为 5'-GCC ATG TCG TTC TGT GAG CCA AGG-3' (SEQ ID NO: 3)。在 PCR 仪上进行引物杂交（95℃, 1 min → 65℃, 1 min → 40℃ 1 min → 4℃, 1 min）；然后加入 40uL 的 DNA 聚合酶混合液（具体配方如表 3 所示）和 4ul 的 phi29 DNA 聚合酶（深圳华大智造科技有限公司），在 PCR 仪上进行滚环扩增（30℃, 20min）。所制备的 DNB 用于后续加载 DNBSEQ-T7 芯片（该芯片上相邻点位的间距为 700nm，单个位点能够容纳或附接的核酸纳米球的最大尺寸为 220nm）。

表 2：DNB 引物混合液

试剂名称	终浓度/体积
10X phi29 buffer	1X
RCA 引物	1uM
H ₂ O	补体积至 1ml

表 3：DNB 聚合酶混合液

试剂名称	终浓度/体积
10X phi29 buffer	1X
25mM dNTP Mix	400uM
10%Pluronic F68	1%
0.1U/ul 焦磷酸酶	0.005U
H ₂ O	补体积至 1ml

按照上述时间进行滚环扩增后，将扩增反应混合物立刻放置冰盒上，加入 8 μL 0.5mM 的 EDTA，用阔口吸头缓慢地吹打混匀 5-8 次，避免震荡及剧烈吹打。随后，取用 2μL DNB，使用 Qubit® ssDNA Assay Kit（购自 Thermo Fisher，货号 Q10212）和 Qubit® 3.0 荧光定量仪进行浓度检测。检测的结果显示，核酸浓度为 15ng/ul。通过 20min 滚环扩增，所形成的 DNB 的大小大概在 200nm 左右。根据 DNBSEQ-T7 芯片（深圳华大智造科技有限公司）的装载体积，共制备了 5 管 DNB。

20 1.2 配制 DNB 加载体系：

根据 DNBSEQ-T7RS DNB 快速加载试剂盒（深圳华大智造科技有限公司）的说明书，取上述制备的 DNB 混合液 400ul，加入 100ul 的 PBS，并用阔口吸头缓慢混匀 5-8 次。避免离心、震荡及剧烈吹打。

1.3 预处理测序载片并加载

先向芯片泵入载片预处理试剂 1（具体配方如表 4 所示），室温静置 5min，然后泵入载片预处理试剂 2（具体配方如表 5 所示），用这两个试剂预处理芯片，有助于协助 DNB 有效地加载到测序载片上。芯片预处理完成后，使用 MGIDL-T7RS 设备加入 DNB 加载体系，进行 DNB 加载。4℃加载 30min。

5

表 4：载片预处理试剂 1

试剂名称	终浓度/体积
1M 柠檬酸三钾	0.3M
1M 柠檬酸	0.3M
1X TE buffer	补至 1ml
10U/ul phi29 聚合酶	10ul

表 5：载片预处理试剂 2

试剂名称	终浓度/体积
1M 柠檬酸三钾	0.03M
1M 柠檬酸	0.03M
10%Pluronic F68	6ul
1XTE buffer	补至 1ml

1.4 第二次扩增

加载完毕后，泵入 740ul 体积的终浓度为 5mM 的镁离子和 DNB 聚合酶混合液，1ul 的 phi29 DNA 聚合酶的混合液，重新激活聚合酶，设置温度为 30℃，在测序载片上进行第二次扩增，扩增时间为 30min。扩增完毕后，获得实验组 1 测序芯片。

10

（2）实验组 2 的实施方案如图 2 所示，具体实验过程如下所示：

2.1 第一次扩增

根据制造商的说明书，采用 MGIEasy™ DNA 文库制备试剂盒（深圳华大智造科技有限公司）制备插入片段主带在 300bp 的大肠杆菌单链环 DNA 文库。所使用的文库接头的两条核酸链的序列分别为：5'-AGT CGG AGG CCA AGC GGT CTT AGG AAG ACA ATC CTT TTG TAC AAC TCC TTG GCT CAC A-3'（SEQ ID NO: 1）；和 5'-TTG TCT TCC TAA GGAACG ACA TGG CTA CGA TCC GAC TT-3'（SEQ ID NO: 2）。然后，根据 DNB 快速制备试剂盒（深圳华大智造科技有限公司）的说明书，取 2 fmol/uL 的单链环 DNA 文库，然后加入 20 uL 的 DNB 引物混合液（其具体配方如表 2 所示），其中 RCA 引物序列为 5'-GCC ATG TCG TTC TGT GAG CCA AGG-3'（SEQ ID NO: 3）。在 PCR 仪上进行引物杂交（95℃, 1 min → 65℃, 1 min → 40℃ 1 min → 4℃, 1 min）；然后加入 40uL 的 DNA 聚合酶混合液（具体配方如表 3 所示）和 4ul 的 phi29 DNA 聚合酶（深圳华大智造科技有限公司），在 PCR 仪上进行滚环扩增（30℃，20min）。所制备的 DNB 用于后续加

15

20

载 DNBSEQ-T7 芯片（该芯片上相邻点位的间距为 700nm，单个位点能够容纳或附接的核酸纳米球的最大尺寸为 220nm）。

表 2：DNB 引物混合液

试剂名称	终浓度/体积
10X phi29 buffer	1X
RCA 引物	1uM
H ₂ O	补体积至 1ml

表 3：DNB 聚合酶混合液

试剂名称	终浓度/体积
10X phi29 buffer	1X
25mM dNTP Mix	400uM
10%Pluronic F68	1%
0.1U/ul 焦磷酸酶	0.005U
H ₂ O	补体积至 1ml

5 按照上述时间进行滚环扩增后，将扩增反应混合物立刻放置冰盒上，用阔口吸头缓慢地吹打混匀 5-8 次，避免震荡及剧烈吹打。随后，取用 2μL DNB，使用 Qubit® ssDNA Assay Kit（购自 Thermo Fisher，货号 Q10212）和 Qubit® 3.0 荧光定量仪进行浓度检测。检测的结果显示，核酸浓度为 15ng/ul。通过 20min 滚环扩增，所形成的 DNB 的大小大概在 200nm 左右。根据 DNBSEQ-T7 芯片（深圳华大智造科技有限公司）的装载体积，共制备了 5 管 DNB。

2.2 配制 DNB 加载体系：

根据 DNBSEQ-T7RS DNB 快速加载试剂盒（深圳华大智造科技有限公司）的说明书，取上述制备的 DNB 混合液 500ul 置于加载 DNB 管中，并立刻放于冰上待用。

2.3 预处理测序载片并加载

15 先向芯片泵入载片预处理试剂 1（具体配方如表 4 所示），室温静置 5min，然后泵入载片预处理试剂 2（具体配方如表 5 所示），用这两个试剂预处理芯片，有助于协助 DNB 有效地加载到测序载片上。芯片预处理完成后，使用 MGIDL-T7RS 设备加入 DNB 加载体系，进行 DNB 加载。4℃加载 30min。

表 4：载片预处理试剂 1

试剂名称	终浓度/体积
1M 柠檬酸三钾	0.3M
1M 柠檬酸	0.3M
1X TE buffer	补至 1ml
10U/ul Phi29 聚合酶	10ul

表 5：载片预处理试剂 2

试剂名称	终浓度/体积
1M 柠檬酸三钾	0.03M

1M 柠檬酸	0.03M
10%Pluronic F68	6ul
1XTE buffer	补至 1ml

2.4 第二次扩增

4℃加载 30min 后，设置温度为 30℃，重新激活 phi29 酶，在测序载片上进行第二次扩增，扩增时间为 30min。扩增完毕后，获得实验组 2 测序芯片。

5 (3) 对照组的实施方案如图 1 所示，具体实验过程如下所示：

对照组所使用的样品与实验组相同，即，插入片段主带在 300bp 的大肠杆菌单链环 DNA 文库。使用与实验组相同的试剂盒和相同的方案，对样品进行滚环扩增，因测序方案对拷贝数以及测序信号的需求，对照组设置的扩增时间为 40min。扩增产物的核酸浓度为 35ng/ul，所形成的 DNB 的平均大小约为 300nm。

10 随后，使用与实验组相同的试剂盒和相同的方案，将扩增产物（DNB）加载至测序载片上，并且不再进行第二次滚环扩增（即，不进行步骤 1.4），从而获得对照组测序芯片。

实施例 2：测序

按照 DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂盒（深圳华大智造科技有限公司）和
15 DNBSEQ-T7RS 清洗试剂盒（深圳华大智造科技有限公司）的说明书，将上述实验组 1，实验组 2 和对照组获得的测序芯片放在 DNBSEQ-T7RS 测序仪上，分别进行 PE100（双末端 100bp）测序，测序过程中使用的一链测序引物（深圳华大智造科技有限公司）的序列为 5'-GC TCA CAG AAC GAC ATG GCT ACG ATC CGA CTT-3'（SEQ ID NO: 4）。

图 3 为实验组 1 芯片，实验组 2 芯片和对照组芯片在第一测序循环（cycle）的碱基信号对比结果。结果表明，实验组 1 及实验组 2 的信号高于对照组。表 6 是本发明实验组 1，
20 实验组 2 和对照组 PE100 的测序下机报告。结果表明，使用本发明方案的实验组 1 及实验组 2，总数据量（总 reads 数）及测序质量（Q30）均好于对照组。图 4 为本发明实验组 1，实验组 2 和对照组的相邻 DNB 的重复率占比情况，值越高，代表一个 DNB 占两个孔位的现象越严重。由图 4 可以看出，对照组（图 4A）的重复率（dup-rate）为 10.09%，而实
25 验组 1（图 4B）的重复率（dup-rate）为 1.14%，实验组 2（图 4C）的重复率（dup-rate）为 1.6%。结果表明，本发明方案的实验组的重复率远低于对照组。

表 6. 实施例和对照组的 PE100 的测序下机数据

	对照组	实验组 1	实验组 2
测序循环数	210	210	210

总 reads 数 (M)	4813	5355	5200
Q30	87.35	90.72	90.5
拆入率 (%)	99.01	99.01	99.00

尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述，但本领域技术人员将理解：根据已经公开的所有教导，可以对细节进行各种修改和变动，并且这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

权 利 要 求

1. 一种用于在固体支持物上装载核酸分子或用于构建固定于固体支持物上的核酸文库的方法，其包括：

- (1) 提供包含核酸分子的组合物，以及，固体支持物；
- (2) 对组合物中的核酸分子进行第一次扩增，获得包含核酸分子的扩增产物；
- (3) 中止或减缓第一次扩增；
- (4) 将包含核酸分子的扩增产物装载至固体支持物；和
- (5) 对装载至固体支持物的扩增产物中的核酸分子进行第二次扩增；

优选地，所述包含核酸分子的扩增产物为核酸纳米球；

优选地，所述固体支持物具有用于装载扩增产物（例如核酸纳米球）的点位的阵列；

优选地，所述点位以预定的模式排布于所述固体支持物上；

优选地，所述核酸分子选自脱氧核糖核酸（DNA）、核糖核酸（RNA）或 DNA 或 RNA 的类似物；

优选地，所述组合物包含单链环状核酸分子；优选地，所述组合物包含单链环状 DNA 分子；

优选地，所述组合物包含一种或多种核酸分子，例如至少 10 种，至少 20 种，至少 50 种，至少 100 种，至少 1000 种，至少 10^4 种，至少 10^5 种，至少 10^6 种，至少 10^7 种或更多种核酸分子；优选地，所述核酸分子是单链环化的 DNA；

优选地，所述核酸分子含有长度为至少 100bp，至少 200bp，至少 500bp，至少 800bp，至少 1000bp，至少 2000bp 的目的核酸片段。

2. 权利要求 1 的方法，其中，在步骤（2）中，所获得的扩增产物（例如核酸纳米球）的尺寸不超过预定的尺寸；

优选地，在步骤（2）中，所获得的扩增产物（例如核酸纳米球）是线性核酸分子，例如线性 DNA；

优选地，所述预定的尺寸为所述固体支持物中单个点位能够容纳或附接的核酸分子（例如，核酸纳米球）的最大尺寸或者所述固体支持物中相邻点位的间距；

优选地，所获得的核酸纳米球的尺寸不超过所述最大尺寸或者所述相邻点位的间距的 95%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20% 或 10%；

优选地，在步骤（2）中，通过滚环扩增对组合物中的核酸分子进行第一次扩增；

优选地，通过控制扩增（例如滚环扩增）的时间，使得扩增产物（例如核酸纳米球）的尺寸不超过预定的尺寸。

3. 权利要求 1 或 2 的方法，其中，在步骤（3）中，通过选自以下的一种或多种方法来中止或减缓第一次扩增：

（a） 控制或降低进行第一次扩增的反应混合物中 dNTPs 的量；和/或

（b） 抑制第一次扩增所使用的核酸聚合酶的活性或使所述核酸聚合酶失活；

优选地，通过抑制第一次扩增所使用的核酸聚合酶的活性或使所述核酸聚合酶失活来中止或减缓第一次扩增；

优选地，抑制第一次扩增所使用的核酸聚合酶的活性，使核酸聚合酶的活性降低至少 40%，至少 50%，至少 60%，至少 70%，至少 80%，至少 90%，或至少 95%；

优选地，通过选自以下的一种或多种方法来抑制所述核酸聚合酶的活性或使所述核酸聚合酶失活：

（a） 添加所述核酸聚合酶的活性抑制剂或变性剂；

（b） 去除所述核酸聚合酶发挥功能所需的辅因子；

（c） 调整进行第一次扩增的反应混合物的温度，使之偏离（例如高于或低于）所述核酸聚合酶的工作温度范围；

（d） 调整进行第一次扩增的反应混合物的 pH 值，使之偏离（例如高于或低于）所述核酸聚合酶的工作 pH 值范围；

优选地，所述核酸聚合酶为 DNA 聚合酶，例如具有链置换活性的 DNA 聚合酶，例如，Bst DNA 聚合酶，phi29 DNA 聚合酶和 *exo*-Klenow。

4. 权利要求 3 所述的方法，其中，通过去除所述核酸聚合酶发挥功能所需的辅因子来抑制所述核酸聚合酶的活性或使所述核酸聚合酶失活；

优选地，所述辅因子为阳离子（例如镁离子）；

优选地，通过添加阳离子螯合剂（例如镁离子螯合剂）来去除所述辅因子，从而抑制所述核酸聚合酶的活性或使所述核酸聚合酶失活；

优选地，镁离子螯合剂选自 NTA，EDTA，HEDP，EDTMPs，DTPMPA，EDDHA，STPP，葡萄糖钠和偏硅酸钠；

优选地，所述螯合镁离子的试剂为 EDTA。

5. 权利要求 3 所述的方法，其中，调整进行第一次扩增的反应混合物的温度，使之偏离（例如高于或低于）所述核酸聚合酶的工作温度范围，从而抑制所述核酸聚合酶的活性或使所述核酸聚合酶失活；

优选地，使所述反应混合物的温度高于所述核酸聚合酶的工作温度的上限，例如高至少 5℃，至少 10℃，至少 15℃ 或更多；或者，使所述反应混合物的温度低于所述核酸聚合酶的工作温度的下限，例如低至少 5℃，至少 10℃，至少 15℃ 或更多；

优选地，使所述反应混合物的温度降至 $\leq 20^{\circ}\text{C}$ ， $\leq 10^{\circ}\text{C}$ ， $\leq 4^{\circ}\text{C}$ ，或更低的温度；或者，使所述反应混合物的温度升至 $\geq 50^{\circ}\text{C}$ ， $\geq 60^{\circ}\text{C}$ ， $\geq 70^{\circ}\text{C}$ ， $\geq 80^{\circ}\text{C}$ ，或更高的温度。

6. 权利要求 3 所述的方法，其中，通过添加酸性或碱性缓冲液来调整进行第一次扩增的反应混合物的 pH 值，使之偏离（例如高于或低于）所述核酸聚合酶的工作 pH 值范围，从而抑制所述核酸聚合酶的活性或使所述核酸聚合酶失活；

优选地，使所述反应混合物的 pH 值高于所述核酸聚合酶的工作 pH 值上限，例如高至少 1 个，至少 2 个，至少 3 个或更多个 pH 单位；或者，使所述反应混合物的 pH 值低于所述核酸聚合酶的工作 pH 值下限，例如低至少 1 个，至少 2 个，至少 3 个或更多个 pH 单位；

优选地，所述酸性或碱性缓冲液选自柠檬酸盐缓冲液，磷酸盐缓冲液，乙酸盐缓冲液，碳酸盐缓冲液和 Tris 盐酸缓冲液。

7. 权利要求 3 所述的方法，其中，通过添加所述核酸聚合酶的活性抑制剂或变性剂来抑制所述核酸聚合酶的活性或使所述核酸聚合酶失活；优选地，所述核酸聚合酶的活性抑制剂或变性剂为表面活性剂，例如选自脱氧胆酸钠，十二烷基肌氨酸钠，十二烷基硫酸钠，Tween20，NP-40 和 Triton-100。

8. 权利要求 1-7 任一项的方法，其中，所述方法具有选自下列的一个或多个特征：

(a) 所述固体支持物选自乳胶珠、葡聚糖珠、聚苯乙烯表面、聚丙烯表面、聚丙烯酰胺凝胶、金表面、玻璃表面、芯片、传感器、电极和硅晶片；

(b) 所述固体支持物为平面的、球形的或多孔的；

(c) 所述固体支持物中单个点位能够容纳或附接的核酸分子（例如，核酸纳米球）的最大尺寸 $\leq 5000\text{nm}$, $\leq 2000\text{nm}$, $\leq 1000\text{nm}$, $\leq 700\text{nm}$, $\leq 500\text{nm}$, $\leq 300\text{nm}$, 或 $\leq 100\text{nm}$;

(d) 在步骤（2）中，通过滚环扩增对组合物中的核酸分子进行第一次扩增；

(e) 在步骤（5）中，通过滚环扩增对扩增产物中的核酸分子进行第二次扩增；

(f) 第一次扩增和第二次扩增使用相同或者不相同（优选相同）的核酸聚合酶（例如 DNA 聚合酶）；

(g) 在进行步骤（4）之前，对所述固体支持物进行预处理；例如，使用泊洛沙姆，酶（例如，DNA 聚合酶（例如 phi29 DNA 聚合酶），T4 连接酶，BSA），或其任何组合预处理所述固体支持物；和

(h) 在步骤（5）中，第二次扩增所获得的扩增产物是线性核酸分子，例如线性 DNA；

(i) 步骤（5）所获得的产物用作核酸测序文库；

(j) 所述方法还包括，在步骤（5）之后，对所述装载至固体支持物的核酸分子进行测序。

9. 权利要求 1-8 任一项的方法，其中，在步骤（5）中，通过添加进行核酸扩增所需的试剂，从而对装载至固体支持物的扩增产物中的核酸分子进行第二次扩增；

优选地，在步骤（5）中，所述核酸聚合酶的活性被恢复至正常活性的至少 60%，至少 70%，至少 80%，至少 90%，至少 95% 或更高；

优选地，所述试剂选自核酸聚合酶（例如 DNA 聚合酶），dNTPs，核酸聚合酶的工作缓冲液，及其任何组合。

10. 权利要求 1-8 任一项的方法，其中，在步骤（5）中，通过消除步骤（3）中导致第一次扩增中止或减缓的条件，从而对装载至固体支持物的扩增产物中的核酸分子进行第二次扩增；

优选地，在步骤（3）中，通过抑制第一次扩增所使用的核酸聚合酶的活性来中止或减缓第一次扩增，并且，在步骤（5）中，通过恢复所述核酸聚合酶活性（例如，通过消除抑制所述核酸聚合酶活性的条件）来进行第二次扩增；

例如，在步骤（3）中，通过添加所述核酸聚合酶的活性抑制剂来中止或减缓第一次扩增，并且，在步骤（5）中，通过去除所述活性抑制剂来恢复所述核酸聚合酶活性，并进行第二次扩增；

例如，在步骤（3）中，通过去除所述核酸聚合酶发挥功能所需的辅因子来中止或减缓第一次扩增，并且，在步骤（5）中，通过添加所述辅因子来恢复所述核酸聚合酶活性，并进行第二次扩增；

例如，在步骤（3）中，通过调整反应混合物的温度使之偏离（例如高于或低于）所述核酸聚合酶的工作温度范围来中止或减缓第一次扩增，并且，在步骤（5）中，通过将反应混合物的温度调整至所述核酸聚合酶的工作温度范围来恢复所述核酸聚合酶活性，并进行第二次扩增；

例如，在步骤（3）中，通过调整反应混合物的 pH 值使之偏离（例如高于或低于）所述核酸聚合酶的工作 pH 值范围来中止或减缓第一次扩增，并且，在步骤（5）中，通过将反应混合物的 pH 值调整至所述核酸聚合酶的工作 pH 值范围来恢复所述核酸聚合酶活性，并进行第二次扩增；

例如，在步骤（3）中，通过使所述核酸聚合酶变性来中止或减缓第一次扩增，并且，在步骤（5）中，通过添加所述核酸聚合酶来进行第二次扩增。

11. 一种试剂盒，其包含：用于扩增核酸的试剂，用于中止或抑制核酸扩增的试剂，和，用于将核酸分子装载至固体支持物的试剂；

优选地，所述用于扩增核酸的试剂包括核酸聚合酶，核酸聚合酶的工作缓冲液（浓缩的或非浓缩的），核酸聚合酶发挥功能所需的辅因子，dNTPs，或其任何组合；

优选地，所述核酸聚合酶为 DNA 聚合酶，例如具有链置换活性的 DNA 聚合酶，例如，**Bst DNA 聚合酶**，**phi29 DNA 聚合酶**和 **exo-Klenow**；

优选地，所述辅因子为阳离子（例如镁离子）；

优选地，所述工作缓冲液是浓缩的；例如，所述工作缓冲液被浓缩至少 2 倍，至少 5 倍或至少 10 倍；

优选地，用于中止或抑制核酸扩增的试剂可包括选自下列的一种或多种：

- （1）核酸聚合酶的活性抑制剂或变性剂；
- （2）能够去除核酸聚合酶发挥功能所需的辅因子的试剂；
- （3）能够调节溶液 pH 值的酸性或碱性缓冲液；

优选地，用于中止或抑制核酸扩增的试剂可包括核酸聚合酶的活性抑制剂或变性剂；

优选地，所述核酸聚合酶的活性抑制剂或变性剂为表面活性剂，例如选自脱氧胆酸钠，十二烷基肌氨酸钠，十二烷基硫酸钠，**Tween20**，**NP-40** 和 **Triton-100**；

优选地，用于中止或抑制核酸扩增的试剂包括能够去除核酸聚合酶发挥功能所需的辅因子的试剂；

优选地，所述辅因子为阳离子（例如镁离子）；

优选地，所述能够去除核酸聚合酶发挥功能所需的辅因子的试剂为阳离子螯合剂（例如镁离子螯合剂）；

优选地，所述阳离子螯合剂（例如镁离子螯合剂）选自 **NTA, EDTA, HEDP, EDTMPS, DTPMPA, EDDHA, STPP**，葡萄糖钠和偏硅酸钠；

优选地，所述阳离子螯合剂（例如镁离子螯合剂）为 **EDTA**；

优选地，用于中止或抑制核酸扩增的试剂包括能够调节溶液 **pH** 值的酸性或碱性缓冲液；

优选地，所述酸性或碱性缓冲液选自柠檬酸盐缓冲液，磷酸盐缓冲液，乙酸盐缓冲液，碳酸盐缓冲液和 **Tris** 盐酸缓冲液；

优选地，用于将核酸分子装载至固体支持物的试剂包括柠檬酸三钾，柠檬酸，**phi29** 聚合酶，**Pluronic F68**；

优选地，所述试剂盒还包含用于预处理固体支持物的试剂；

优选地，所述预处理固体支持物的试剂选自泊洛沙姆，酶（例如，**DNA** 聚合酶（例如 **phi29 DNA** 聚合酶），**T4** 连接酶，**BSA**），或其任何组合。