

一种基于自发光的单通道测序方法

技术领域

5 本发明涉及核酸测序领域。特别地，本发明提供了一种基于自发光的单通道测序方法，其中利用自发光的信号来分辨不同核苷酸的依次掺入，从而实现多核苷酸序列的测定。

背景技术

DNA 测序技术包括以桑格(Sanger)测序法为代表的第一代 DNA 测序技术和以
10 Illumina Hiseq2500, Roche 454, ABI Solid, BGISEQ-500 等为代表的第二代 DNA 测序技术。1977 年，桑格发明了双脱氧末端终止测序法，成为第一代测序技术的代表。2001 年，依托第一代测序技术，完成了人类基因组草图。桑格测序法具有实验操作简单、结果直观准确和实验周期短等特点，在对检测结果时效性要求很高的临床基因突变检测以及基因分型等领域有着广泛的应用。然而，桑格测序法的缺点是通量小、成本
15 高，这限制了其在大规模基因测序中的应用。为克服桑格测序法的缺点，第二代测序技术应运而生。第二代 DNA 测序技术与第一代 DNA 测序技术相比，具有测序通量大、成本低、自动化程度高和单分子测序的特点。以 Hiseq2500V2 的测序技术为例，其一个实验流程可以产生 10-200G 碱基的数据，平均每个碱基的测序成本不到桑格测序法的测序成本的 1/1000，并且所获得的测序结果可通过计算机直接进行处理和分析。
20 因此，第二代 DNA 测序技术非常适合于大规模测序。

目前已开发的第二代 DNA 测序技术主要涉及，边连接边测序 (sequencing by
ligation, SBL) 技术和边合成边测序 (sequencing by synthesis, SBS) 技术。这些测序技术的典型实例包括，Applied Biosystems 公司开发的 SOLiD 测序法，Complete
Genomics 自主开发的组合探针锚定连接法 (cPAL) 和华大基因开发的组合探针锚定
25 合成法 (cPAS)，Illumina 公司和 Solexa technology 公司合作开发的 Illumina 测序法等等。在这些测序方式中，Illumina 和 Complete Genomics 采用了检测光信号的方法，为了实现 4 种碱基 (A、T/U、C 和 G) 的鉴别和区分，通常需要使用 4 种荧光染料来分别对这 4 种碱基进行标记。在这种情况下，为了读取各个碱基携带的荧光信号，
30 测序装置必须配备至少 2 种单色激发光源和至少 2 个相机，这导致测序装置的制造成本昂贵且体积巨大。

在过去 10 多年，第二代基因测序技术已经逐步从新兴技术成长为主流的测序手段，并逐步成为临床领域的重要检测工具，在传染性疾病防御和控制、遗传病的诊断、
无创产前筛查等领域发挥着越来越大的作用。为了进一步扩大测序市场，让测序仪平民化，低成本小型化测序仪的开发逐渐成为了测序领域的发展趋势。作为二代测序技
35 术的经典手段，基于四通道，双通道以及单通道的三种测序方法各有千秋，但三者相比，单通道测序以其耗材更少，成本更低，更易实现仪器小型化便携式等优势，已逐渐成为测序领域的发展趋势。目前市场上基于单色通道的产品主要包括 ion torrent 系列的测序仪，454 测序仪以及 illumina 公司最新推出的 Iseq100。

目前基于单通道的测序技术中，ion torrent 系列的仪器因 polymer 结构测序错误
40 率高而限制了其使用范围，同样罗氏的 454 仪器也因测序准确率不够高，加上其高额的测序成本已逐渐退出了测序市场。Illumina 公司的 Iseq100 基于单色荧光技术和半导体技术，实现了小型化的测序仪，且保持了较高的测序质量。但是因其光信号通过激光器激发，仪器配置额外的激光器，增加了仪器的体积。另外为了避免激发光产生的背景值，需要对半导体芯片做特殊处理从而滤掉激发光产生的背景，这种处理将造成
45 高额的成本，增加了测序成本。

因此，本领域需要一种不需外界光源激发、无需采用额外的设计过滤激光光源产

生的背景的低成本测序方法。

发明概述

为了解决上述技术问题，本申请的发明人开发了一种新的测序方法，其使用自发光体系的信号来分辨 A、(T/U)、C 和 G 四种碱基。由此，用于实施本发明测序方法的发光信号来源于生物发光或化学发光，所以无需配置额外的激光器，也无需采用额外的设计来过滤激光光源产生的背景，降低了测序成本。用于本发明测序方法的测序装置甚至可以方便地随身携带，用于即时/现场检测。此外，本发明的测序方法中使用的脱氧核糖核苷酸 3'端羟基被修饰阻断，在测序过程中，每次反应只能合成一个脱氧核糖核苷酸，保证每次反应仅结合一个脱氧核糖核苷酸，提高了测序的准确性。

在一个方面，本发明提供了一种对核酸分子进行测序的方法，其包括以下步骤：

(1) 提供连接于支持物上的待测序的核酸分子，或者将待测序的核酸分子连接于支持物上；

(2) 添加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，以及四种化合物，从而形成含有溶液相和固相的反应体系；其中，所述四种化合物分别为核苷酸 A、(T/U)、C 和 G 的衍生物，并且具有碱基互补配对能力；并且，所述四种化合物的核糖或脱氧核糖的 3'位置处的羟基 (-OH) 被保护基团保护；并且，

第一化合物连接有第一分子标记，

第二化合物连接有第二分子标记，

第三化合物连接有第一分子标记和第二分子标记，或部分第三化合物连接有第一分子标记且另外一部分第三化合物连接有第二分子标记，

第四化合物没有连接分子标记；

(3) 使引物退火至待测序的核酸分子上，所述引物作为起始的生长的核酸链，与所述待测序的核酸分子一起形成连接于支持物上的双链体；

(4) 在允许聚合酶进行核苷酸聚合反应的条件下，使用聚合酶进行核苷酸聚合反应，从而将所述四种化合物中的一种并入生长的核酸链的 3'端；

(5) 使上一步骤中的双链体与两种不同的荧光素酶接触并进行结合反应，所述两种荧光素酶分别能够特异性结合所述第一分子标记和第二分子标记，然后使所述荧光素酶在底物存在的情况下发生荧光反应，检测发出的荧光信号；

(6) 去除各个核苷酸的分子标记；

(7) 任选地重复步骤(3)-(7)，从而获得所述核酸分子的序列信息。

在本发明的实施方案中，通过荧光素酶与核苷酸衍生物的连接，实现了待测序核苷酸的自发光检测，从而不需要额外的激发光源。在具体实施方案中，通过荧光素酶上的标记物与核苷酸衍生物上的对应的标记物的特异性结合，实现了荧光素酶与核苷酸的连接。在具体的实施方案中，第一核苷酸连接上第一荧光素酶，第二核苷酸连接上第二荧光素酶，第三核苷酸连接上第一荧光素酶和第二荧光素酶，第四核苷酸不连接任何荧光素酶。然后分别通入两种荧光素酶的对底物来检测四种碱基的发光信号；当通入第一荧光素酶的底物时，第一核苷酸和第三核苷酸发光，当通入第二荧光素酶的底物时，第二核苷酸和第三核苷酸发光，因而根据四种核苷酸的发光情况可以进行碱基的识别。

因此，在一个示例性的实施方案中，本发明的对核酸分子进行测序的方法包括以下步骤：

(1) 提供连接于支持物上的待测序的核酸分子，或者将待测序的核酸分子连接于支持物上；

(2) 添加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，

以及四种化合物，从而形成含有溶液相和固相的反应体系；其中，所述四种化合物分别为核苷酸 A、(T/U)、C 和 G 的衍生物，并且具有碱基互补配对能力；并且，所述四种化合物的核糖或脱氧核糖的 3'位置处的羟基 (-OH) 被保护基团保护；并且，

- 5 第一化合物连接有第一分子标记，
- 第二化合物连接有第二分子标记，
- 第三化合物连接有第一分子标记和第二分子标记，或部分第三化合物连接有第一分子标记且另外一部分第三化合物连接有第二分子标记，
- 第四化合物没有连接分子标记；
- (3) 使引物退火至待测序的核酸分子上，所述引物作为起始的生长的核酸链，与
- 10 所述待测序的核酸分子一起形成连接于支持物上的双链体；
- (4) 在允许聚合酶进行核苷酸聚合反应的条件下，使用聚合酶进行核苷酸聚合反应，从而将所述四种化合物中的一种并入生长的核酸链的 3'端；
- (5) 移除前一步骤的反应体系的溶液相，保留连接于支持物上的双链体，并加入两种不同的荧光素酶，进行结合反应，所述两种荧光素酶分别能够特异性结合所述第
- 15 一分子标记和第二分子标记；
- (6) 用洗脱缓冲液去除未结合的荧光素酶；
- (7) 加入第一荧光素酶的底物，同时检测荧光信号；
- (8) 移除上一步反应的溶液；
- (9) 加入第二荧光素酶的底物，同时检测荧光信号；
- 20 (10) 移除上一步反应的溶液；
- (11) 去除各个核苷酸的分子标记和 3'保护基团；
- (12) 任选地移除上一步反应的溶液；
- (13) 任选地重复步骤(3)-(12)，从而获得所述核酸分子的序列信息。

- 25 在具体的实施方案中，两种荧光素酶与核苷酸的连接也可以分开进行，例如可以先加入经第一标记的第一荧光素酶，使其与经第一分子标记的核苷酸进行结合反应，然后用洗脱缓冲液去除未结合的第一荧光素酶，加入第一荧光素酶的底物，同时检测荧光信号；然后再加入经第二标记的第二荧光素酶，使其与经第二分子标记的核苷酸进行结合反应，然后用洗脱缓冲液去除未结合的第二荧光素酶，加入第二荧光素酶的
- 30 底物，同时检测荧光信号。具体而言，本发明提供了一种对核酸分子进行测序的方法，其包括以下步骤：

- (1) 提供连接于支持物上的待测序的核酸分子，或者将待测序的核酸分子连接于支持物上；
- (2) 添加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，
- 35 以及四种化合物，从而形成含有溶液相和固相的反应体系；其中，所述四种化合物分别为核苷酸 A、(T/U)、C 和 G 的衍生物，并且具有碱基互补配对能力；并且，所述四种化合物的核糖或脱氧核糖的 3'位置处的羟基 (-OH) 被保护基团保护；并且，
- 第一化合物连接有第一分子标记，
- 第二化合物连接有第二分子标记，
- 40 第三化合物连接有第一分子标记和第二分子标记，或部分第三化合物连接有第一分子标记且另外一部分第三化合物连接有第二分子标记，
- 第四化合物没有连接分子标记；
- (3) 使引物退火至待测序的核酸分子上，所述引物作为起始的生长的核酸链，与
- 所述待测序的核酸分子一起形成连接于支持物上的双链体；
- 45 (4) 在允许聚合酶进行核苷酸聚合反应的条件下，使用聚合酶进行核苷酸聚合反应，从而将所述四种化合物中的一种并入生长的核酸链的 3'端；

(5) 移除前一步骤的反应体系的溶液相，保留连接于支持物上的双链体，并加入第一荧光素酶，进行结合反应，所述第一荧光素酶能够特异性结合所述第一分子标记；

(6) 用洗脱缓冲液去除未结合的第一荧光素酶；

(7) 加入第一荧光素酶的底物，同时检测荧光信号；

5 (8) 移除上一步反应的溶液；

(9) 加入第二荧光素酶，进行结合反应，所述第二荧光素酶能够特异性结合所述第二分子标记；

(10) 用洗脱缓冲液去除未结合的第二荧光素酶；

(11) 加入第二荧光素酶的底物，同时检测荧光信号；

10 (12) 移除上一步反应的溶液；

(13) 任选地去除各个核苷酸的分子标记和 3' 保护基团；

(14) 任选地重复步骤(3)-(13)或(3)-(11)一次或多次，从而获得所述核酸分子的序列信息。

15 在具体的实施方案中，两种荧光素酶可以相同，其分别能够特异性结合所述第一分子标记和第二分子标记，即仅使用一种荧光素酶和底物，经第一标记的第一荧光素酶和经第二标记的第二荧光素酶与核苷酸的连接分开进行。例如可以先加入经第一标记的第一荧光素酶，使其与经第一分子标记的核苷酸进行结合反应，然后用洗脱缓冲液去除未结合的第一荧光素酶，加入荧光素酶的底物，同时检测荧光信号；然后再加入经第二标记的第二荧光素酶，使其与经第二分子标记的核苷酸进行结合反应，然后用洗脱缓冲液去除未结合的第二荧光素酶，加入荧光素酶的底物，同时检测荧光信号。具体而言，本发明提供了一种对核酸分子进行测序的方法，其包括以下步骤：

(1) 提供连接于支持物上的待测序的核酸分子，或者将待测序的核酸分子连接于支持物上；

25 (2) 添加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，以及四种化合物，从而形成含有溶液相和固相的反应体系；其中，所述四种化合物分别为核苷酸 A、(T/U)、C 和 G 的衍生物，并且具有碱基互补配对能力；并且，所述四种化合物的核糖或脱氧核糖的 3' 位置处的羟基 (-OH) 被保护基团保护；并且，

第一化合物连接有第一分子标记，

30 第二化合物连接有第二分子标记，

第三化合物连接有第一分子标记和第二分子标记，或部分第三化合物连接有第一分子标记且另外一部分第三化合物连接有第二分子标记，

第四化合物没有连接分子标记；

35 (3) 使引物退火至待测序的核酸分子上，所述引物作为起始的生长的核酸链，与所述待测序的核酸分子一起形成连接于支持物上的双链体；

(4) 在允许聚合酶进行核苷酸聚合反应的条件下，使用聚合酶进行核苷酸聚合反应，从而将所述四种化合物中的一种并入生长的核酸链的 3' 端；

(5) 移除前一步骤的反应体系的溶液相，保留连接于支持物上的双链体，并加入第一荧光素酶，进行结合反应，所述第一荧光素酶能够特异性结合所述第一分子标记；

40 (6) 用洗脱缓冲液去除未结合的第一荧光素酶；

(7) 加入荧光素酶的底物，同时检测荧光信号；

(8) 移除上一步反应的溶液；

(9) 加入使荧光素酶变性的试剂；

(10) 移除上一步反应的溶液；

45 (11) 加入第二荧光素酶，进行结合反应，所述第二荧光素酶能够特异性结合所述第二分子标记；

- (12) 用洗脱缓冲液去除未结合的第二荧光素酶；
(13) 加入荧光素酶的底物，同时检测荧光信号；
(14) 任选地移除上一步反应的溶液；
(15) 任选地去除各个核苷酸的分子标记和 3'保护基团；
5 (16) 任选地重复步骤(3)-(15)或(3)-(13)一次或多次，从而获得所述核酸分子的序列信息。

在另一个方面，本发明还涉及用于对多核苷酸进行测序的试剂盒，其包含：

- (a) 四种化合物，所述四种化合物分别为核苷酸 A、(T/U)、C 和 G 的衍生物，并且具有碱基互补配对能力；并且，所述四种化合物的核糖或脱氧核糖的 3'位置处的羟基(-OH)被保护基团保护；并且，
10 第一化合物连接有第一分子标记，
第二化合物连接有第二分子标记，
第三化合物连接有第一分子标记和第二分子标记，或部分第三化合物连接有第一分子标记且另外一部分第三化合物连接有第二分子标记，
15 第四化合物没有连接分子标记；和
(b) 两种荧光素酶，两种荧光素酶分别能够特异性结合所述第一分子标记和第二分子标记，两种荧光素酶可以相同或不同。

- 在某些优选的实施方案中，本发明的试剂盒还包含：用于从样品中提取核酸分子的试剂和/或装置；用于预处理核酸分子的试剂；用于连接待测序的核酸分子的支持物；
20 用于将待测序的核酸分子与支持物连接（例如，共价或非共价连接）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。

25 发明详述

- 除非另外定义，否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。本文提及的所有专利、申请和其他出版物均通过引用整体并入本文。如果本文中提出的定义与通过引用并入本文的专利、申请和其他出版物中所述的定义相抵触或不一致，则以本文所述的定义为准。
30

- 如本文所用，术语“多核苷酸”是指脱氧核糖核酸(DNA)、核糖核酸(RNA)或其类似物。多核苷酸可以是单链的、双链的或含有单链和双链序列两者。多核苷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)，或者可以来源于单链形式的 DNA(ssDNA)或 RNA 并且其可以转化为 dsDNA 形式，并且反之亦然。多核苷酸分子的准确序列可以是已知的或未知的。以下是多核苷酸的示例性实例：基因或基因片段(例如，探针、引物、EST 或 SAGE 标签)、基因组 DNA、基因组 DNA 片段、外显子、内含子、信使 RNA(mRNA)、转运 RNA、核糖体 RNA、核糖酶、cDNA、重组多核苷酸、合成多核苷酸、分枝多核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离的 DNA、任何序列的分离的 RNA、任何上述序列的核酸探针、引物或扩增拷贝。
35

- 多核苷酸可以包括核苷酸或核苷酸类似物。核苷酸通常含有糖(如核糖或脱氧核糖)、碱基和至少一个磷酸基。核苷酸可以是无碱基的(即，缺少碱基)。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)、
45 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)、脱氧胸苷三磷酸(dTTP)、去氧胞二磷(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碱基包括(例如)肌苷、黄嘌呤(xanthine)、次黄嘌呤(hypoxanthine)、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'-磷酸硫酸。

通常而言,核苷酸包括核苷酸 A、C、G、T 或 U。如本文所用,术语“核苷酸 A”是指含有腺嘌呤(A)或其修饰物或类似物的核苷酸,例如 ATP、dATP。“核苷酸 G”是指含有鸟嘌呤(G)或其修饰物或类似物的核苷酸,例如 GTP、dGTP。“核苷酸 C”是指含有胞嘧啶(C)或其修饰物或类似物的核苷酸,例如 CTP、dCTP。“核苷酸 T”是指含有胸腺嘧啶(T)或其修饰物或类似物的核苷酸,例如 TTP、dTTP。“核苷酸 U”是指含有尿嘧啶(U)或其修饰物或类似物的核苷酸,例如 UTP、dUTP。

核苷酸的标记

本发明涉及用不同的标记物单独或组合地标记核苷酸,从而使得可以在核苷酸上连接不同的荧光素酶。如本文所用,用于标记核苷酸的所述分子标记和与其特异性结合的标记可以是任何能够彼此特异性结合的分子配对。配对成员之间的特异性结合实现核苷酸与荧光素酶的连接。示例性的配对成员包括但不限于:(a)与相应抗体或其结合部分或片段组合的半抗原或抗原性化合物,例如地高辛-地高辛抗体, N3G-N3G 抗体, FITC-FITC 抗体;(b)核酸适配体和蛋白质;(c)非免疫结合对(例如生物素-抗生物素蛋白、生物素-链霉亲和素、生物素-中性抗生蛋白);(d)激素-激素结合蛋白;(e)受体-受体激动剂或拮抗剂;(f)凝集素-碳水化合物;(g)酶-酶辅因子;(h)酶-酶抑制剂;和(i)能够形成核酸双链体的互补的寡核苷酸或多核苷酸对。

在具体的实施方案中,所述第一分子标记和第二分子标记是小分子标记物,其选自生物素、地高辛、N3G 或 FITC。两种荧光素酶分别能够特异性结合所述第一分子标记和第二分子标记。例如,在一个具体实施方案中,第一分子标记是生物素,则第一荧光素酶可以是经链霉亲和素标记的荧光素酶;第二分子标记是地高辛,则第二荧光素酶可以是经地高辛抗体标记的与所述第一荧光素酶不同的荧光素酶,第二荧光素酶也可以是经地高辛抗体标记的与第一荧光素酶相同的荧光素酶。所述荧光素酶来源包括但不限于 firefly, gaussia, Renilla 等生物。例如,经链霉亲和素标记的荧光素酶可以是 Adivity 公司的 SA-Gluc: Streptavidin-Gaussia princeps luciferase。经地高辛抗体标记的荧光素酶可以是 digoxin 抗体-Gluc 或 digoxin 抗体-Nluc。

如本文中所使用,表述“第一化合物连接有第一分子标记”是指全部第一化合物都连接有第一分子标记,或者部分第一化合物连接有第一分子标记但其余第一化合物没有连接分子标记。同理,表述“第二化合物连接有第二分子标记”是指全部第二化合物都连接有第二分子标记,或者部分第二化合物连接有第二分子标记但其余第二化合物没有连接分子标记。表述“第三化合物连接有第一分子标记和第二分子标记”是指全部

第三化合物都连接有第一分子标记和第二分子标记，或者部分第三化合物连接有第一分子标记和第二分子标记但其余第三化合物没有连接分子标记。

多核苷酸的测序

5 优选地，本发明的连接有不同的荧光素酶的核苷酸适用于合成法测序。如本文所用的合成法测序是本领域熟知的各种合成法测序方法。基本地，合成法测序涉及首先将被测序的核酸分子与测序引物杂交，随后在聚合酶的存在下，以被测序的核酸分子为模板在测序引物的3'端聚合如本文所述的连接有不同荧光素酶的核苷酸。聚合之后，通过检测所述荧光素酶发出的荧光信号来鉴定核苷酸。在从经标记的核苷酸上除去荧光素酶之后，进行下一个聚合测序循环。

10 用于测定靶多核苷酸序列的方法可以这样进行：使靶多核苷酸序列变性，使靶多核苷酸分别与不同的核苷酸接触，以便形成所述靶核苷酸的互补体，并且检测所述核苷酸的掺入。所述方法利用了聚合，使得聚合酶通过掺入互补于所述靶的正确的核苷酸，以延伸所述互补链。所述聚合反应还需要特殊引物来启动聚合作用。

15 对每一轮反应来说，所述核苷酸的掺入是通过聚合酶进行的，并随后测定所述掺入事件。存在很多不同的聚合酶，并且对本领域普通技术人员来说容易确定最适合的聚合酶。优选的酶包括 DNA 聚合酶 I、Klenow 片段、DNA 聚合酶 III、T4 或 T7 DNA 聚合酶、Taq 聚合酶或 vent 聚合酶。还可以使用通过工程方法改造成具有特定性质的聚合酶。

20 所述测序方法优选对排列在固体支持物上的靶多核苷酸进行。可以通过接头分子将多个靶多核苷酸固定在所述固体支持物上，或者可以连接在诸如微球体的颗粒上，所述颗粒还可以连接在固体支持材料上。

25 可以通过多种方法将所述多核苷酸连接在所述固体支持物上，包括使用生物素-链霉素亲和素相互作用。用于将多核苷酸固定在固体支持物上的方法为本领域所公知，并且包括石板印刷技术以及将每一种多核苷酸点样在固体支持物的特定位置上。合适的固体支持物为本领域所公知，并且包括玻璃载玻片和珠、陶瓷和硅表面和塑料材料。所述支持物通常是平面，尽管也可以使用微珠(微球体)，并且还可以通过已知方法将后者连接在其他固体支持物上。所述微球体可以具有任何合适的大小，其直径通常为 10-100 纳米。在优选实施方案中，将所述多核苷酸直接连接在平面上，优选连接在平的玻璃表面上。连接优选通过共价键的形式进行。所使用的阵列优选是单分子阵列，30 它包括位于独特的光学可分辨区域的多核苷酸，例如在国际申请号 WO00/06770 中所描述的。

进行聚合的必须条件对本领域技术人员来说是熟知的。为了进行所述聚合酶反应，通常首先必须使引物序列与所述靶多核苷酸退火，所述引物序列是由所述聚合酶识别的，并且起着所述互补链随后延伸的起始位点的作用。所述引物序列可以相对所述靶多核苷酸作为独立的成分添加。另外，所述引物和靶多核苷酸可以分别是一个单链分子的一部分，由所述引物部分与所述靶的一部分形成分子内双链体，即发卡环结构。可以在所述分子的任何位点，将该结构固定在所述固体支持物上。进行所述聚合酶反应所必需的其他条件，对本领域技术人员来说是熟知的，这些条件包括温度、pH、缓冲液组成。

40 随后，使本发明的经标记的核苷酸与所述靶多核苷酸接触，以便能够进行聚合。所述核苷酸可以依次添加，即分别添加每一种类型的核苷酸(A, C, G 或 T/U)，或同时添加。

使所述聚合步骤进行足以掺入一个核苷酸的时间。

45 然后除去未掺入的核苷酸，例如，通过移除前一步骤的反应体系的溶液相，保留连接于支持物上的双链体。

随后可以加入含有不同荧光素酶两种荧光素酶，进行结合反应，所述两种荧光

素酶分别能够特异性结合用于标记核苷酸的分子标记，由此实现荧光素酶与掺入的核苷酸的连接。然后通过加入对应的荧光素酶的底物并检测荧光信号而实现掺入的核苷酸的鉴别。也可以加入含有相同荧光素酶

5 的两种荧光素酶，进行结合反应，所述荧光素酶分别能够特异性结合用于标记核苷酸的分子标记，由此实现荧光素酶与掺入的核苷酸的连接。然后通过加入对应的荧光素酶的底物并检测荧光信号而实现掺入的核苷酸的鉴别。

在一个具体实施方案中，四种脱氧核糖核苷酸类似物分别被标记了不同的小分子标记物生物素（简称 B）和地高辛（简称 D），例如核苷酸 A 标记 B，核苷酸 C 标记 B 和 D，核苷酸 T 标记 D，核苷酸 G 不做标记。上述被标记不同小分子的四种脱氧核糖核苷酸类似物的 3'端羟基均作阻断处理，保证每次测序反应仅结合一个脱氧核糖核苷酸。测序反应过程中，先通入所述四种经标记的脱氧核糖核苷酸类似物及测序聚合酶混合物，在聚合酶的作用下，按照碱基互补配对原则，一个脱氧核糖核苷酸类似物掺入到生长的核酸链的 3'端。通过移除前一步骤的反应体系的溶液相，保留连接于支持物上的双链体，可去除未结合的脱氧核糖核苷酸类似物。然后，加入含有不同荧光素酶的两种荧光素酶，第一荧光素酶经链霉亲和素标记，其与标记了小分子 B 的核苷酸 A 或核苷酸 C 结合，第二荧光素酶经地高辛抗体标记，其与标记了小分子 D 的核苷酸 C 或核苷酸 T 结合。使用洗脱缓冲液去除未结合的荧光素酶之后，加入第一荧光素酶的底物，连接有第一荧光素酶的核苷酸发光，采用检测器检测信号；加入第二荧光素酶的底物，连接有第二荧光素酶的核苷酸发光，采用检测器检测信号，由此得出下表所示的发光情况，即可进行碱基的识别。

10 15 20

	first detection	second detection
A	1	0
C	1	1
G	0	0
T	0	1

在一个具体实施方案中，含有不同荧光素酶的两种荧光素酶与经标记的核苷酸的连接以及信号检测可以分开进行。先加入第一荧光素酶，其经链霉亲和素标记，与标记了小分子 B 的核苷酸 A 或核苷酸 C 结合。使用洗脱缓冲液去除未结合的第一荧光素酶之后，加入第一荧光素酶的底物，连接有第一荧光素酶的核苷酸发光，采用检测器检测信号。移除反应溶液后加入经地高辛抗体标记的第二荧光素酶，其与标记了小分子 D 的核苷酸 C 或核苷酸 T 结合，然后用洗脱缓冲液去除未结合的第二荧光素酶，加入第二荧光素酶的底物，连接有第二荧光素酶的碱基发光，采用检测器检测信号，由此得出上表所示的发光情况，即可进行碱基的识别。

25 30

在另一个具体实施方案中，含有相同荧光素酶的两种荧光素酶与经标记的核苷酸的连接以及信号检测分开进行。先加入第一荧光素酶，其经链霉亲和素标记，与标记了小分子 B 的核苷酸 A 或核苷酸 C 结合。使用洗脱缓冲液去除未结合的第一荧光素酶之后，加入荧光素酶的底物，连接有第一荧光素酶的核苷酸发光，采用检测器检测信号。然后加入使第一荧光素酶变性的试剂，移除反应溶液后加入经地高辛抗体标记的第二荧光素酶，其与标记了小分子 D 的核苷酸 C 或核苷酸 T 结合，然后用洗脱缓冲液去除未结合的第二荧光素酶，加入荧光素酶的底物，连接有第二荧光素酶的碱基发光，采用检测器检测信号，由此得出上表所示的发光情况，即可进行碱基的识别。

35 40

荧光信号的检测

检测荧光信号的方式是本领域熟知的。例如，可以通过检测荧光的波长的装置来

实现。这样的装置是本领域熟知的。例如，这样的装置可以是共焦扫描显微镜，其用激光扫描固体支持物的表面，以便使直接结合被测序的核酸分子上的荧光团成像。另外，可以例如用灵敏的 2-D 探测器，如电荷偶连的探测器(CCD)观察所产生的每一种信号。还可以例如使用诸如扫描近场光学显微方法(SNOM)的其他技术。

5 标记物的去除

在检测之后，可以用合适条件除去核苷酸上的标记。

在具体的实施方案中，本发明的经标记的核苷酸还具有 3'保护基团。在本发明的一些实施方案中，保护基团和标记物通常是 3'阻断的经标记的核苷酸上的两种不同的基团，但在另一些实施方案中，保护基团和标记物也可以是同一基团。

10 如本文所用，术语“保护基团”意指这样的基团，其阻止聚合酶（其将含有该基团的核苷酸掺入到正在合成的多核苷酸链上的）在将含有该基团的核苷酸掺入到正在合成的多核苷酸链上后继续催化另一核苷酸的掺入。这样的保护基团在本文中也称为 3'-OH 保护基团。包含这样的保护基团的核苷酸在本文中也称为 3'阻断的核苷酸。保护基团可以是能够被添加到核苷酸上任何合适的基团，只要该保护基团能防止另外的核苷酸分子被加入至多核苷酸链中且同时在不破坏该多核苷酸链的情况下易于从核苷酸的糖部分除去。此外，经保护基团修饰的核苷酸需要耐受聚合酶或用于将该修饰的核苷酸掺入多核苷酸链内的其他适合的酶。因此，理想的保护基团表现出长期的稳定性，可被聚合酶高效地掺入，阻止核苷酸的二次掺入或进一步掺入，并且能够在不破坏多核苷酸结构的温和条件下优选地在水性条件下被除去。

20 现有技术已描述了多种符合上述描述的保护基团。例如，WO 91/06678 公开 3'-OH 保护基团包括酯和醚，-F，-NH₂，-OCH₃，-N₃，-OPO₃，-NHCOCH₃，2 硝基苯碳酸酯，2,4- 次磺酰二硝基和四氢呋喃醚。Metzker 等人(Nucleic Acids Research, 22(20):4259-4267, 1994)公开了八种 3'-修饰的 2-脱氧核糖核苷 5'-三磷酸酯(3'-修饰的 dNTP)的合成和应用。WO2002/029003 描述了在聚合酶反应中使用烯丙基保护基团对 DNA 生长链上的 3'-OH 基团加帽。优选地，可以使用国际申请公开 WO2014139596 和 WO2004/018497 中报导的各种保护基团，包括例如 WO2014139596 的图 1A 中示例的那些保护基团和权利要求书中限定的那些 3'羟基保护基（即保护基团），和例如 WO2004/018497 的图 3 和 4 中示例的那些保护基团和权利要求书中限定的那些保护基团。上述参考文献均通过引用整体并入本文。

30 本领域技术人员将会理解如何将合适的保护基团连接在核糖环上，以便阻断与 3'-OH 的相互作用。所述保护基团可以直接连接在 3'位置上，或者可以连接在 2'位置上(所述保护基团具有足够的大小或电荷，以便阻断 3'位置上的相互作用)。另外，所述保护基团可以连接在 3'和 2'位置，并且可以被裂解，以便暴露出 3'-OH 基团。

35 在成功地将 3'阻断的核苷酸掺入生长的核酸链后，测序方案需要除去保护基团以产生用于连续链合成的可用的 3'-OH 位点。如本文所用的可从经修饰的核苷酸上除去保护基团的试剂在很大程度上取决于所使用的保护基团。例如，从 3'羟基官能团除去酯保护基团通常通过碱水解来实现。除去保护基团的容易程度差异很大；通常，羰基碳上取代基的电负性越大，除去的容易度越大。例如，高电负性的三氟乙酸基团在甲醇中在 pH7 下能够从 3'羟基快速裂解（Cramer 等人，1963），因此其在该 pH 下的聚合期间是不稳定的。苯氧基乙酸酯基团在少于 1 分钟内裂解，但是需要显著更高的 pH，例如用 NH₄+/甲醇实现（Reese 和 Steward，1968）。使用除碱水解以外的化学方法可以选择性地切割各种各样的羟基保护基团。通过用亲核试剂例如苯硫酚和硫代硫酸盐处理可迅速裂解 2,4-二硝基苯硫基（Letsinger 等，1964）。烯丙基醚通过用丙酮/水中的 Hg（II）处理而裂解（Gigg and Warren，1968）。使用 Ag（I）或 Hg（II）在中性条件下除去四氢噻喃基醚（Cohen and Steele，1966; Cruse 等人，1978）。光化学去阻断可以与可光化学裂解的保护基团一起使用。有几种保护基团可用于这种方

法。使用邻硝基苄醚作为核糖核苷的 2'-羟基官能性的保护基团是已知且被证明的 (Ohtsuka 等, 1978); 其通过在 260nm 的照射进行除去。碳酸烷基邻硝基苄基碳酸酯保护基也通过在 pH7 的照射下被除去 (Cama and Christensen, 1978)。3'-OH 保护基团的酶解解阻断也是可能的。已经证明 T4 多核苷酸激酶可以将 3'-磷酸酯末端转化成 3'-羟基末端, 然后可以用作 DNA 聚合酶 I 的引物 (Henner 等, 1983)。该 3'-磷酸酶活性用于除去含有磷酸酯作为保护基团的那些 dNTP 类似物的 3'保护基团。

可从 3'阻断的核苷酸上除去保护基团的其它试剂包括例如膦(例如三(羟甲基)膦 (THP)), 其可以例如将含叠氮化物的 3'-OH 保护基团从核苷酸上除去(关于膦的此应用可参见例如 WO2014139596 中的记载, 其全部内容通过引用并入本文)。可从 3'阻断的核苷酸上除去保护基团的其它试剂还包括例如 WO2004/018497 的说明书中第 114-116 页描述的用于除去作为 3'-OH 保护基团的 3'-烯丙基、3,4-二甲氧基苄氧基甲基或氟甲氧基的相应试剂。

在本发明的实施方案中, 核苷酸的标记物优选在检测后与保护基团一起被除去。

在某些实施方案中, 标记物可以被掺入保护基团, 从而允许在将 3'阻断的核苷酸掺入核酸链后其能够与保护基团一起被除去。

在其他实施方案中, 标记物可以利用连接基团与保护基团分开地连接在核苷酸上。这样的标记物可以例如连接到核苷酸的嘌呤或嘧啶碱基上。在某些实施方案中, 所用的连接基团是可裂解的。可裂解的连接基团的使用能确保所述标记可以在检测之后除去, 这避免了与后续掺入的任何经标记的核苷酸的任何信号干扰。在另一些实施方案中, 可以使用不可裂解的连接基团, 因为在经标记的核苷酸掺入核酸链之后, 不需要后续的核苷酸掺入, 因此不需要将标记从核苷酸中除去。

在另外的实施方案中, 标记物和/或连接基团可以具有足以发挥阻断其他核苷酸掺入到多核苷酸链上的大小或结构(也就是说, 所述标记本身可用作保护基团)。所述阻断可能是由于空间位阻造成的, 或者可能是由于大小、电荷和结构的组合造成的。

可裂解的连接基团为本领域所公知, 并且可以采用常规化学方法, 以便将连接基团连接在核苷酸碱基和标记物上。连接基团可以连接在核苷酸碱基的任何位置上, 其前提是, 仍然能进行 Watson-Crick 碱基配对。对于嘌呤碱基来说, 如果所述连接基团是通过所述嘌呤或优选的脱氮嘌呤类似物的 7 号位置, 通过 8-修饰的嘌呤, 通过 N-6 修饰的腺嘌呤或 N-2 修饰的鸟嘌呤连接的话将是优选的。对于嘧啶来说, 连接优选是通过胞嘧啶, 胸腺嘧啶和尿嘧啶上的 5 号位置和胞苷上的 N-4 位置连接的。

使用术语“可裂解的连接基团”并非意味着需要除去整个连接基团(例如, 从核苷酸碱基中除去)。当标记物与碱基相连接时, 核苷裂解位点可位于连接基团上的位置, 该位置能够确保在裂解后一部分的连接基团仍与所述核苷酸碱基保持连接。

合适的连接基团包括但不限于二硫连接基团, 酸不稳定性连接基团(包括二烷氧基苄基连接基团, Sieber 连接基团, 吡啶连接基团, 叔丁基 Sieber 连接基团), 亲电可裂解的连接基团, 亲核可裂解的连接基团, 光可裂解的连接基团, 在还原条件、氧化条件下裂解的连接基团, 保险栓(safety-catch)连接基团, 以及通过消除机制进行裂解的连接基团。合适的连接基团可以用标准化学保护基团改良, 正如在以下文献中所披露的: Greene & Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons. Guillier 等披露了用于固相合成的其他合适的可裂解的连接基团(Chem.Rev.100: 2092-2157, 2000)。

所述连接基团可以通过任何合适的方法裂解, 包括接触酸, 碱, 亲核试剂, 亲电试剂, 自由基, 金属, 还原或氧化试剂, 光照, 温度, 酶等, 下文将示例性描述各种可裂解的连接基团的合适裂解方式。通常地, 所述可裂解的连接基团可以在与所述保护基团相同的条件下裂解, 以使得仅需要一次处理即可除去所述标记物和保护基团。

亲电裂解的连接基团典型地被质子所裂解, 并包括对酸敏感的裂解。合适的亲电

裂解的连接基团包括修饰的苄基系统，诸如三苯甲基、对炔氧基苄基酯和对炔氧基苄基酰胺。其他适合的连接基团包括叔丁氧羰基(Boc)基团和缩醛系统。为制备合适的连接分子，还可以考虑在硫缩醛或其他含硫保护基的裂解中使用诸如镍、银或汞的亲硫金属。亲核裂解的连接基团包括在水中不稳定的基团(即，能够在碱性 pH 值下简单地裂解)，例如酯类，以及对非水性亲核试剂不稳定的基团。氟离子可用于裂解诸如三异丙基硅烷(TIPS)或叔丁基二甲基硅烷(TBDMS)的基团中的硅氧键。可光解的连接基团在糖化学中被广泛使用。优选地，激活裂解所需的光不影响修饰的核苷酸中的其他组分。例如，如果使用荧光团作为标记，优选地，该荧光团吸收与裂解所述连接分子所需的光不同波长的光。适合的连接基团包括那些基于 O-硝基苄基化合物和硝基苄基化合物的连接基团。也可以使用基于安息香化学的连接基团(Lee 等人, *J.Org.Chem.* 64:3454-3460, 1999)。已知多种对还原裂解敏感的连接基团。使用基于钨催化剂的催化氢化已用于裂解苄基和苄氧羰基基团。二硫键还原也为本领域所知。基于氧化的方法为本领域所公知。这些方法包括对炔氧基苄基的氧化以及硫和硒连接基团的氧化。使用碘溶液(aqueous iodine)来使二硫化物和其他基于硫或硒的连接基团裂解也在本发明的范围内。安全拉手型连接基团(safety-catchlinker)为那些在两步中裂解的连接基团。在优选的系统中，第一步是反应性亲核中心的产生，随后的第二步涉及分子内环化，这导致裂解。例如，可以用肼或光化学方法处理乙酰丙酸酯连接来释放活性的胺，然后所述胺被环化以使分子中其他位置的酯裂解(Burgess 等人, *J.Org.Chem.* 62:5165-5168, 1997)。也可以使用消除反应裂解连接基团。可以使用诸如苄基氧羰基和氨基乙基的基团的碱催化的消除以及烯丙基系统的钨催化的还原消除。

在某些实施方案中，连接基团可包含间隔单元。连接基团的长度并不重要，只要所述标记物与核苷酸保持足够的距离，以免干扰核苷酸与酶之间的相互作用。

在某些实施方案中，连接基团可由与 3'-OH 保护基团类似的官能团组成。这会使得仅需要单一处理就除去标记物和保护基团。特别优选的连接基团是可通过磷裂解的含叠氮化物的连接基团。

如本文所用的可从经修饰的核苷酸上除去标记物的试剂在很大程度上取决于所使用的标记物。例如，在标记物掺入保护基团的情况下，使用上文所述的除去保护基团的试剂除去标记物。或者，在标记物通过可裂解的连接基团连接至核苷酸的碱基时，使用如上文所述的裂解连接基团的试剂除去标记物。在优选的实施方案中，使用相同的试剂来从经修饰的核苷酸上除去标记物和保护基团，例如在连接基团由与 3'-OH 保护基团类似的官能团组成的情况下。

试剂盒

本发明还提供了用于对多核苷酸进行测序的试剂盒，其包含：

(a) 四种化合物，所述四种化合物分别为核苷酸 A、(T/U)、C 和 G 的衍生物，并且具有碱基互补配对能力；并且，所述四种化合物的核糖或脱氧核糖的 3' 位置处的羟基(-OH)被保护基团保护；并且，

第一化合物连接有第一分子标记，

第二化合物连接有第二分子标记，

第三化合物连接有第一分子标记和第二分子标记，或部分第三化合物连接有第一分子标记且另外一部分第三化合物连接有第二分子标记，

第四化合物没有连接分子标记；和

(b) 两种不同的荧光素酶，两种荧光素酶分别能够特异性结合所述第一分子标记和第二分子标记。

在具体的实施方案中，用于标记四种化合物的分子标记和用于标记两种荧光素酶的标记如上文所定义。

在某些优选的实施方案中，本发明的试剂盒还包含：用于从样品中提取核酸分子的试剂和/或装置；用于预处理核酸分子的试剂；用于连接待测序的核酸分子的支持物；用于将待测序的核酸分子与支持物连接（例如，共价或非共价连接）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；

5 一种或多种洗涤溶液；或其任何组合。

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，

10 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。

在某些优选的实施方案中，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），用于修复核酸切口的试剂（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），

15 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。

在某些优选的实施方案中，本发明的试剂盒还包含用于连接待测序的核酸分子的支持物。所述支持物可以具有上文中针对支持物所详细描述的任何技术特征以及其任何组合。

例如，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、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，Sephadex™）、琼脂糖凝胶（Sephacrose™），以及本领域技术人员已知的其他支持物。

25

在某些优选的实施方案中，用于连接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

35

40 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。在一些实施方案中，支持物或其表面是非平面的，例如管或容器的内表面或外表面。在一些实施方案中，支持物或固体支持物包括微球或珠。在某些优选的实施方案中，用于连接待测序的核酸分子的支持物为珠或孔的阵

45

列。

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连接（例如，共价或非共价连接）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，只要它能够特异性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。

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。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缓冲溶液。此类缓冲液包括但不限于，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，碳酸盐缓冲液等等。本发明的试剂盒可包含上述洗涤溶液的任一种或多种。

发明的有益效果

与现有技术相比，本发明的技术方案具有以下有益效果：

(1) 本发明的方法仅使用两种分子标记即实现对四种核苷酸的标记，并且通过使用荧光素酶实现了自发光。因此，用于本发明测序方法的测序装置无需配备激发光源，也无需采用额外的设计过滤激光光源产生的背景。这一方面大大降低了测序装置的制造成本，有助于测序装置和测序方法的推广和应用；另一方面显著减小了测序装置的体积，使测序装置更加轻便，便于携带。

(2) 本发明的测序方法中使用的脱氧核糖核苷酸 3' 端羟基被修饰阻断，在测序过程中，每次反应只能合成一个脱氧核糖核苷酸，保证每次反应仅结合一个脱氧核糖核苷酸，提高了测序的准确性。

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。

5 实施例
 实施例 1

 1.测序文库构建

 (1) 设计如下 DNA 序列：GATATCTGCAGGCATAGAATGAATATTATTGAAT
CAATAATTAAGTTCGGAGGCCAAGCGGTCTTAGGAAGACAACAACCTCCTTG
10 GCTCACAGAACGACATGGCTACGATCCGACTTTACAACCTACGATAATGGGCT
GGATACATGGAATGATTATAGATATATTAAGGAATAATGTTAATTAATGCCT
AAATTAATTAATCTAAGGGGGTTAATACTTCAGCCTGTGATATC，为建库方便，
在序列的两端添加了 **oligo** 序列（加粗字体），并在中间部分插入了 **BGISEQ-500** 的
接头序列（阴影部分），斜体标粗部分是待测序列的前 10bp 碱基。上述序列由金斯
15 瑞生物科技有限公司合成，为了序列的无限使用将合成的序列插在 pUC57 载体上，并转化
至 E.coli 菌体中。

 (2) 培养适合量的含有已知文库的 E.coli 细菌，并提取质粒，设计如下引物：
GATATCTGCAGGCAT（引物 1），GATATCACAGGCTGA（引物 2），按如下体系（表一）和流程（表二）将已知序列扩增出来，PCR 产物使用磁珠纯化的方式进行。
20 纯化好的 PCR 产物加入 **split oligo**(ATGCCTGCAGATATCGATATCACAGGCTGA)
按照 **BGISEQ-500 SE50** 环化建库试剂盒（华大智造）及流程进行环化建库，待用；

表一（酶来源于 BGI 自产）

	1	x
5X 高保真酶反应液	20	ul
dNTPs 混合液(每个 10mM)	5	ul
高保真酶(1U/ul)	1	ul
引物 1(20uM)	6	ul
引物 2(20uM)	6	ul
质粒 DNA 模板(20ng/ul)	1	ul
分子水	61	ul
总体积	100	ul

表二：

25	98℃	3min;	
	98℃	20s	33 cycles
	60℃	15s	
	72℃	30s	
	72℃	5min	
30	4℃	∞	

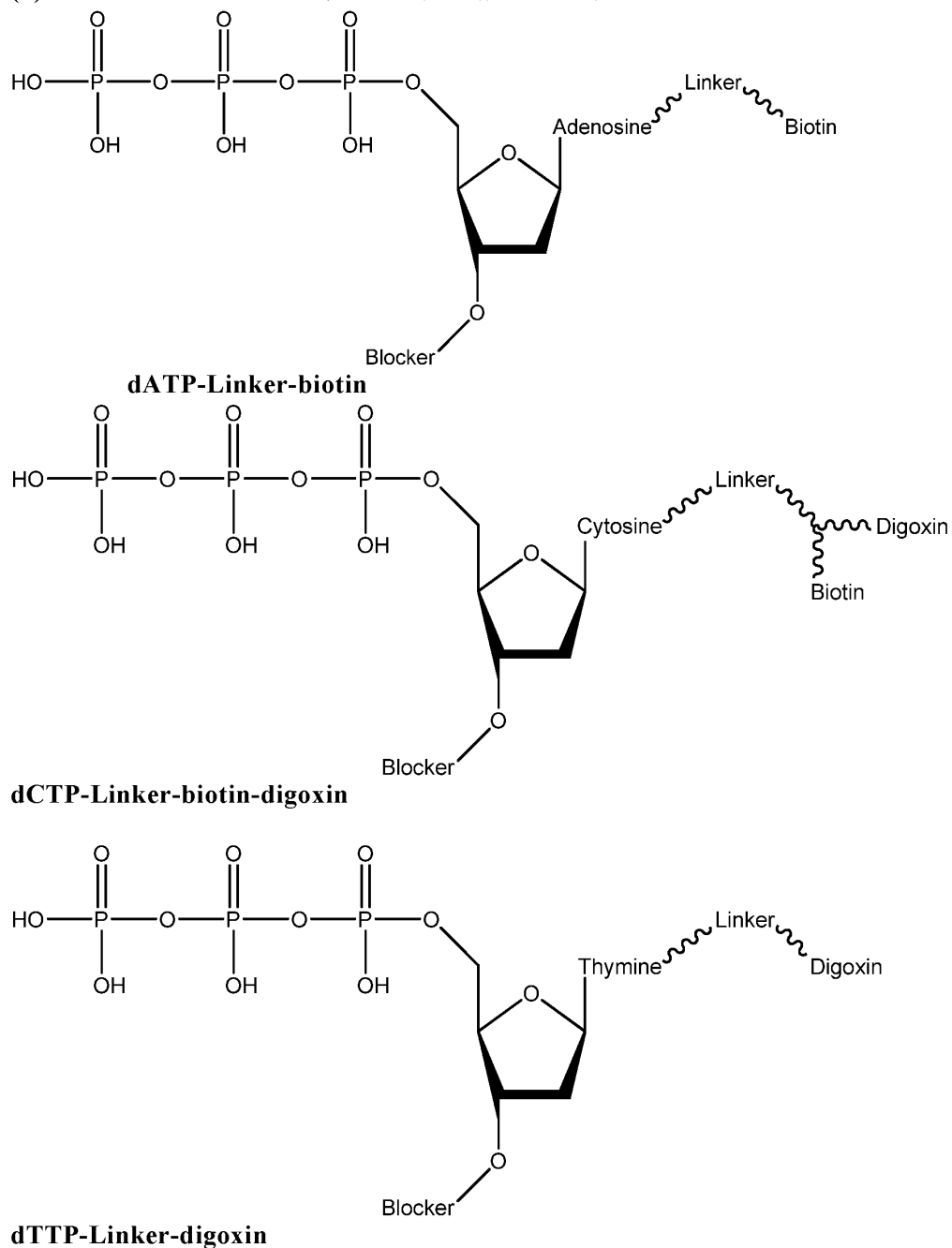
2. 文库序列的扩增

 购买 Thermo fisher 公司的 Streptavidin 包被的 96 孔板，将 1uM 5'端 biotin 修饰
35 的引物 GCCATGTCGTTCTGTGAGCCAAGG 100ul 于其中一个孔常温孵育 30min，
去掉反应液体，加入 6ng 上文第 1 节中所构建的文库和 20ul **BGISEQ-500** 试剂盒（华
大智造）中的 **DNB** 制备缓冲液 I，60℃与上述 biotin 修饰的引物进行引物杂交 5min
后，加入 40ul **BGISEQ-500** 测序试剂盒（华大智造）中的 **DNB** 聚合酶 I 和 4ul **DNB**

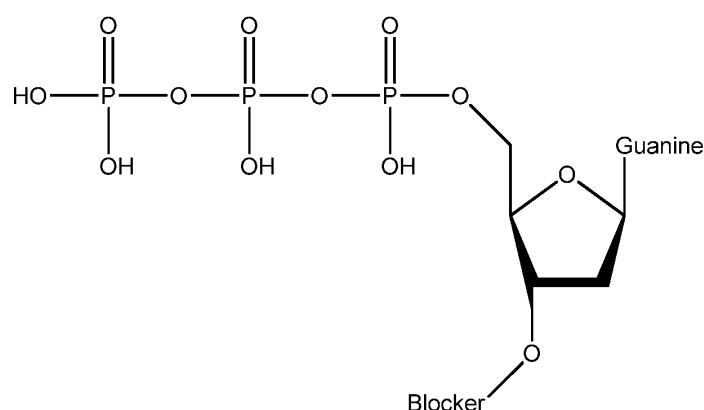
聚合酶 II, 30℃ 反应 60min, 加热至 65℃ 终止反应, 并小心去除反应液。加入 100ul 5uM 的测序引物 GCTCACAGAACGACATGGCTACGATCCGACTT, 常温杂交 30min, 小心去掉反应液;

3. 测序

5 (1) Acme Bioscience 公司外包合成如下所示的 4 种 dNTP:

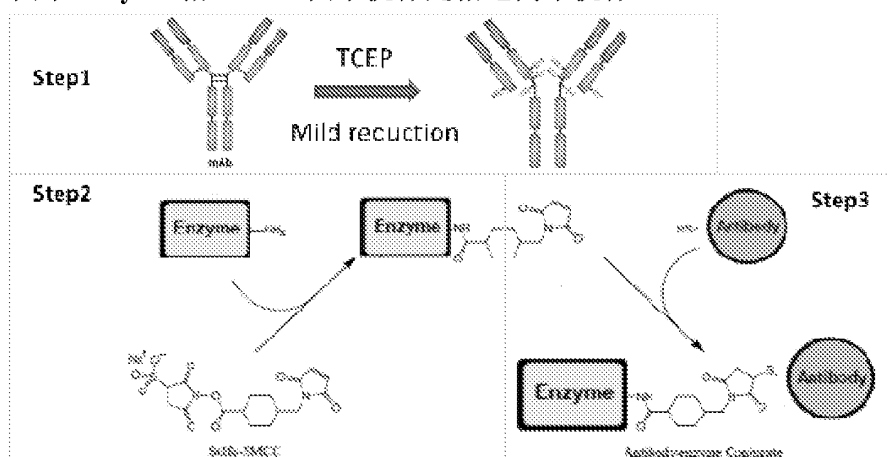


10



(2) 两种荧光素酶的准备:

- 5 a. SA-Gluc (购买于 avidity 公司)
- b. 抗体 (购买于 Abcam 公司) 与 Nluc 偶联 (购买于 avidity) 制备 Ab-Nluc
 购买 thermo 的蛋白偶联试剂盒, 根据说明书按照如下程序进行抗体与 Nluc 的偶联 (图中 enzyme 指 Nluc, 图中抗体是指地高辛抗体):



(3) 试剂准备:

配制测序反应中所需要的其他试剂

聚合反应液: 50mM Tris-HCl, 50mM NaCl, 10mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.02 mg/ml 聚合酶 BG9(BGI), 3mM MgSO_4 , 1mM EDTA, 上述四种 dNTP 各 1uM

洗脱缓冲液: 5XSSC, Tween20 0.05%;

- 15 酶结合反应液: 将上述两种酶稀释至 TBST 缓冲液中, 两种酶的终浓度各 2ug/ml;

底物 1 反应液: 配制 50mM tris-HCl 0.5mM NaCl 缓冲液, 将 50X Coelenterazine (nanolight) 稀释成 1X;

底物 2 反应液: 配制 50mM tris-HCl 0.5mM NaCl 缓冲液, 将 50X NLuc FLASH Substrate (nanolight) 稀释成 1X;

- 20 切除缓冲液: 20mM THPP, 0.5M NaCl, 50mM Tris-HCl, pH 9.0, 0.05% tween20;

(4) 测序反应:

测序流程:

- a. 聚合: 在扩增好文库的孔中, 加入 100ul 聚合酶反应液, 将酶标仪温度升高至 55℃, 反应 3min, 使四种 dNTP 聚合到扩增好的文库上, 小心去除反应液后, 加入

100ul 洗脱反应液，轻轻吹打几次，去除洗脱反应液；

b. 荧光素酶结合：加入 100ul 酶结合反应液，在 35℃ 的条件下，孵育 30min，使 SA-gluc 结合至带有 biotin 标记的 dCTP 和 dATP 的衍生物上，Ab-Nluc 结合至带有 digoxin 标记的 dCTP 和 dTTP 的衍生物上，去除反应液，加入洗脱液，轻轻吹

5 打几次后，去除洗脱液；

c. 酶 1 信号检测：设置适合的酶标仪参数，加入底物 1 反应液，进行酶 1 信号检测，记录最高信号值；

d. 酶 2 信号检测：移除底物反应液 1，设置适合的酶标仪参数，加入底物 2 反应液，进行酶 2 信号检测，记录最高信号值；

10 e. 切除：移除底物 2 反应液，加入 200ul 洗脱缓冲液，轻轻吹打几次后，去掉洗脱缓冲液，加入 100ul 切除反应液，55℃，反应 3min 后，去除切除反应液；加入 200ul 洗脱缓冲液清洗，重复清洗三次；

f. 重复 a-e 步骤，进行下个循环测序；总共进行 10bp 测序

(5) 测序结果

15 a. 两次发光的信号值如下：

	底物1信号 (W)	底物2信号 (W)
cycle1	0.1	210
cycle2	188	0.12
cycle3	173	169
cycle4	206	0.11
cycle5	198	0.13
cycle6	176	171
cycle7	0.13	186
cycle8	203	0.15
cycle9	166	159
cycle10	0.12	0.16

b. 测序结果分析：

20 根据发光的信号值，cycle1 及 cycle7 仅在通入底物 1 时有信号，可推出这两个 cycle 是聚合了 biotin-dTTP，待测文库的第一个碱基和第七个碱基为 T 碱基；

cycle2，cycle4，cycle5 及 cycle8 仅在通入底物 2 时有信号，可推出这四个 cycle 是聚合了 digoxin-dATP，因而待测文库的第二，四，五及第八个碱基为 A 碱基；

25 cycle3，cycle6 及 cycle9 在通入底物 1 和底物 2 后，均有信号产生，可推出这两个 cycle 是聚合了 biotin-digoxin-dCTP，因而待测文库的第三、第六及第九个碱基是 C 碱基；

Cycle10 在两次底物通入时均不发光，可推出这个 cycle 聚合了 coldG，因而此文库的第十个碱基是 G 碱基。

综上所述，所测序列的前 10 个碱基为：TACAACCTACG，与待测文库前 10bp 的碱基序列 TACAACCTACG 匹配度 100%。

30

实施例 2

测序文库构建及文库序列扩增如实施例 1 所示。

测序：

35 (1) 四种 dNTP 如实施例 1 所示

(2) 荧光素酶及相关蛋白的准备

a. SA-Gluc (购买于 adivity 公司)

b. 抗体 (购买于 Abcam 公司)，按照 thermo fisher NHS-s-s-biotin 的使用说明书将抗体上标记 biotin 标签，制备成抗体-s-s-biotin。

(3) 试剂准备

配制测序反应中所需要的其他试剂

聚合反应液: 50mM Tris-HCl, 50mM NaCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 0.02 mg/ml 聚合酶 BG9(BGI), 3mM MgSO₄, 1mM EDTA, 上述四种 dNTP 各 1uM

5 洗脱缓冲液: 5XSSC, Tween20 0.05%;

酶结合反应液: 将上述两种蛋白 SA-Gluc 和抗体-s-s-biotin 分别稀释至 TBST 缓冲液中, 两种蛋白的终浓度各 2ug/ml;

底物反应液: 配制 50mM Tris-HCl 0.5mM NaCl 缓冲液, 将 50X Coelenterazine (nanolight)稀释成 1X;

10 酶失活缓冲液: 5mM DTT, 50mM Tris-HCl, pH9.0;

切除缓冲液: 20mM THPP, 50mM Tris-HCl, pH9.0, 0.5M NaCl, 0.05% tween20;

(4) 测序反应

a. 聚合: 在扩增好文库的孔中, 加入 100ul 聚合酶反应液, 将酶标仪温度升高至 55℃, 反应 3min, 使四种 dNTP 聚合到扩增好的文库上, 小心去除反应液后, 加入 15 100ul 洗脱反应液, 轻轻吹打几次, 去除洗脱反应液;

b. 荧光素酶结合: 加入 100ul 荧光素酶 SA-Gluc 结合反应液, 在 35℃的条件下, 孵育 30min, 使 SA-gluc 结合至带有 biotin 标记的 dCTP 和 dATP 的衍生物上, 去除反应液, 加入洗脱液, 轻轻吹打几次后, 去除洗脱液;

c. 第一次信号检测: 设置适合的酶标仪参数, 加入底物反应液, 进行信号检测, 20 记录最高信号值;

d. 酶失活: 移除底物反应液, 加入酶失活缓冲液, 35℃孵育 10min, 去除反应液, 再加入洗脱缓冲液进行洗脱;

e. 第二次荧光素酶结合: 加入抗体-S-S-biotin 反应液, 在 35℃的条件下孵育 30min, 使抗体-s-s-biotin 结合至带有 digoxin 标记的 dCTP 和 dTTP 衍生物上, 去除反应液, 加入洗脱缓冲液, 轻轻吹打几次, 去除洗脱液, 加入 100ul SA-Gluc 结合反应液, 在 35℃的条件下孵育 30min, 去除反应液后, 加入洗脱缓冲液, 洗脱完毕后, 25 去除洗脱缓冲液;

f. 第二次信号检测: 设置适合的酶标仪参数, 加入底物反应液, 进行信号检测, 记录最高信号值;

30 g. 切除: 移除底物 2 反应液, 加入 200ul 洗脱缓冲液, 轻轻吹打几次后, 去掉洗脱缓冲液, 加入 100ul 切除反应液, 55℃, 反应 3min 后, 去除切除反应液; 加入 200ul 洗脱缓冲液清洗, 重复清洗三次;

h. 重复 a-g 步骤, 进行下个循环测序; 总共进行 10bp 测序

35 (5) 测序结果

a. 10bp 信号检测如下:

	第一次检测 (w)	第二次检测 (w)
cycle1	0.6	223
cycle2	312	0.7
cycle3	278	327
cycle4	254	0.3
cycle5	239	0.4
cycle6	243	275
cycle7	0.27	228
cycle8	267	0.5
cycle9	263	279
cycle10	0.7	0.6

b.测序结果分析:

cycle1 和 **cycle7**, 仅在第一次有信号值, 推测这两个 **cycle** 聚合上了 **biotin-dTTP**, 因而待测文库的第一个及第七个碱基是 **T**;

- 5 **cycle2**, **cycle4**, **cycle5** 及 **cycle8** 仅在第二次检测时有信号, 可推出这四 **cycle** 是聚合了 **digoxin-dATP**, 因而待测文库的第二, 四, 五及第八个碱基为 **A** 碱基;

cycle3, **cycle6** 及 **cycle9** 在第一次和第二次检测时, 均有信号产生, 可推出这两个 **cycle** 是聚合了 **biotin-digoxin-dCTP**, 因而待测文库的第三、第六及第九个碱基是 **C** 碱基;

- 10 **Cycle10** 在两次信号检测时均不发光, 可推出这个 **cycle** 聚合了 **coldG**, 因而此文库的第十个碱基是 **G** 碱基。

 综上所述, 所测序列的前 10 个碱基为: *TACAAC TACG*, 与待测文库前 10bp 的碱基序列 *TACAAC TACG* 匹配度 100%。

权 利 要 求

1、一种对核酸分子进行测序的方法，其包括以下步骤：

(1) 提供连接于支持物上的待测序的核酸分子，或者将待测序的核酸分子连接于支持物上；

(2) 添加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，以及四种化合物，从而形成含有溶液相和固相的反应体系；其中，所述四种化合物分别为核苷酸 A、(T/U)、C 和 G 的衍生物，并且具有碱基互补配对能力；并且，所述四种化合物的核糖或脱氧核糖的 3'位置处的羟基 (-OH) 被保护基团保护；并且，

第一化合物连接有第一分子标记，

第二化合物连接有第二分子标记，

第三化合物连接有第一分子标记和第二分子标记，或部分第三化合物连接有第一分子标记且另外一部分第三化合物连接有第二分子标记，

第四化合物没有连接分子标记；

(3) 使引物退火至待测序的核酸分子上，所述引物作为起始的生长的核酸链，与所述待测序的核酸分子一起形成连接于支持物上的双链体；

(4) 在允许聚合酶进行核苷酸聚合反应的条件下，使用聚合酶进行核苷酸聚合反应，从而将所述四种化合物中的一种并入生长的核酸链的 3'端；

(5) 使上一步骤中的双链体与两种不同的荧光素酶接触并进行结合反应，所述两种荧光素酶分别能够特异性结合所述第一分子标记和第二分子标记，然后使所述荧光素酶在底物存在的情况下发生荧光反应，检测发出的荧光信号；

(6) 去除各个核苷酸的分子标记；

(7) 任选地重复步骤(3)-(6)或(3)-(5) 一次或多次，从而获得所述核酸分子的序列信息。

2、根据权利要求 1 所述的方法，其中步骤(5)中所述双链体与两种不同的荧光素酶在一步反应中接触并进行结合反应；或者步骤(5)中所述双链体与两种荧光素酶依次接触并进行结合反应。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的方法，其包括以下步骤：

(1) 提供连接于支持物上的待测序的核酸分子，或者将待测序的核酸分子连接于支持物上；

(2) 添加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，以及四种化合物，从而形成含有溶液相和固相的反应体系；其中，所述四种化合物分别为核苷酸 A、(T/U)、C 和 G 的衍生物，并且具有碱基互补配对能力；并且，所述四种化合物的核糖或脱氧核糖的 3'位置处的羟基 (-OH) 被保护基团保护；并且，

第一化合物连接有第一分子标记，

第二化合物连接有第二分子标记，

第三化合物连接有第一分子标记和第二分子标记，或部分第三化合物连接有第一分子标记且另外一部分第三化合物连接有第二分子标记，

第四化合物没有连接分子标记；

(3) 使引物退火至待测序的核酸分子上，所述引物作为起始的生长的核酸链，与所述待测序的核酸分子一起形成连接于支持物上的双链体；

(4) 在允许聚合酶进行核苷酸聚合反应的条件下，使用聚合酶进行核苷酸聚合反应，从而将所述四种化合物中的一种并入生长的核酸链的 3'端；

(5) 移除前一步骤的反应体系的溶液相，保留连接于支持物上的双链体，并加入

两种不同的荧光素酶，进行结合反应，所述两种荧光素酶分别能够特异性结合所述第一分子标记和第二分子标记；

- (6) 用洗脱缓冲液去除未结合的荧光素酶；
- (7) 加入第一荧光素酶的底物，同时检测荧光信号；
- (8) 移除上一步反应的溶液；
- (9) 加入第二荧光素酶的底物，同时检测荧光信号；
- (10) 移除上一步反应的溶液；
- (11) 去除各个核苷酸的分子标记和 3' 保护基团；
- (12) 任选地移除上一步反应的溶液；
- (13) 任选地重复步骤(3)-(12) 或(3)-(9) 一次或多次，从而获得所述核酸分子的序列信息。

4、根据权利要求 1 或 2 所述的方法，其包括以下步骤：

(1) 提供连接于支持物上的待测序的核酸分子，或者将待测序的核酸分子连接于支持物上；

(2) 添加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，以及四种化合物，从而形成含有溶液相和固相的反应体系；其中，所述四种化合物分别为核苷酸 A、(T/U)、C 和 G 的衍生物，并且具有碱基互补配对能力；并且，所述四种化合物的核糖或脱氧核糖的 3' 位置处的羟基 (-OH) 被保护基团保护；并且，

第一化合物连接有第一分子标记，

第二化合物连接有第二分子标记，

第三化合物连接有第一分子标记和第二分子标记，或部分第三化合物连接有第一分子标记且另外一部分第三化合物连接有第二分子标记，

第四化合物没有连接分子标记；

(3) 使引物退火至待测序的核酸分子上，所述引物作为起始的生长的核酸链，与所述待测序的核酸分子一起形成连接于支持物上的双链体；

(4) 在允许聚合酶进行核苷酸聚合反应的条件下，使用聚合酶进行核苷酸聚合反应，从而将所述四种化合物中的一种并入生长的核酸链的 3' 端；

(5) 移除前一步反应体系的溶液相，保留连接于支持物上的双链体，并加入第一荧光素酶，进行结合反应，所述第一荧光素酶能够特异性结合所述第一分子标记；

(6) 用洗脱缓冲液去除未结合的第一荧光素酶；

(7) 加入第一荧光素酶的底物，同时检测荧光信号；

(8) 移除上一步反应的溶液；

(9) 加入第二荧光素酶，进行结合反应，所述第二荧光素酶能够特异性结合所述第二分子标记；

(10) 用洗脱缓冲液去除未结合的第二荧光素酶；

(11) 加入第二荧光素酶的底物，同时检测荧光信号；

(12) 通入洗脱缓冲液，移除上一步反应的溶液；

(13) 任选地去除各个核苷酸的分子标记；

(14) 任选地重复步骤(3)-(13) 或(3)-(11) 一次或多次，从而获得所述核酸分子的序列信息。

5、根据权利要求 3 或 4 所述的方法，其所述的第一荧光素酶和第二荧光素酶含有不同的荧光素酶。

6、根据权利要求 1 或 2 所述的方法，其包括以下步骤：

(1) 提供连接于支持物上的待测序的核酸分子，或者将待测序的核酸分子连接于支持物上；

(2) 添加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，以及四种化合物，从而形成含有溶液相和固相的反应体系；其中，所述四种化合物分别为核苷酸 A、(T/U)、C 和 G 的衍生物，并且具有碱基互补配对能力；并且，所述四种化合物的核糖或脱氧核糖的 3' 位置处的羟基 (-OH) 被保护基团保护；并且，

第一化合物连接有第一分子标记，

第二化合物连接有第二分子标记，

第三化合物连接有第一分子标记和第二分子标记，或部分第三化合物连接有第一分子标记且另外一部分第三化合物连接有第二分子标记，

第四化合物没有连接分子标记；

(3) 使引物退火至待测序的核酸分子上，所述引物作为起始的生长的核酸链，与所述待测序的核酸分子一起形成连接于支持物上的双链体；

(4) 在允许聚合酶进行核苷酸聚合反应的条件下，使用聚合酶进行核苷酸聚合反应，从而将所述四种化合物中的一种并入生长的核酸链的 3' 端；

(5) 移除前一步骤的反应体系的溶液相，保留连接于支持物上的双链体，并加入第一荧光素酶，进行结合反应，所述第一荧光素酶能够特异性结合所述第一分子标记；

(6) 用洗脱缓冲液去除未结合的第一荧光素酶；

(7) 加入荧光素酶的底物，同时检测荧光信号；

(8) 移除上一步反应的溶液；

(9) 加入使荧光素酶变性的试剂；

(10) 移除上一步反应的溶液；

(11) 加入第二荧光素酶，进行结合反应，所述第二荧光素酶能够特异性结合所述第二分子标记；

(12) 用洗脱缓冲液去除未结合的第二荧光素酶；

(13) 加入荧光素酶的底物，同时检测荧光信号；

(14) 任选地移除上一步反应的溶液；

(15) 任选地去除各个核苷酸的分子标记和 3' 保护基团；

(16) 任选地重复步骤(3)-(15)或(3)-(13)一次或多次，从而获得所述核酸分子的序列信息。

7、根据权利要求 6 所述的方法，其所述的第一荧光素酶和第二荧光素酶可以含有相同的荧光素酶。

8、根据权利要求 1-7 任一项所述的方法，其中所述第一分子标记和第二分子标记选自生物素、地高辛、N3G 或 FITC，所述第一荧光素酶和第二荧光素酶分别经链霉亲和素、地高辛抗体、N3G 抗体或 FITC 抗体标记。

9、用于对多核苷酸进行测序的试剂盒，其包含：

(a) 四种化合物，所述四种化合物分别为核苷酸 A、(T/U)、C 和 G 的衍生物，并且具有碱基互补配对能力；并且，所述四种化合物的核糖或脱氧核糖的 3' 位置处的羟基 (-OH) 被保护基团保护；并且，

第一化合物连接有第一分子标记，

第二化合物连接有第二分子标记，

第三化合物连接有第一分子标记和第二分子标记，或部分第三化合物连接有第一分子标记且另外一部分第三化合物连接有第二分子标记，

第四化合物没有连接分子标记；和

(b) 两种不同的荧光素酶，两种荧光素酶分别能够特异性结合所述第一分子标记和第二分子标记。

10、根据权利要求 9 所述的试剂盒，其所述的两种不同的荧光素酶可以含有相同的荧光素酶，也可以含有不同的荧光素酶。

11、根据权利要求 9 或 10 所述的试剂盒，其中所述第一分子标记和第二分子标记选自生物素、地高辛、N3G 或 FITC，所述第一荧光素酶和第二荧光素酶分别经链霉亲和素、地高辛抗体、N3G 抗体或 FITC 抗体标记。

12、根据权利要求 9-11 任一项所述的试剂盒，其还包含：用于从样品中提取核酸分子的试剂和/或装置；用于预处理核酸分子的试剂；用于连接待测序的核酸分子的支持物；用于将待测序的核酸分子与支持物连接（例如，共价或非共价连接）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。