



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201321518 A1

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 06 月 01 日

(21)申請案號：101138483

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 10 月 18 日

(51)Int. Cl. : C12Q1/68 (2006.01)

(30)優先權：2011/10/18 中國大陸 201110316066.8

(71)申請人：深圳華大基因科技有限公司(中國大陸) BGI SHENZHEN CO., LIMITED (CN)
中國大陸

深圳華大基因研究院(中國大陸) BGI SHENZHEN (CN)

中國大陸

(72)發明人：殷旭陽 YIN, XUYANG (CN)；張春雷 ZHANG, CHUNLEI (CN)；蔣慧 JIANG, HUI (CN)；張秀清 ZHANG, XIUQING (CN)

(74)代理人：吳豐任；戴俊彥

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：22 項 圖式數：5 共 50 頁

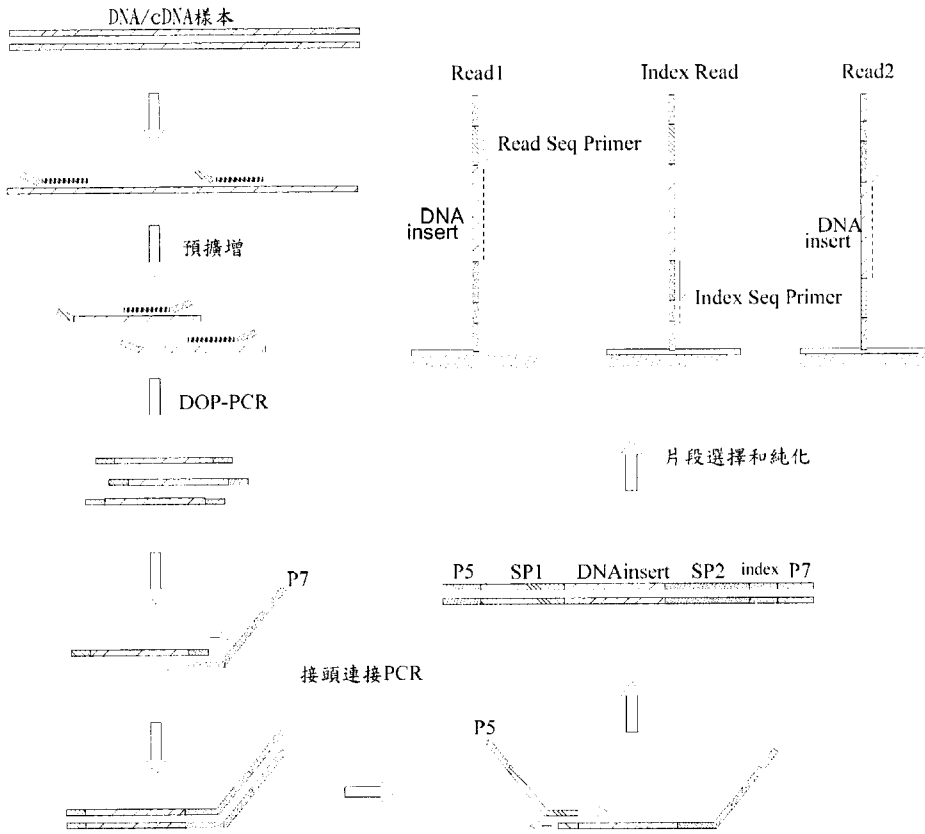
(54)名稱

微量核酸樣本的庫製備方法及其應用

METHOD OF MICRO-SCALE NUCLEIC ACID LIBRARY CONSTRUCTION AND APPLICATION THEREOF

(57)摘要

本發明涉及一種微量核酸樣本庫製備方法，所述方法包括：用 DOP(Degenerate Oligonucleotide Primed)引子對樣本中的 DNA 進行第一次擴增，DOP 引子序列具有至少 5'端非退化性核苷酸區和 3'端退化性核苷酸區；用 DOP-Amp 引子對第一 PCR 產物進行第二次擴增，獲得第二 PCR 擴增產物；對第二 PCR 擴增產物進行接頭連接 PCR(adaptor-ligation PCR)，獲得第三 PCR 產物，兩端帶有測序接頭的第三 PCR 產物即為核酸庫。所述庫可以進行片段大小選擇和高通量測序，得到樣本中疾病相關的基因訊息。本發明還提供一種試劑盒及其在所述微量核酸樣本庫製備的用途。





(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201321518 A1

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 06 月 01 日

(21)申請案號：101138483

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 10 月 18 日

(51)Int. Cl. : C12Q1/68 (2006.01)

(30)優先權：2011/10/18 中國大陸 201110316066.8

(71)申請人：深圳華大基因科技有限公司(中國大陸) BGI SHENZHEN CO., LIMITED (CN)
中國大陸

深圳華大基因研究院(中國大陸) BGI SHENZHEN (CN)

中國大陸

(72)發明人：殷旭陽 YIN, XUYANG (CN)；張春雷 ZHANG, CHUNLEI (CN)；蔣慧 JIANG, HUI (CN)；張秀清 ZHANG, XIUQING (CN)

(74)代理人：吳豐任；戴俊彥

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：22 項 圖式數：5 共 50 頁

(54)名稱

微量核酸樣本的庫製備方法及其應用

METHOD OF MICRO-SCALE NUCLEIC ACID LIBRARY CONSTRUCTION AND APPLICATION THEREOF

(57)摘要

本發明涉及一種微量核酸樣本庫製備方法，所述方法包括：用 DOP(Degenerate Oligonucleotide Primed)引子對樣本中的 DNA 進行第一次擴增，DOP 引子序列具有至少 5'端非退化性核苷酸區和 3'端退化性核苷酸區；用 DOP-Amp 引子對第一 PCR 產物進行第二次擴增，獲得第二 PCR 擴增產物；對第二 PCR 擴增產物進行接頭連接 PCR(adaptor-ligation PCR)，獲得第三 PCR 產物，兩端帶有測序接頭的第三 PCR 產物即為核酸庫。所述庫可以進行片段大小選擇和高通量測序，得到樣本中疾病相關的基因訊息。本發明還提供一種試劑盒及其在所述微量核酸樣本庫製備的用途。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：101138483

C12Q 1/68 (2006.01)

※ 申請日：101.10.18

※IPC 分類：

一、發明名稱：(中文/英文)

微量核酸樣本的庫製備方法及其應用/Method of micro-scale nucleic acid library construction and application thereof

二、中文發明摘要：

本發明涉及一種微量核酸樣本庫製備方法，所述方法包括：用 DOP (Degenerate Oligonucleotide Primed) 引子對樣本中的 DNA 進行第一次擴增，DOP 引子序列具有至少 5' 端非退化性核苷酸區和 3' 端退化性核苷酸區；用 DOP-Amp 引子對第一 PCR 產物進行第二次擴增，獲得第二 PCR 擴增產物；對第二 PCR 擴增產物進行接頭連接 PCR(adaptor-ligation PCR)，獲得第三 PCR 產物，兩端帶有測序接頭的第三 PCR 產物即為核酸庫。所述庫可以進行片段大小選擇和高通量測序，得到樣本中疾病相關的基因訊息。本發明還提供一種試劑盒及其在所述微量核酸樣本庫製備的用途。

三、英文發明摘要：

The present invention relates to a method of micro-scale nucleic acid library construction. The method comprises : amplifying of DNA in the sample using Degenerate Oligonucleotide Primed (DOP) PCR, in which the DOP PCR primers are sequences having at least one 5' end non-degenerate nucleotide region and one 3' end of degenerate

nucleotide region; amplifying the first PCR products using DOP-Amp primers, thereby obtaining a second PCR amplification product; amplifying the second PCR amplification product using adaptor-ligation PCR, thereby obtaining third PCR products, in which the third PCR products have sequencing adaptors at both ends is the desired nucleic acid library. The library can be selected according to fragment size and then proceeded with high-throughput sequencing to discover disease-related genes. The present invention also provides a kit and its use in micro-scale nucleic acid library construction.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明屬於基因工程技術領域，具體地涉及一種微量核酸庫的製備方法及其應用。

【先前技術】

新一代測序技術(NGS)改變了以往對 DNA/RNA 樣本的分析模式，幾乎成爲所有研究領域中必不可少的研究工具。新一代測序技術是通過對上百萬條 DNA 短片段的同時的平行測序，使得在短時間內就能夠完成每個鹼基的測序，且成本大幅度降低。NGS 技術在很多方面得到應用，如基因體學、轉錄體學、表觀基因(epigenomic)體學、臨床診斷等。

目前市場上新一代測序技術 NGS 平臺有好幾種，包括 Illumina 公司的 Genome Analyzer、Hiseq、Miseq 系列測序平臺，Roche 公司的 454 測序平臺，Life Technologies 公司的 SOLID 測序平臺、Ion Torrent 測序平臺等。

但是無論何種 NGS 平臺，在測序前都需對 DNA/RNA 樣本進行處理，製備成 DNA 庫(DNA library)。通常情況下，分子庫的製備需要微克(micro gram)級的起始 DNA/RNA 量，雖然經改良後可以將建庫起始量降低，但對於單細胞或極微量的核酸樣本，仍無法直接進

行分子庫的製備，因此嚴重阻礙了對單細胞和微量核酸測序的應用。

因此本領域迫切需要開發針對單細胞和微量核酸樣本的分子庫構建方法。

【發明內容】

本發明的目的是提供一種對微量核酸樣本進行庫製備的方法和用途。

本發明的另一目的是提供一種使用上述方法的試劑盒及其用途。

在本發明的第一方面，提供了一種製備核酸庫的方法，包括步驟：

- a. 提供一待測樣本，所述樣本含有的核酸總量為 2 皮克~1 微克；
- b. 對待測樣本進行 DOP-PCR (Degenerate Oligonucleotide Primed PCR) 擴增，獲得第一 PCR 擴增產物；
- c. 用 DOP-Amp 引子對第一 PCR 擴增產物進行第二次 PCR 擴增，獲得第二 PCR 擴增產物；
- d. 對獲得的第二 PCR 擴增產物進行接頭連接 PCR (adaptor-ligation PCR)，獲得第三 PCR 擴增產物，即為核酸庫。

在另一較佳實施例中，所述的第三 PCR 擴增產物的 5'端具有接頭，且 3'端具有接頭。

在另一較佳實施例中，還包括步驟(e)：對第三 PCR 擴增產物依據片段大小進行選擇。

在另一較佳實施例中，步驟(a)中所述的樣本選自下組：

1-200 個單細胞構成的樣本，或

含有 1-200 個單細胞的核酸樣本，或

核酸總含量為 2 皮克~1 微克的核酸樣本。

在另一較佳實施例中，所述樣本選自下組：微量基因體 DNA、免疫共沉澱產物 DNA、游離 DNA、cDNA、或其組合。

在另一較佳實施例中，所述 DNA 來自環境，更佳地，來自土壤和/或水體。

在另一較佳實施例中，所述 DNA 來自體液或排泄物，更佳地，來自血漿和/或尿液。

在另一較佳實施例中，所述的 DNA 經化學或物理方法處理，更佳地，經亞硫酸氫鹽處理。

在另一較佳實施例中，步驟(b)使用帶有退化性寡核苷酸區的 DOP 引子對樣本 DNA 進行隨機擴增。

在另一較佳實施例中，所述的 DOP 引子具有位於 5'端的非退化性寡核苷酸區和位於中部的退化性寡核苷酸區和 3'端的錨定區；或者位於 5'端的非退化性寡核苷酸區和位於中部和 3'端的退化性寡核苷酸區。

在另一較佳實施例中，所述 DOP 引子的 3'端錨定區的序列長度為 2-12 個核苷酸，較佳地 4-8 個核苷酸。

在另一較佳實施例中，所述 DOP 引子的 3'端錨定區任選自下組：TG、ATGTGG、TGTGG，或 GTCT。

在另一較佳實施例中，所述 DOP 引子的 5'端非退化性寡核苷酸序列如 SEQ ID NO：2 所示，或與 SEQ ID NO：2 所示序列的同源性 $\geq 50\%$ 。

在另一較佳實施例中，所述的 DOP 引子的 5'端非退化性寡核苷酸長度為 5-30bp，較佳地 5-20bp，更佳地 6-13bp。

在另一較佳實施例中，所述的退化性寡核苷酸序列如(N)m 所示，其中每個鹼基位置上的 N 包括 A、T、G 和 C，m 為 3-20 的正

整數。

在另一較佳實施例中，步驟(c)所述的 DOP-Amp 引子與步驟(b)所述的 5'端非退化性寡核苷酸互補或基本上互補。

在另一較佳實施例中，DOP-Amp 引子序列結合於 DOP 引子 5'端非退化性寡核苷酸區。

在另一較佳實施例中，DOP-Amp 引子序列如 SEQ ID NO：2 所示。

在另一較佳實施例中，步驟(d)用接頭引子進行接頭連接 PCR 擴增。

在另一較佳實施例中，所述的接頭引子為 P5 和 P7，且 P5 和 P7 的 3'端都具有可結合於 DOP-Amp 引子序列的非退化性寡核苷酸區，所述的非退化性寡核苷酸區的序列與 SEQ ID NO：2 所示序列相同或完全互補，或者與 SEQ ID NO：2 所示序列有 $\geq 80\%$ 的同源性。

在另一較佳實施例中，所述的接頭引子 P7 還具有標籤(barcode 或 index)序列。

在另一較佳實施例中，步驟(e)中所述的依據片段大小進行選擇為：在第三 PCR 擴增產物中選擇 100-1000bp 長度的片段。

在另一較佳實施例中，所述的依據片段大小進行選擇為：在第三 PCR 擴增產物中選擇 200-500bp 長度的片段。

在本發明的第二方面，提供了一種檢測微量核酸樣本中核苷酸序列的方法，包括步驟：

(i) 對於所提供的單細胞及微量核酸樣本，用本發明第一方面任一所述的方法製備所述樣本的核酸庫；

(ii) 對所述核酸庫中的片段進行測序和數據分析。

在另一較佳實施例中，所述的測序為第二代高通量測序法，所述第二代高通量測序法可選擇但不限於在 Roche454 FLX、Illumina Solexa 或 ABI SOLID 測序平臺上進行。

在另一較佳實施例中，所述的測序包括步驟：

將需要測序的核酸庫與測序晶片(flow cell)上固定的測序探針進行雜交，並進行固相橋式 PCR 擴增，形成測序簇；對所述測序簇用「邊合成-邊測序」法進行測序，獲得樣本中核苷酸序列訊息。

在本發明的第三方面，提供了一種可用於本發明第一方面和第二方面任一方法的試劑盒，所述試劑盒包括：

(1)第一容器以及位於容器內的用於進行第一 PCR 擴增的 DOP 引子；

(2)第二容器以及位於容器內的用於進行第二 PCR 擴增的 DOP-Amp 引子；

(3)第三容器以及位於容器內的用於進行第三 PCR 擴增的接頭連接引子；

(4)說明書。

在另一較佳實施例中，所述試劑盒還包括：用於進行 PCR 擴增所需的試劑、用於核酸純化的試劑、用於進行高通量測序的測序晶片(flow cell)、或其組合。

應理解，在本發明範圍內中，本發明的上述各技術特徵和在下文(如實施例)中具體描述的各技術特徵之間都可以互相組合，從而構成新的或優選的技術方案。限於篇幅，在此不再一一累述。

【實施方式】

本發明人經過廣泛而深入的研究，首次建立了一種對微量核酸樣本進行庫製備的方法。用 DOP 引子對樣本中的 DNA 進行第一次擴增，DOP 引子序列具有至少 5'端的非退化性的核苷酸區和退化性核苷酸區；用 DOP-Amp 引子對第一 PCR 產物進行第二次擴增，獲得第二 PCR 擴增產物；對第二 PCR 擴增產物進行接頭連接 PCR，獲得第三 PCR 擴增產物，第三 PCR 擴增產物的兩端帶有測序接頭，

即為核酸庫。對庫進行片段大小選擇和高通量測序，能得到樣本中疾病相關的基因訊息。

術語

如本文所用，術語「含有」包括「具有(comprise)」、「基本上由...構成」和「由...構成」。

如本文所用，術語「以上」和「以下」包括本數，例如「80%以上」指 $\geq 80\%$ ，「2%以下」指 $\leq 2\%$ 。

DOP-PCR (Degenerate Oligonucleotide Primed PCR)

DOP-PCR 退化性寡核苷酸引子 PCR(DOP-PCR)是一種對微量 DNA 或單細胞進行擴增的方法，包括(但不限於)：低嚴謹度預擴增和高嚴謹度擴增兩個步驟。低嚴謹度擴增基於退化性寡核苷酸引子進行，目的是在 DNA 片段加上了一段固定序列作為 PCR 引子結合區；再用 DOP-Amp 引子對低嚴謹度擴增產物進行高嚴謹度擴增。

所述的退化性寡核苷酸引子至少包括兩部分，從 5'到 3'分別為：5'端非退化性核苷酸區及其下游的退化性引子區。在另一較佳實施例中，DOP 引子序列如 SEQ ID NO：1 所示
GCTCTTCCGATCTNNNNNNNNNN，其中，GCTCTTCCGATCT 為 5'端的非退化性核苷酸區，NNNNNNNNNN 為退化性序列區，退

化性序列可記為： $(N)m$ ， m 為任選自 3-20 的正整數， N 獨立地任選自 A、T、G 和 C。在一個較佳實施例中，DOP 引子序列還包括 3'端錨定序列，如「TG」，「ATGTGG」，「TGTGG」，「GTCT」等。用退化性寡核苷酸引子對樣本進行擴增，獲得第一 PCR 產物。

所述的 DOP-Amp 引子序列與 DOP 引子的 5' 端非退化性核苷酸區基本上互補，在一個較佳實施例中，DOP-Amp 引子序列與 5'端非退化性核苷酸區相同或完全互補或至少覆蓋了 5'端特定核苷酸序列的 50%區域或/與 5'端特定核苷酸序列有 $\geq 80\%$ 同源性。在另一較佳實施例中，DOP-Amp 引子序列如 SEQ ID NO：2 所示：5'-GCTCTTCCGATCT-3'。用 DOP-Amp 引子對第一 PCR 產物進行擴增，獲得第二 PCR 產物。

將擴增獲得的第二 PCR 產物直接進行電泳或檢測濃度，也可以製備成質體(plasmid)進行 Sanger 法測序，也可以用來進行後續建庫。

引子

如本文所用，術語「引子(primer)」指的是能與模板(template)互補配對，在 DNA 聚合酶的作用合成與模板互補的 DNA 鏈的寡聚核苷酸的總稱。引子可以是天然的 RNA、DNA，也可以是任何形式的天然核苷酸，引子甚至可以是非天然的核苷酸如鎖核酸(Locked Nucleic Acid，LNA)或 zip nucleic acids (ZNA)等。

引子「大致上」(或「基本上」)與模板上一條鏈上的一個特殊的序列互補。引子必須與模板上的一條鏈充分互補才能開始延伸，但引子的序列不必與模板的序列完全互補。比如，在一個3'端與模板互補的引子的5'端加上一段與模板不互補的序列，這樣的引子仍大致上與模板互補。只要有足夠長的引子能與模板充分的結合，非完全互補的引子也可以與模板形成引子-模板複合物，從而進行擴增。

在本發明中，引子包括(但不限於)：退化性引子、DOP-Amp 引子、接頭引子。退化性引子為(N)_m，m 為任選自 3-20 的正整數，N 任選自 A、T、G 和 C，能夠通過鹼基互補配對與樣本隨機結合，對樣本進行隨機片段化的擴增。DOP-Amp 引子能與退化性寡核苷酸引子的特定核苷酸序列基本上互補，對退化性引子擴增的產物進一步擴增。接頭引子特异性識別 DOP-Amp 引子擴增產物的兩端，得到 5'端和 3'端分別為特異接頭的、可用於進一步測序的產物。

接頭連接 PCR (Adaptor-Ligation PCR)

接頭連接 PCR(Adaptor-Ligation PCR)是指在 PCR 同時將接頭(adaptor)加到模板 DNA 片段兩端，此處的「接頭」為高通量測序庫的接頭序列。接頭引子是接頭連接 PCR 的重要組成部分。

在一個較佳實施例中，接頭引子包括(但不限於)：P5 接頭引子和 P7 接頭引子。所述的 P5 接頭引子具有如 SEQ ID NO:3 所示的序

列：

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTAC
ACGACGCTCTTCCGATCT；

P7 具有 SEQ ID NO:4-7 所示的任一序列：

CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATXXXXXXGTGACTGGA
GTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT，其中 XXXXXX 為標籤
(barcode)序列，標籤(barcode) 用於區分不同的樣本。

P5 接頭和 P7 接頭具有結合測序平臺 Flow cell，用於測序的序
列。

高通量測序

基因體的「再測序」使得人類能夠儘早地發現與疾病相關基因的異常變化，有助於對個體疾病的診斷和治療進行深入的研究。本領域通常知識者通常可以採用三種第二代測序平臺進行高通量測序：454 FLX(Roche 公司)、Solexa Genome Analyzer(Illumina 公司)和 Applied Biosystems 公司的 SOLID 等。這些平臺共同的特點是極高的測序通量，相對於傳統測序的 96 道毛細管測序，高通量測序一次實驗可以讀取 40 萬到 400 萬條序列，根據平臺的不同，讀取長度從 25bp 到 450bp 不等，因此不同的測序平臺在一次實驗中，可以讀取 1G 到 14G 不等的鹼基數。

其中，Solexa 高通量測序包括 DNA 簇形成和上機測序兩個步

驟：PCR 擴增產物的混合物與固相載體上固定的測序探針進行雜交，並進行固相橋式 PCR 擴增，形成測序簇；對所述測序簇用「邊合成-邊測序法」進行測序，從而得到樣本中疾病相關核酸分子的核苷酸序列。

DNA 簇的形成是使用表面連有一層單鏈引子(primer)的測序晶片(flow cell)，單鏈狀態的 DNA 片段通過接頭序列與晶片表面的引子通過鹼基互補配對的原理被固定在晶片的表面，通過擴增反應，固定的單鏈 DNA 變為雙鏈 DNA，雙鏈再次變性成為單鏈，其一端錨定在測序晶片上，另一端隨機和附近的另一個引子互補從而被錨定，形成「橋」；在測序晶片上同時有上千萬個 DNA 單分子發生以上的反應；形成的單鏈橋，以周圍的引子為擴增引子，在擴增晶片的表面再次擴增，形成雙鏈，雙鏈經變性成單鏈，再次成為橋，稱為下一輪擴增的模板繼續擴增；反復進行了 30 輪擴增後，每個單分子得到 1000 倍擴增，稱為單克隆的 DNA 簇。

DNA 簇在 Solexa 測序儀上進行邊合成邊測序，測序反應中，四種鹼基分別標記不同的螢光，每個鹼基末端被保護鹼基封閉，單次反應只能加入一個鹼基，經過掃描，讀取該次反應的顏色後，該保護集團被除去，下一個反應可以繼續進行，如此反復，即得到鹼基的精確序列。在 Solexa 多重測序(Multiplexed Sequencing)過程中會使用 Index(標籤 or barcode)來區分樣品，並在常規測序完成後，針對 Index 部分額外進行 7 個循環的測序，通過 Index 的識別，最多

可以在 1 條測序甬道中區分 12 種不同的樣品。

本發明提供了一種製備單細胞及微量核酸的庫的方法，所述方法包括(但不限於)下述步驟：

1. 獲得樣本；
2. 對樣本 DNA 進行 DOP-PCR；
3. 對 DOP-PCR 擴增產物進行 Adaptor-Ligation PCR；

PCR 產物經片段大小選擇和純化，片段大小選擇及純化是指選取一定大小範圍的 DNA 片段，並進行純化，片段大小選擇的方法可以是在瓊脂糖凝膠電泳後切取一定大小範圍的 DNA 片段膠塊，進行回收純化，純化後即得到由單細胞及微量核酸製備的庫。

在另一較佳實施例中，還可以對所述庫進行測序，較佳地使用高通量測序。

本發明一個典型的流程示意圖見第 1 圖。

試劑盒

本發明還提供了一種用於微量核酸樣本的庫製備的試劑盒，所述試劑盒包括：

- (1)第一容器以及位於容器內的用於進行第一 PCR 的 DOP 引子；
- (2)第二容器以及位於容器內的用於進行第二 PCR 的 DOP-Amp

引子；

(3)第三容器以及位於容器內的用於進行第三 PCR 的接頭連接

引子；

(4)說明書。

在本發明的一個較佳實施例中，試劑盒還包括：用於進行 PCR 擴增所需的試劑、用於核酸純化的試劑、用於進行高通量測序的測序晶片(flow cell)、或其組合。

本發明的主要優點包括：

1.通過 DOP 引子對樣本中的 DNA 進行第一次擴增，能夠全面覆蓋樣本的 DNA 片段；

2. DOP 引子序列具有至少 5'端的非退化性核苷酸區及其下游的退化性寡核苷酸區，獲得的擴增產物帶有特定的核苷酸序列，加入 DOP-Amp 引子，能夠對預擴增產物進行第二次擴增，且第二次擴增為高嚴謹性擴增，大大提高靈敏度；

3.第三次 PCR 中使用接頭連接引子在片段兩端加入接頭，可以直接用於下一步測序；

4.可以同時對多個樣品建庫和檢測，且沒有螢光背景的干擾；

5.不受物種的限制，人、動物、微生物、植物等都可以進行個體式建庫和檢測；

6. 試驗費用低，靈敏度高、精確度高、重複性好。

下面結合具體實施例，進一步闡述本發明。應理解，這些實施例僅用於說明本發明而不用於限制本發明的範圍。下列實施例中未注明具體條件的實驗方法，通常按照常規條件如 Sambrook 等人，分子克隆：實驗室手冊(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的條件，或按照製造廠商所建議的條件。

實施例 1

DOP-PCR 方法製備單細胞基因體 DNA 庫

本實施例以血液中的單個淋巴細胞為例，經由 DOP-PCR 的方法製備單細胞基因體 DNA 庫。

1. 樣本來源：

血液單細胞樣本分別來自於一個正常人(YH，炎黃計劃樣本)和一個唐氏綜合症患者(T21)的外周血。

2. 單細胞分離：

用口吸管方法共分離出 3 個 YH 和 1 個 T21 外周血單個淋巴細胞，置於含 2 μ l 鹼性細胞裂解液(200mM KOH，50mM DTT)的 PCR 管中，-80 $^{\circ}$ C 凍存 30 分鐘以上。

3. 第一次 PCR(低嚴謹度擴增，DOP 預擴增)：

DOP 預擴增將含單細胞的 PCR 管於 65 $^{\circ}$ C 處理 15 分鐘，之後加入 DOP 反應液進行 DOP 預擴增反應。本實施例以 pfx DNA 聚合酶

進行擴增。

DOP 反應體系見表 1。

表 1

組分	終濃度
10x Pfx 擴增緩衝液	1x
10x Enhancer Solution	1x
10mM dNTP 混合液	各 1mM
50mM MgSO ₄	1mM
DOP 引子	0.3~2μM
pfx DNA 聚合酶	1~2.5 單位
單細胞 DNA	(按需要)
滅菌蒸餾水	至目標總體積

混合上述各組分，覆蓋適量的礦物油。蓋上管蓋，瞬時離心。在反應體系中，DOP 引子序列(SEQ ID NO:1)為 GCTCTTCCGATCTNNNNNNNNNN。其中，5'特定序列為 GCTCTTCCGATCT，3'退化性序列為 NNNNNNNNNNN，N 可以任意為 A、T、G 和 C。

按照表 2 的反應條件進行預擴增。

表 2

溫度	時間	循環數
94~98°C	2~5 分鐘	1
94~98°C	20 秒~2 分鐘	
10~19°C	5~30 分鐘	
20~30°C	5~30 分鐘	1~10
31~40°C	5~30 分鐘	
65~72°C	15 秒~3 分鐘	
4~12°C	保持	

由於 DOP 引子含 5' 特定序列和 3' 退化性序列，預擴增即可將引子 5' 特定序列加在所有產物 DNA 片段的兩端。

4. 高嚴謹度擴增

預擴增結束後，將與這段 5' 特定序列結合的 DOP-Amp 引子加入預擴增體系中，終濃度為 2 μ M。

DOP-Amp 引子序列為 SEQ ID NO : 2 GCTCTTCCGATCT(即：DOP-Amp 引子序列為 DOP 引子的 5' 端特定寡核苷酸序列部分)。

之後按照表 3 的反應條件進行 PCR 反應。

表 3

溫度	時間	循環數
----	----	-----

94~98°C	2~5 分鐘	1
94~98°C	15 秒~2 分鐘	
50~60°C	15 秒~2 分鐘	5~30
65~72°C	15 秒~2 分鐘	
4~12°C	保持	

將上述 DOP-PCR 擴增終產物進行電泳及濃度檢測。

5. 接頭連接 PCR

將步驟(4)獲得的 DOP-PCR 產物直接用於下一步接頭連接 PCR(Adaptor-Ligation PCR)反應。

在本實施例中，Adaptor-Ligation PCR 採用耐熱的 DNA 聚合酶 pfx 酶，其反應體系見表 4。

表 4

組分	終濃度
10x Pfx 擴增緩衝液	2x
10x Enhancer Solution	1x
10mM dNTP 混合液	各 0.1mM
50mM MgSO ₄	1mM
P5 接頭引子	2μM
P7 接頭引子	2μM

px DNA 聚合酶	2U
DOP-PCR 產物模板	(按需要)
滅菌蒸餾水	至目標總體積

表 4 中的 P5 接頭引子和 P7 接頭引子的序列分別為：

P5 接頭引子 SEQ ID NO : 3

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTAC
ACGACGCTCTTCCGATCT。

各個庫中，P5 序列是一樣的，均為 Illumina Hiseq2000 庫構建中的接頭序列，包括結合 Flowcell 和測序的接頭。

P7 接頭具有標籤(barcode)序列，且在不同的庫中，標籤(barcode)不同，但具有下列的總序列：

CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATXXXXXXGTGACTGG
AGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT，其中 XXXXXX 為 barcode
序列。

P5 和 P7 接頭序列的最後 13bp 均與 DOP-Amp 引子序列一致。

本實施例中，4 個庫的 P7 序列如下：

YH1 庫 SEQ ID NO : 4

CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAAGCTAGTGACTGGA
GTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT；

YH2 庫 SEQ ID NO : 5

CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT***ACATCGGTGACTGGA***
G TTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT ;

YH3 庫 SEQ ID NO : 6

CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT***GCCTAAGTGACTGGA***
G TTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT ;

T21 庫 SEQ ID NO : 7

CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT***TGGTCAGTGACTGGA***
G TTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT 。

在 SEQ ID NO : 4 至 SEQ ID NO : 7 中，加粗斜體的 6 個序列
為 barcode 序列。

Adaptor-Ligation PCR 反應條件見表 5。

表 5

溫度	時間	循環數
94~98°C	2~5 分鐘	1
94~98°C	15 秒~2 分鐘	
50~60°C	15 秒~2 分鐘	0~10
65~72°C	15 秒~2 分鐘	
94~98°C	15 秒~2 分鐘	
58~65°C	15 秒~2 分鐘	5~20
65~72°C	15 秒~2 分鐘	

4~12°C

保持

Adaptor-Ligation PCR 的反應產物即為 DNA 片段兩端為 Illumina 接頭序列的庫，電泳膠圖見第 2 圖，泳道從左到右為 Marker(D2000)、YH1、YH2、YH3、T21 和陰性對照。

6. PCR 產物選擇和純化

上述庫為 PCR 產物，含引子二聚體等雜質，且片段大小分布較分散，因此進行片段大小選擇和純化。切取 300bp-500bp 大小範圍的膠塊，用 Qiagen 公司的 QIAquick Gel Extraction Kit 進行 DNA 片段回收和純化。具體操作參見試劑盒說明書。

上述庫經片段選擇和純化後，進行 Agilent 2100 bioanalyzer 檢測，檢測結果見第 3 圖，第 3A 圖為樣本 YH1 檢測結果，需要的主帶位於 377bp；第 3B 圖為樣本 YH2 檢測結果，需要的主帶位於 326bp；第 3C 圖為樣本 YH3 檢測結果，需要的主帶位於 339bp；第 3D 圖為樣本 T21 檢測結果，需要的主帶位於 360bp。

結果表明，選擇和純化的片段合格。至此，DOP-PCR 方法製備血液淋巴單細胞基因體 DNA 庫的流程已完成。

7. Illumina Hiseq2000 測序

採用 Single-End 測序，讀長 50bp，由於每個庫已含有不同

barcode 標籤，因此混合於一個測序通道進行測序。測序數據統計結果見表 6。

表 6

樣品名	庫編號	Read 數	比對率 (%)	唯一比對率 (%)
YH1	YH1AADPPEI-1	20673324(20.7M)	93.86%	89.80%
YH2	YH2ABDPPEI-2	21352924(21.4M)	94.32%	90.03%
YH3	YH3ACDPPEI-3	21290934(21.3M)	93.46%	89.61%
T21	T21ADDPPEI-5	20980937(21.0M)	94.36%	90.27%

表 6 為用本實施例中 DOP-PCR 的方法製備血液淋巴單細胞基因體 DNA 庫的測序數據統計結果。

對這 4 個庫，進一步統計每條常染色體的數據量占常染色體總數據量的比例，以 read 數進行統計，統計結果見表 7。

表 7

染色體	YH1	YH2	YH3	T21
chr1	0.085	0.084	0.083	0.083

chr2	0.096	0.094	0.093	0.093
chr3	0.082	0.078	0.078	0.076
chr4	0.079	0.079	0.076	0.075
chr5	0.070	0.071	0.071	0.070
chr6	0.071	0.067	0.069	0.068
chr7	0.057	0.057	0.058	0.057
chr8	0.057	0.054	0.058	0.056
chr9	0.039	0.042	0.043	0.042
chr10	0.047	0.046	0.045	0.046
chr11	0.048	0.050	0.050	0.049
chr12	0.048	0.049	0.051	0.049
chr13	0.038	0.038	0.039	0.038
chr14	0.031	0.034	0.034	0.034
chr15	0.026	0.029	0.029	0.028
chr16	0.025	0.023	0.023	0.024
chr17	0.021	0.021	0.021	0.021
chr18	0.029	0.031	0.028	0.029
chr19	0.011	0.011	0.011	0.012
chr20	0.019	0.020	0.020	0.020
chr21	0.013	0.013	0.014	0.020
chr22	0.008	0.008	0.008	0.008

表 7 表示本實施例中 DOP-PCR 方法製備血液淋巴單細胞基因體 DNA 庫的測序結果中，每條常染色體數據量比例的統計結果，其中 21 三體單細胞(T21)的 21 號染色體數據量比例明顯高於 YH 單

細胞(YH1, YH2, YH3, 均為核型正常), 且 T21 : YH 接近 3 : 2 的比率。說明 DOP-PCR 方法製備單細胞基因體 DNA 庫可以用於染色體數目異常的檢測。

實施例 2

重複實施例 1, 不同點在於 DOP 預擴增反應條件, 樣本以及其他實驗條件相同。DOP 預擴增反應條件見表 8。

表 8

溫度	時間	循環數
94~98°C	2~5 分鐘	1
94~98°C	15 秒~2 分鐘	
10~19°C	20 秒~5 分鐘	
20~30°C	20 秒~5 分鐘	5~25
31~40°C	20 秒~5 分鐘	
65~72°C	15 秒~3 分鐘	
4~12°C	保持	

結果表明，用本實施例的 DOP 預擴增反應條件也能夠達到構建庫並用於下一步檢測的目的。

實施例 3

DOP-PCR 方法製備微量 DNA/cDNA 樣本的庫

本實施例的樣本為微量 DNA/cDNA 樣本，包括微量的基因體 DNA，免疫共沉澱(IP)產物 DNA，血漿游離 DNA(Plasma DNA)，以及 RNA 反轉錄的 cDNA 產物。

IP 產物 DNA、血漿游離 DNA(Plasma DNA)、基因體 DNA(gDNA) 樣本均進行 5 倍梯度稀釋，分別以 200pg、40pg、8pg 的量起始進行庫製備。

cDNA 樣本則是由 1 μ g 的小鼠總 RNA 用六核苷酸隨機引子經 Superscript II 反轉錄酶進行反轉錄而獲得，經過 5 倍梯度稀釋，分別以原濃度、 5^{-1} 、 5^{-2} 、 5^{-3} 濃度起始進行庫製備。

微量 DNA/cDNA 樣本直接加入反應液進行 DOP 預擴增反應，本實施例仍以 pfx 聚合酶為例來說明。

按照說明書配製反應體系，見表 9。

表 9

組分	終濃度
10x Pfx 擴增緩衝液	2x
10x Enhancer Solution	1x
10mM dNTP 混合液	各 0.5mM
50mM MgSO ₄	1mM
DOP 引子	0.8μM
pfx DNA 聚合酶	2U
微量 DNA/cDNA	(按需要)
滅菌蒸餾水	至目標總體積

混合上述各組分，適當覆蓋礦物油。蓋上管蓋，瞬時離心。之後按照下表 10 的反應條件進行 DOP 預擴增。

表 10

溫度	時間	循環數
95°C	5 分鐘	1
95°C	1 分鐘	
15°C	20 分鐘	
25°C	20 分鐘	1~5
35°C	20 分鐘	
68°C	1 分鐘	
4°C	保持	

預擴增結束後，將 DOP-Amp 引子加入預擴增體系中，使其終濃度為 0.4 μ M。

之後按照表 11 的反應條件進行 PCR 反應。

表 11

溫度	時間	循環數
95 $^{\circ}$ C	5 分鐘	1
95 $^{\circ}$ C	1 分鐘	
54 $^{\circ}$ C	30 秒	15~20
68 $^{\circ}$ C	30 秒~1 分鐘	
4 $^{\circ}$ C	保持	

上述 PCR 產物進行電泳及濃度檢測，直接用於下一步 Adaptor-Ligation PCR。Adaptor-Ligation PCR 採用耐熱 DNA 聚合酶 pfx 酶。

配製反應體系見表 12。

表 12

組分	終濃度
10x Pfx 擴增緩衝液	2x
10x Enhancer Solution	1x
10mM dNTP 混合液	各 0.5mM

50mM MgSO ₄	1mM
P5 接頭引子	0.4μM
P7 接頭引子	0.4μM
pfx DNA 聚合酶	1 單位
DOP-PCR 產物模板	10μl
滅菌蒸餾水	至目標總體積

表 12 中的 P5 接頭引子與實施例 1 相同。

P7 接頭引子為：

IP 產物 DNA 樣本 SEQ ID NO : 4

CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAAGCTAGTGACTGGA
G TTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT ;

Plasma DNA 樣本 SEQ ID NO : 5

CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACATCGGTGACTGGA
G TTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT ;

cDNA 樣本 SEQ ID NO : 6

CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCCTAAGTGACTGGA
G TTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT ;

gDNA 樣本 SEQ ID NO : 7

CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGGTCAGTGACTGGA
G TTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT 。

Adaptor-Ligation PCR 反應條件見表 13 。

表 13

溫度	時間	循環數
95°C	5 分鐘	1
95°C	1 分鐘	
54°C	30 秒	3~10
68°C	30 秒~1 分鐘	
95°C	1 分鐘	
62°C	30 秒	5~10
68°C	30 秒~1 分鐘	
4°C	保持	

Adaptor-Ligation PCR 產物即 DNA 片段兩端為 Illumina 接頭序列的庫，電泳膠圖見第 4 圖，第 4 圖表明，在本事實例成功地對四種樣本進行了擴增。

對上述 PCR 產物進行片段大小選擇和純化。切取 200bp-500bp 大小範圍的膠塊，用 Qiagen 公司的 QIAquick Gel Extraction Kit 進行 DNA 片段回收和純化。具體操作見試劑盒說明書。

上述庫經片段選擇和純化後，進行 Agilent 2100 bioanalyzer 檢測，檢測結果見第 5 圖。第 5A 圖為微量基因體 DNA-200pg 檢測結果，第 5B 圖為微量基因體 DNA-40pg 檢測結果，第 5C 圖為免疫沉

澱(IP)DNA-200pg 檢測結果，第 5D 圖為免疫沉澱(IP)DNA-40pg 檢測結果，第 5E 圖為 cDNA-原濃度檢測結果，第 5F 圖為 cDNA-5⁻¹ 檢測結果，第 5G 圖為血漿游離 DNA-200pg 檢測結果。

至此，本事實例用 DOP-PCR 方法製備微量 DNA/cDNA 樣本庫的流程已完成。

用本實施例的方法對製備的庫進行測序，結果表明，製備的庫可以用來進行疾病的檢測和確診。

實施例 4

試劑盒

一種用於製備單細胞及微量核酸的庫的試劑盒，包括以下組分：

- (1)第一容器以及位於容器內的 DOP 引子；
- (2)第二容器以及位於容器內的 DOP-Amp 引子；
- (3)第三容器以及位於容器內的接頭引子；
- (4)第四容器以及位於容器內的用於進行 DOP-PCR 擴增所需的試劑；
- (5)第五容器以及位於容器內的用於核酸純化的試劑；
- (6)第六容器以及位於容器內的用於進行高通量測序的測序晶片(flow cell)；
- (7)說明書。

在本發明提及的所有文獻都在本申請中引用作為參考，就如同

每一篇文獻被單獨引用作為參考那樣。此外應理解，在閱讀了本發明的上述講授內容之後，本領域具有通常知識者可以對本發明作各種改動或修改，這些等價形式同樣落於本申請所附申請專利範圍所限定的範圍。

以上所述僅為本發明之較佳實施例，凡依本發明申請專利範圍所做之均等變化與修飾，皆應屬本發明之涵蓋範圍。

【圖式簡單說明】

下列附圖用於說明本發明的具體實施方案，而不用於限定由申請專利範圍所界定的本發明範圍。

第 1 圖顯示一個典型的構建庫及測序的流程示意圖。

第 2 圖顯示用 DOP-PCR 方法製備單細胞基因體 DNA 庫接頭連接 PCR 產物的電泳圖。

第 3 圖顯示四個樣本(YH1, YH2, YH3, T21)的接頭連接 PCR 產物經片段選擇和純化後，進行片段檢測的結果。

第 3A 圖為樣本 YH1 檢測結果，需要的主帶位於 377bp；第 3B 圖為樣本 YH2 檢測結果，需要的主帶位於 326bp；第 3C 圖為樣本 YH3 檢測結果，需要的主帶位於 339bp；第 3D 圖為樣本 T21 檢測結果，需要的主帶位於 360bp。

第 4 圖顯示用 DOP-PCR 方法製備微量核酸樣本(IP 產物 DNA, Plasma DNA, cDNA, gDNA)的接頭連接 PCR 產物電泳膠圖。

第 5 圖顯示用 DOP-PCR 方法製備微量 DNA/cDNA 樣本的庫，

經片段選擇和純化後片段檢測的結果。

第 5A 圖為微量基因體 DNA-200pg 檢測結果，第 5B 圖為微量基因體 DNA-40pg 檢測結果，第 5C 圖為免疫沉澱(IP)DNA-200pg 檢測結果，第 5D 圖為免疫沉澱(IP)DNA-40pg 檢測結果，第 5E 圖為 cDNA-原濃度檢測結果，第 5F 圖為 cDNA-5⁻¹ 檢測結果，第 5G 圖為血漿游離 DNA-200pg 檢測結果。

【主要元件符號說明】

無

序列表

<110> 深圳華大基因科技有限公司

深圳華大基因研究院

<120> 微量核酸樣本的文庫製備方法及其應用

<130> P2011-0464

<160> 7

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<223> DOP引物

<220>

<221> misc_feature

<222> (14)..(23)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 1

gctcttccga tctnnnnnnn nnn

23

<210> 2

201321518

<211> 13
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<223> DOP-Amp引物

<400> 2
gctcttccga tct

13

<210> 3
<211> 58
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<223> P5接頭引物

<400> 3
aatgatacgg cgaccaccga gatctacact ctttcctac acgacgctct tccgatct

58

<210> 4
<211> 64
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 4
caagcagaag acggcatacg agataagcta gtgactggag ttcagacgtg tgcttctccg

60

atct 64

<210> 5

<211> 64

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 5

caagcagaag acggcatacg agatacatcg gtgactggag ttcagacgtg tgctcttccg 60

atct 64

<210> 6

<211> 64

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 6

caagcagaag acggcatacg agatgcctaa gtgactggag ttcagacgtg tgctcttccg 60

atct 64

<210> 7

<211> 64

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 7

caagcagaag acggcatacg agattggtca gtgactggag ttcagacgtg tgctcttccg 60

atct 64

七、申請專利範圍：

1. 一種製備核酸庫的方法，包含以下步驟：

- a. 提供一待測樣本，該待測樣本含有的核酸總量為 2 皮克~1 微克；
- b. 對該待測樣本進行 DOP-PCR 擴增，獲得第一 PCR 擴增產物；
- c. 用 DOP-Amp 引子對該第一 PCR 擴增產物進行一第二次 PCR 擴增，獲得一第二 PCR 擴增產物；以及
- d. 對獲得的該第二 PCR 擴增產物進行一接頭連接 PCR，獲得一第三 PCR 擴增產物，即為一核酸庫。

2. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，還包括步驟 e：

對該第三 PCR 擴增產物依據片段大小進行選擇。

3. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中步驟 a 的該待測樣本中的 DNA 經亞硫酸氫鹽處理。

4. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中步驟 b 使用帶有一退化性寡核苷酸區的 DOP 引子對樣本 DNA 進行隨機擴增，其中所述的 DOP 引子具有位於 5' 端的非退化性寡核苷酸區和位於中部的退化性寡核苷酸區和 3' 端的錨定區。

5. 如申請專利範圍第 4 項所述之方法，其中所述 DOP 引子的 3' 端錨定區的序列長度為 2-12 個核苷酸。

6. 如申請專利範圍第 5 項所述之方法，其中所述 DOP 引子的 3'端錨定區任選自下組：TG、ATGTGG、TGTGG，或 GTCT。

7. 如申請專利範圍第 4 項所述之方法，其中所述的 DOP 引子的 5'端非退化性寡核苷酸長度為 5-30bp。

8. 如申請專利範圍第 5 項所述之方法，其中所述 DOP 引子的 5'端非退化性寡核苷酸序列如 SEQ ID NO：2 所示。

9. 如申請專利範圍第 5 項所述之方法，其中所述的退化性寡核苷酸序列如(N)m 所示，其中每個鹼基位置上的 N 包括 A、T、G 和 C，m 為 3-20 的正整數。

10. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中步驟 b 使用帶有一退化性寡核苷酸區的 DOP 引子對樣本 DNA 進行隨機擴增，且所述的 DOP 引子具有位於 5'端的非退化性寡核苷酸區和位於中部和 3'端的退化性寡核苷酸區。

11. 如申請專利範圍第 10 項所述之方法，其中所述 DOP 引子的 5'端非退化性寡核苷酸序列如 SEQ ID NO：2 所示。

12. 如申請專利範圍第 11 項所述之方法，其中所述 DOP 引子的 5'

端非退化性寡核苷酸序列如 SEQ ID NO : 2 所示。

13. 如申請專利範圍第 10 項所述之方法，其中所述的退化性寡核苷酸序列如(N)m 所示，其中每個鹼基位置上的 N 包括 A、T、G 和 C，m 為 3-20 的正整數。

14. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中步驟 c 所述的 DOP-Amp 引子與步驟 b 所述的 5'端非退化性寡核苷酸互補，且 DOP-Amp 引子序列結合於 DOP 引子 5'端非退化性寡核苷酸區。

15. 如申請專利範圍第 14 項所述之方法，其中 DOP-Amp 引子序列如 SEQ ID NO : 2 所示。

16. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中步驟 d 用接頭引子進行接頭連接 PCR 擴增；所述的接頭引子為 P5 和 P7，且 P5 和 P7 的 3'端都具有可結合於 DOP-Amp 引子序列的非退化性寡核苷酸區，所述的非退化性寡核苷酸區的序列與 SEQ ID NO : 2 所示序列相同或完全互補，或者與 SEQ ID NO : 2 所示序列有 $\geq 80\%$ 的同源性。

17. 如申請專利範圍第 16 項所述之方法，其中所述的接頭引子 P7 具有標籤序列。

18. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中步驟 e 中所述的依據片

段大小進行選擇為：在第三 PCR 擴增產物中選擇 100-1000bp 長度的片段。

19. 一種檢測微量核酸樣本中核苷酸序列的方法，包含：

(i) 用申請專利範圍第 1-7 中任一項所述的方法所製備的一核酸庫；以及

(ii) 對該核酸庫中的片段進行一測序和數據分析。

20. 如申請專利範圍第 19 項所述之方法，其中該測序包括步驟：

將需要測序的核酸庫與測序晶片上固定的測序探針進行雜交，並進行固相橋式 PCR 擴增，形成測序簇；對所述測序簇用「邊合成-邊測序」法進行測序，獲得樣本中核苷酸序列訊息。

21. 一種可用於申請專利範圍第 1-20 項中任一項方法的試劑盒，其中，所述試劑盒包括：

(1) 第一容器以及位於容器內的用於進行第一 PCR 擴增的 DOP 引子；

(2) 第二容器以及位於容器內的用於進行第二 PCR 擴增的 DOP-Amp 引子；以及

(3) 第三容器以及位於容器內的用於進行第三 PCR 擴增的接頭連接引子。

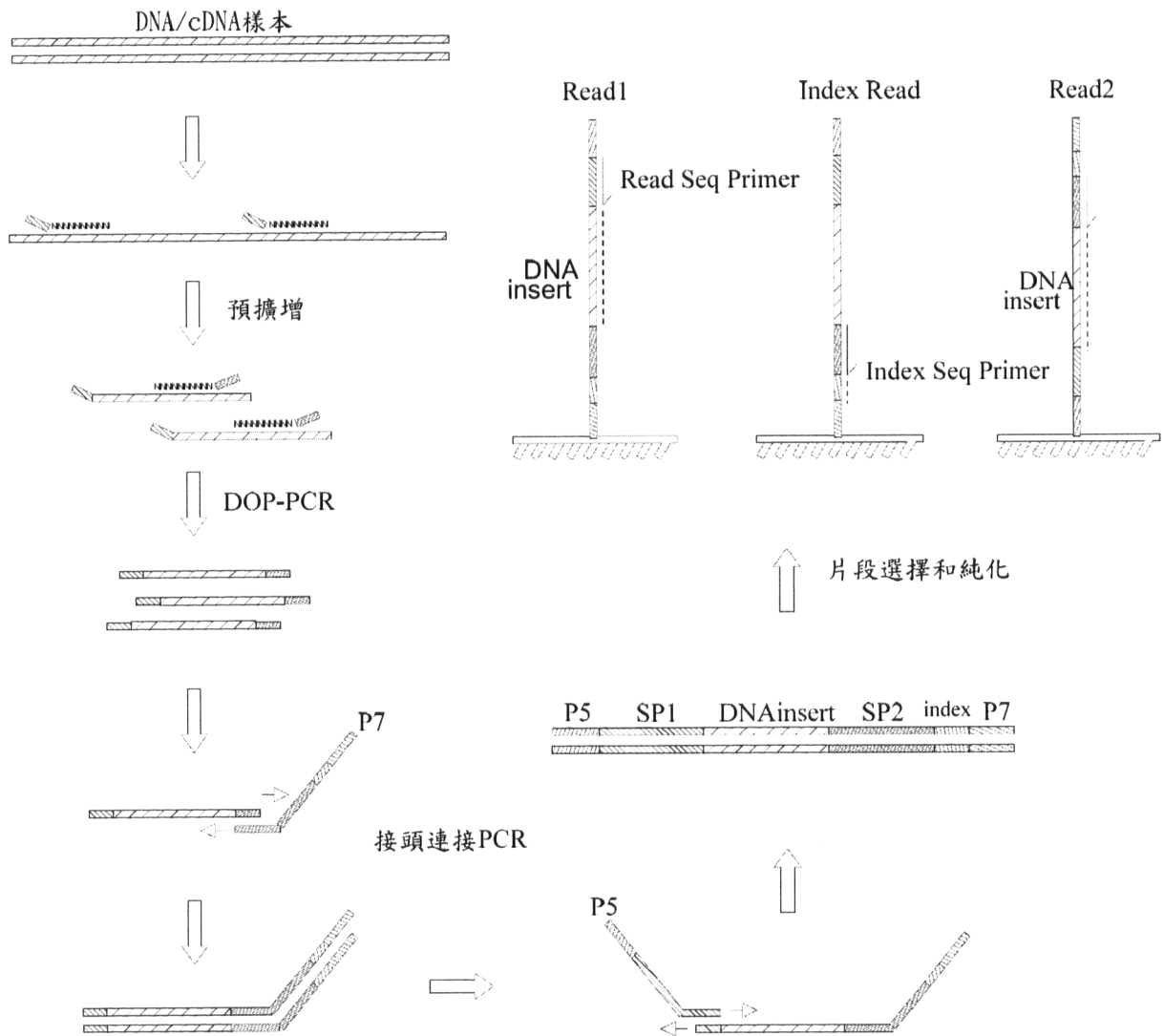
22. 如申請專利範圍第 21 項所述之試劑盒，其中，所述試劑盒還包

括：用於進行 PCR 擴增所需的試劑、用於核酸純化的試劑、用於進行高通量測序的測序晶片、或其組合。

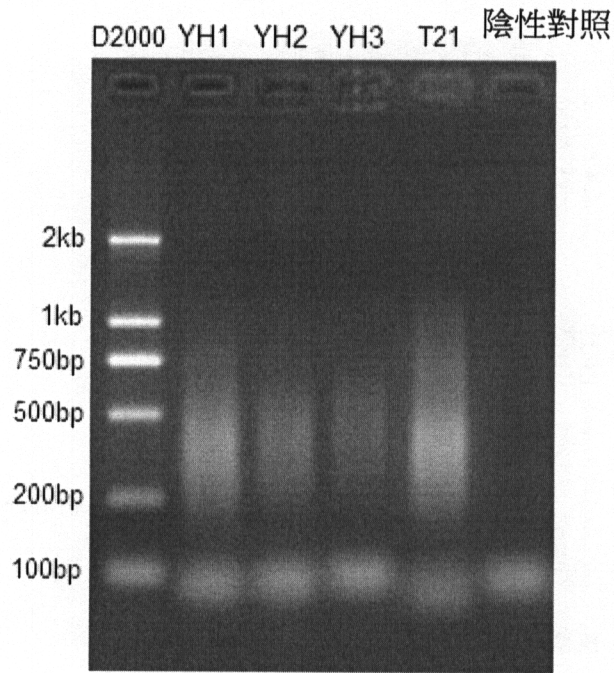
八、圖式：

括：用於進行 PCR 擴增所需的試劑、用於核酸純化的試劑、用於進行高通量測序的測序晶片、或其組合。

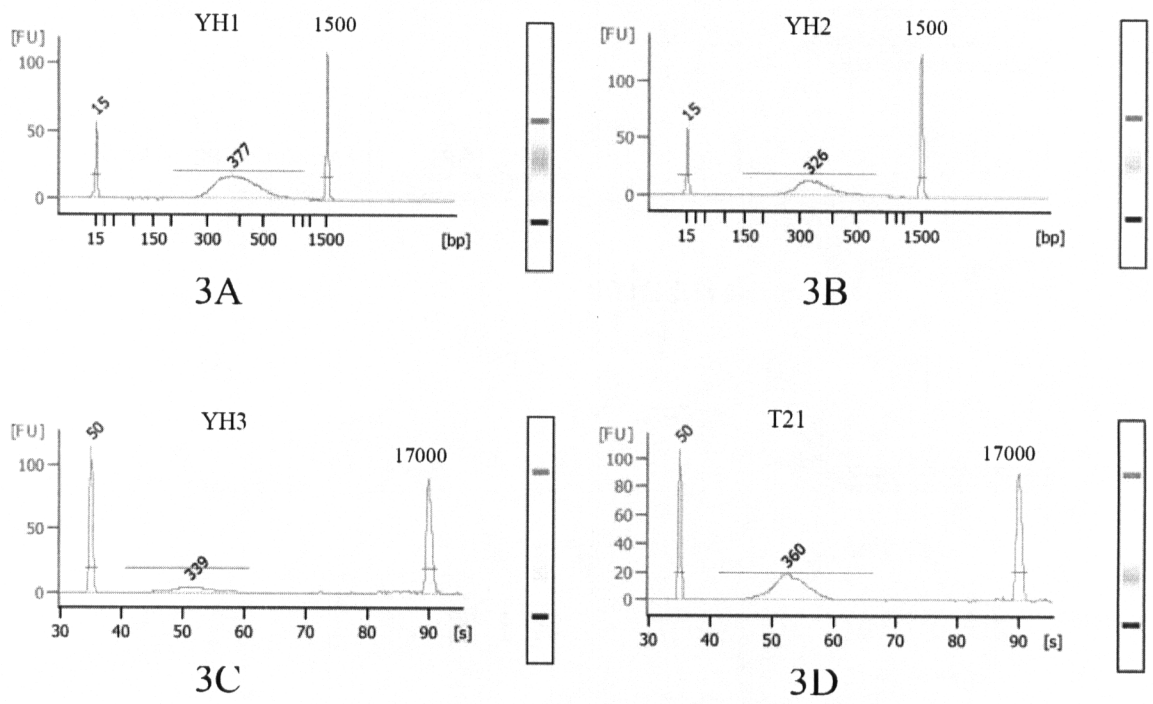
八、圖式：



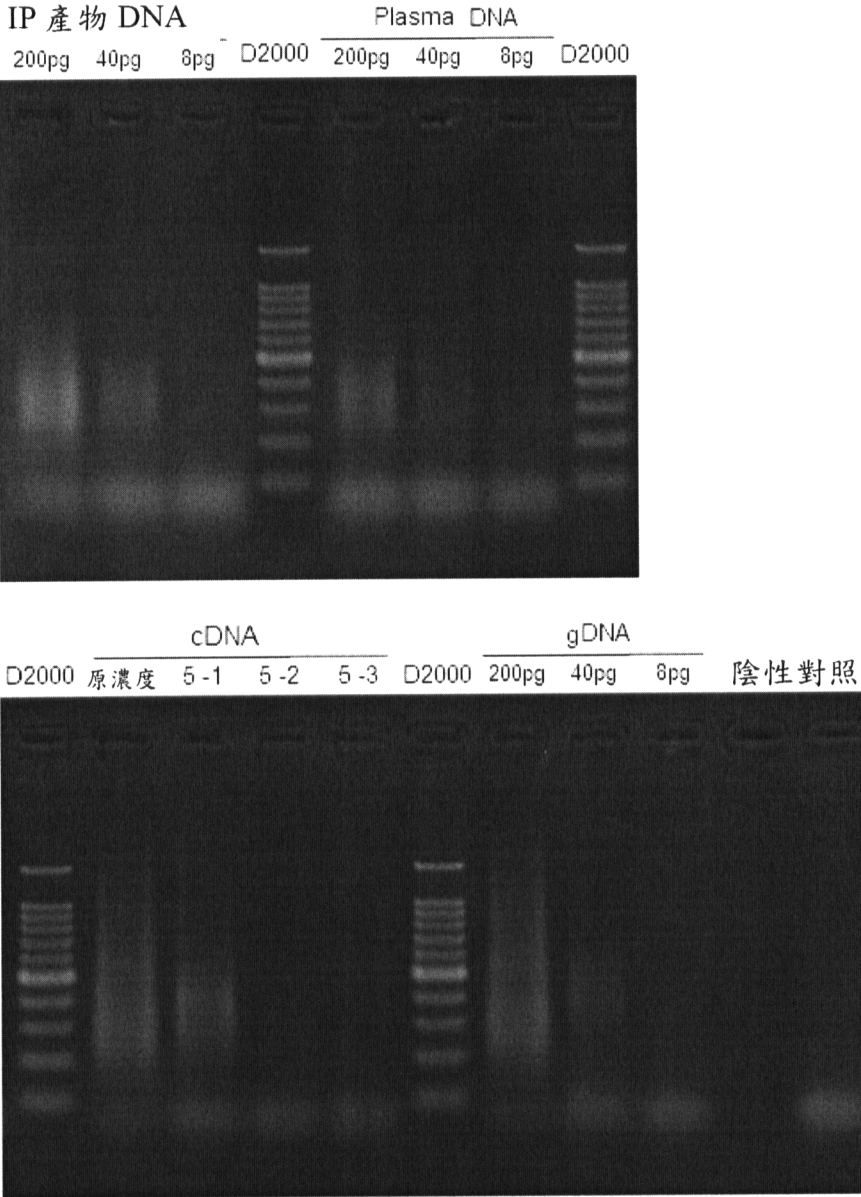
第 1 圖



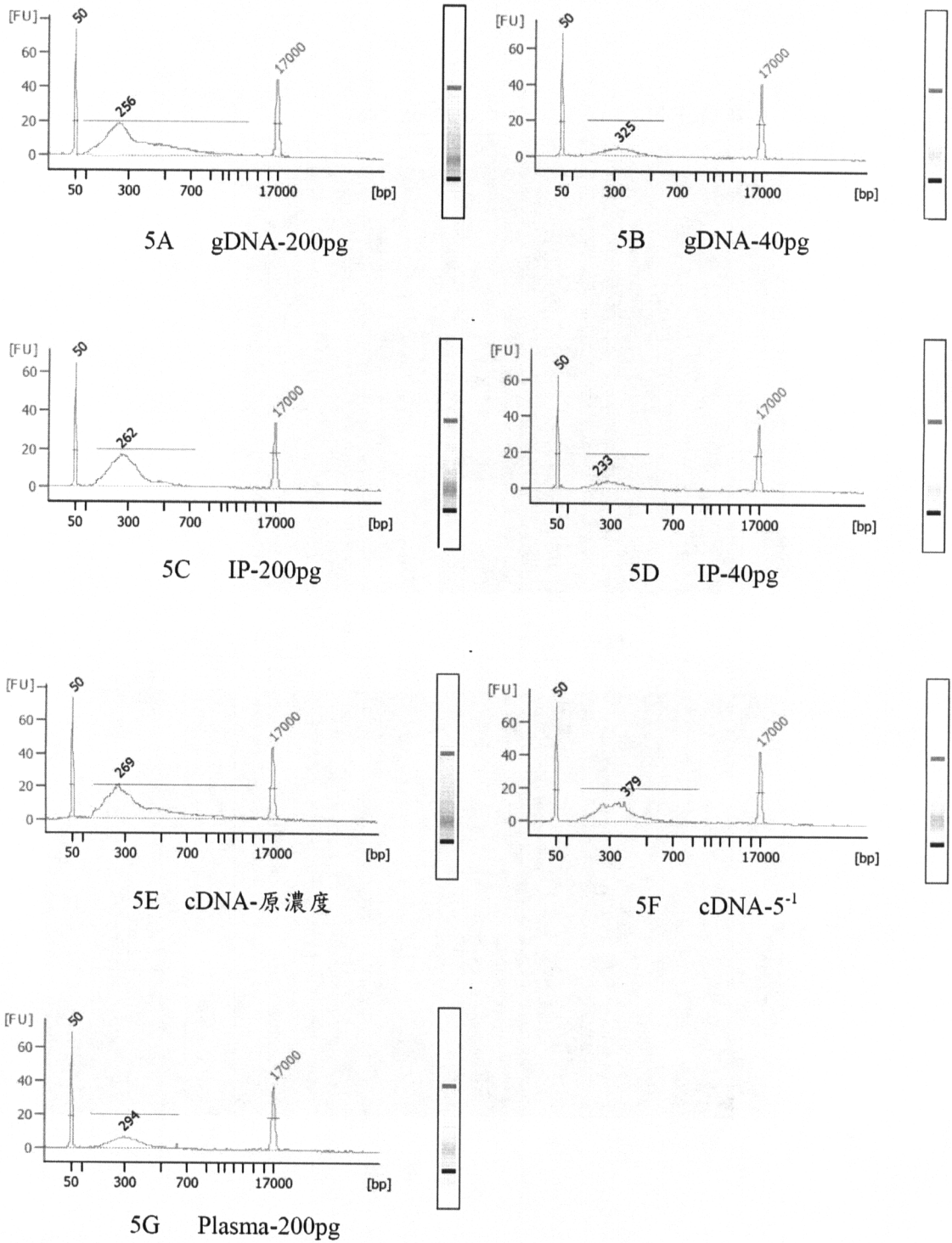
第 2 圖



第 3 圖



第 4 圖



第 5 圖