

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2024 年 12 月 26 日 (26.12.2024)



(10) 国际公布号
WO 2024/259563 A1

(51) 国际专利分类号:
C12Q 1/6844 (2018.01) **C12N 15/11** (2006.01)
C40B 50/06 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/101078

(22) 国际申请日: 2023 年 6 月 19 日 (19.06.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 深圳华大智造科技股份有限公司
(**MGI TECH CO., LTD.**) [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼及 11 栋 2 楼, Guangdong 518083 (CN)。

(72) 发明人: 张艳艳 (**ZHANG, Yanyan**); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼及 11 栋 2 楼, Guangdong 518083 (CN)。 杨林 (**YANG, Lin**); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼及 11 栋 2 楼, Guangdong 518083 (CN)。 刘锋 (**LIU, Feng**); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼及 11 栋 2 楼, Guangdong 518083 (CN)。 杨贵芳 (**YANG, Guifang**); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼及 11 栋 2 楼, Guangdong 518083 (CN)。 夏军 (**XIA, Jun**); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼及 11 栋 2 楼, Guangdong 518083 (CN)。 陈芳 (**CHEN, Fang**); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼及 11 栋 2 楼, Guangdong 518083 (CN)。

(74) 代理人: 广州嘉权专利商标事务所有限公司 (**JIAQUAN IP LAW**); 中国广东省广州市天河区黄埔大道西 100 号富力盈泰广场 A 栋 910, Guangdong 510627 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则 4.17 的声明:

— 发明人资格(细则 4.17(iv))

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

— 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

(54) **Title:** MULTIPLEX RT-PCR AMPLIFICATION METHOD AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种多重 RT-PCR 扩增方法及其应用

(57) **Abstract:** Provided in the present invention is a multiplex RT-PCR amplification method. Primers are designed to be completely or partially complementary hairpin structures, so that the 3'-ends of the primers lose the binding and extension capabilities during an RT process; in addition, the 5'-end strands of the primers comprise one or more cleavage sites at which the 5'-end strands are cleaved by a specific cleavage agent, so that during the RT process, the 5'-end strands of the primers are cleaved at the cleavage sites by means of the specific cleavage agent, but the complementary double strands are maintained. During a high-temperature process of PCR, the cleaved 5'-end strands are free so as to release 3'-end strands to serve as primers for target amplification, thereby regaining the capability of binding primers to templates and the extension capability of 3'-ends.

(57) 摘要: 本发明提供一种多重 RT-PCR 扩增方法, 通过将引物设计为完全或部分互补的发卡结构, 使引物 3' 端在 RT 过程中丧失结合和延伸的能力, 并且引物的 5' 端链包含一个或多个被特异性切割剂切割的切割位点, 从而在 RT 过程中引物的 5' 端链的切割位点被特异性切割剂切割, 但维持互补双链; 在 PCR 的高温过程中, 被切割的 5' 端链游离, 释放出 3' 端链作为靶标扩增的引物, 重新获得 3' 端引物和模板结合和延伸的能力。

WO 2024/259563 A1

一种多重 RT-PCR 扩增方法及其应用

技术领域

本发明属于多重 RT-PCR 扩增技术领域，具体涉及一种多重 RT-PCR 扩增方法及其应用。

背景技术

近年来，分子检测技术飞速发展，广泛应用于包括肿瘤、遗传病、病原微生物检测等领域。随着各种疾病生物标志物的发现，越来越多的生物标准物用于疾病的诊断、治疗和预后。如 ALK-EML 基因融合可用于非小型肺癌的靶向药物治疗，micro RNA、ctDNA 可以用于肿瘤的早期筛查和诊断，hsp65 序列可用于结核分支杆菌的鉴定和分型等。

目前最常用的分子检测技术是 RT-qPCR，其操作简单、检测封闭等优点被临床使用，但由于 RT-qPCR 一次检测的靶标较少，限制了其应用范围。高分辨溶解曲线的发明使 RT-qPCR 在一管中实现多个靶标的检测成为了可能，大大拓展了 RT-qPCR 的应用范围。但对于多重 RT-qPCR 的扩增反应却并不容易，最大的难点在于 RT 步骤和 PCR 步骤是在一个反应，在 RT 过程中的副产物会严重影响后续的 PCR 扩增，主要表现在：1) 特异性引物在 RT 过程中容易和模板非特异性结合，产生非特异性产物，并且在后续的 PCR 扩增中进行指数积累，即多靶标的 RT-qPCR 的 RT 反应中，不同特异性引物 3' 端和模板会有局部的匹配，RT 酶会进行会在局部匹配的情况下发生延伸反应，导致非特异性的产生，并在后续的 PCR 反应中指数放大；2) 特异性引物在 RT 过程中容易互相结合并延伸，形成二聚体，在后续 PCR 过程中指数积累，导致整个反应的提前终止，即多靶标的 RT-qPCR 的 RT 反应中，不同特异性引物 3' 端之间会有局部的匹配，逆转录酶会进行会在局部匹配的情况下发生延伸反应，产生二聚体，在后续的 PCR 过程中指数放大。因此，开发一个多靶标的 RT-qPCR 试剂盒往往需要经过大量的引物设计、调整和优化，整个过程繁琐复杂，随着靶标的数量增加，其优化难度往往也指数增加。因此，急需一种可以有效避免 RT-PCR 中的 RT 反应中的非特异性扩增和二聚体生成的多重 RT-PCR 扩增方法。

发明内容

本发明第一方面的目的，在于提供 RT-PCR 引物。

本发明第二方面的目的，在于提供一种试剂盒。

本发明第三方面的目的，在于提供一种多重 RT-PCR 扩增方法。

为了实现上述目的，本发明所采取的技术方案是：

本发明的第一个方面，提供 RT-PCR 引物，包含：上游引物和下游引物；

所述上游引物从 5' 端到 3' 端依次包含：第一序列和第二序列：

g1) 所述第一序列为与上游特异性序列完全互补的序列，所述第二序列与所述第一序列完全互补（即第二序列为上游特异性序列），即所述上游引物呈完全互补的发卡结构；或

g2) 所述第一序列为与上游特异性序列完全互补的序列，所述第二序列与所述第一序列部分互补（即第二序列为上游特异性序列的部分序列（优选为上游特异性序列的 5' 端序列）），即所述上游引物呈 3' 端部分互补的发卡结构（即具有 5' 突出端的发卡结构）；或

g3) 所述第二序列为上游特异性序列，所述第一序列与所述第二序列部分互补（即第一序列为与上游特异性序列的部分序列互补的序列（优选为与上游特异性序列的 5' 端序列互补的序列）），即所述上游引物呈 5' 端部分互补的发卡结构（即具有 3' 突出端的发卡结构）；

所述下游引物从 5' 端到 3' 端依次包含：第三序列和第四序列：

h1) 所述第三序列为与下游特异性序列完全互补的序列，所述第四序列与所述第三序列完全互补（即

第四序列为下游特异性序列), 即所述下游引物呈完全互补的发卡结构; 或

h2) 所述第三序列为与下游特异性序列完全互补的序列, 所述第四序列与所述第三序列部分互补(即第四序列为下游特异性序列的部分序列(优选为下游特异性序列的5'端序列)), 即所述下游引物呈3'端部分互补的发卡结构(即具有5'突出端的发卡结构); 或

h3) 所述第四序列为下游特异性序列, 所述第三序列与所述第四序列部分互补(即第三序列为与下游特异性序列的部分序列互补的序列(优选为与下游特异性序列的5'端序列互补的序列)), 即所述下游引物呈5'端部分互补的发卡结构(即具有3'突出端的发卡结构);

所述上游引物的5'端链包含一个或多个可以被特异性切割剂切割的切割位点;

所述下游引物的5'端链包含一个或多个可以被特异性切割剂切割的切割位点。

优选地, 所述特异性切割剂包含酶促切割剂。

优选地, 所述酶促切割剂包含核糖核酸酶(例如: 核糖核酸酶H)、糖基化酶(例如: 尿嘧啶-DNA糖基化酶(UDG)、USER酶(例如: 尿嘧啶DNA糖基化酶(UDG)和DNA糖基化酶-裂解酶Endo VIII的混合物)、3-甲基腺嘌呤DNA糖基化酶、3-甲基腺嘌呤DNA糖基化酶II、嘧啶水合物-DNA糖基化酶、FaPy-DNA糖基化酶、胸腺嘧啶错配-DNA糖基化酶(例如: 次黄嘌呤-DNA糖基化酶、尿嘧啶DNA糖基化酶(UDG)、5-羟甲基尿嘧啶DNA糖基化酶(HmUDG)、5-羟甲基胞嘧啶DNA糖基化酶、1,N6-亚乙烯基腺嘌呤DNA糖基化酶))中的至少一种。

优选地, 所述切割位点包含c1)~c2)中至少一种:

c1)核糖核苷酸(rNTP, 例如: rATP、rGTP、tCTP、rUTP);

c2)尿嘧啶脱氧核糖核苷酸(dUTP)。

进一步优选地, 所述切割位点包含c1)。

进一步优选地, 所述酶促切割剂包含核糖核酸酶(例如: 核糖核酸酶H)、糖基化酶(例如: 尿嘧啶-DNA糖基化酶(UDG)、USER酶(例如: 尿嘧啶DNA糖基化酶(UDG)和DNA糖基化酶-裂解酶Endo VIII的混合物)中的至少一种; 更进一步为核糖核酸酶(例如: 核糖核酸酶H)。

优选地, 所述核糖核酸酶H包含核糖核酸酶HI、核糖核酸酶HII中至少一种。

优选地, 所述上游引物的5'端链包含多个可以被特异性切割剂切割的切割位点, 切割位点大于N/10碱基, 例如: 可以是切割位点的个数大于等于(优选大于)n个; 或者是n~N个; 其中, 上述n=N/10, N为第一序列的核苷酸个数; 或者是3~6个。

优选地, 所述下游引物的5'端链包含多个可以被特异性切割剂切割的切割位点, 切割位点大于N/10碱基, 例如: 可以是切割位点的个数大于等于(优选大于)n个; 或者是n~N个; 其中, 上述n=N/10, N为第三序列的核苷酸个数; 或者是3~6个。

优选地, 所述可以被特异性切割剂切割的切割位点的个数为整数。

优选地, 所述多个可以被特异性切割剂切割的切割位点在所述上游引物的5'端链中随机分布。

优选地, 所述多个可以被特异性切割剂切割的切割位点在所述下游引物的5'端链中随机分布。

优选地, 所述第一序列与第二序列直接或间接连接。

优选地, 所述第一序列与第二序列通过以下任意一种方式连接: 碱基连接、linker连接(比如: 间隔(spacer3、spacer6、spacer9、spacer18等))。

优选地, 所述第三序列与第四序列直接或间接连接。

优选地, 所述第三序列与第四序列通过以下任意一种方式连接: 碱基连接、linker连接(比如: 间隔(spacer3、spacer6、spacer9、spacer18等))。

优选地, 所述上游引物的5'端链包含第一序列。

优选地, 所述下游引物的5'端链包含第三序列。

优选地，所述第一序列的核苷酸个数为 20~60。

优选地，所述第三序列的核苷酸个数为 20~60。

优选地，所述第二序列的核苷酸个数为 5~65。

优选地，所述第四序列的核苷酸个数为 5~65。

优选地，所述上游引物呈 3'端部分互补的发卡结构时，所述第一序列与第二序列的核苷酸个数的差值为 1~55。

优选地，所述上游引物呈 5'端部分互补的发卡结构时，所述第二序列与第一序列的核苷酸个数的差值为 3~10。

优选地，所述下游引物呈 3'端部分互补的发卡结构时，所述第三序列与第四序列的核苷酸个数的差值为 1~55。

优选地，所述下游引物呈 5'端部分互补的发卡结构时，所述第四序列与第三序列的核苷酸个数的差值为 3~10。

优选地，所述切割位点包含可以被特异性切割剂切割的核苷酸。

优选地，所述上游引物和下游引物中所述的特异性切割剂可以相同或不同。

优选地，所述上游引物中的多个特异性切割剂可以相同或不同。

优选地，所述下游引物中的多个特异性切割剂可以相同或不同。

优选地，所述上游引物和下游引物中所述的切割位点可以相同或不同。

优选地，所述上游引物中的多个切割位点可以相同或不同。

优选地，所述下游引物中的多个切割位点可以相同或不同。

优选地，所述上游特异性序列和下游特异性序列分别与目标区域的两个区段相同或互补。

优选地，所述 RT-PCR 引物包含多对 RT-PCR 引物。

本发明的第二个方面，提供一种试剂盒，包含：本发明第一个方面的 RT-PCR 引物。

优选地，所述试剂盒还包含：本发明第一个方面中所述特异性切割剂。

优选地，所述试剂盒还包含：具有 3'-5'核酸外切酶活性的 DNA 聚合酶（例如：T4 DNA 聚合酶、DNA 聚合酶 I（Klenow）大片段、DNA 聚合酶 I（E.coli））。

优选地，所述试剂盒还包含：逆转录酶。

优选地，所述试剂盒还包含：逆转录引物。

优选地，所述逆转录引物为 6~12nt 的随机引物；进一步为随机引物（N6）。

优选地，所述逆转录酶包含 AMV 逆转录酶、M-MuLV 逆转录酶中的至少一种。

优选地，所述试剂盒包含：核酸提取试剂组合。

优选地，所述核酸提取试剂组合具体是用于选自以下任意一种方法的核酸提取试剂组合：碱裂解法、酚氯仿抽提法、螯合树脂法、离心柱膜吸附法以及磁珠法。

优选地，所述核酸提取试剂组合包含：裂解液、洗涤液、洗脱液、核酸吸附物中的至少一种；进一步优选地，所述核酸提取试剂组合包含：裂解液、洗涤液、洗脱液和核酸吸附物。

优选地，所述核酸吸附物包含磁珠、吸附膜中的至少一种。

优选地，所述试剂盒用于 d1)~d3)中任一种：

d1)扩增目标区域；

d2)检测目标区域；

d3)构建目标区域的文库（构建靶向文库）。

优选地，所述试剂盒用于检测目标区域时，所述试剂盒还包含：检测探针、核酸染料中的至少一种。

优选地，所述检测探针包含 TaqMan 探针、分子信标、双杂交探针、复合探针中的至少一种；进一步

为 TaqMan 探针。

优选地，所述核酸染料包含 EtBr、SYBR Green、SYBR Gold、GelRed、GelGreen 中的至少一种。

本发明的第三个方面，提供一种多重 RT-PCR 扩增方法，包含采用本发明第一个方面的 RT-PCR 引物的步骤。

优选地，所述多重 RT-PCR 扩增方法包括如下步骤：利用本发明第一个方面的 RT-PCR 引物对待测样本的 RNA 进行多重 RT-PCR 反应。

优选地，所述反应进一步包括：

用所述特异性切割剂处理所述多重 RT-PCR 反应的体系。

优选地，所述多重 RT-PCR 反应的逆转录（RT）反应与扩增（PCR）反应在同一体系中进行。

优选地，所述同一体系具体为在同一反应体系中进行；即无需先在一个反应体系中进行逆转录反应，然后再在其他反应体系中进行扩增反应。

优选地，所述第一序列和第二序列为 g2)、和/或所述第三序列和第四序列为 h2)时，所述多重 RT-PCR 反应还包含所述上游引物和/或所述下游引物延伸的步骤，得到完全互补的发卡结构的上游引物和/或下游引物。

优选地，所述上游引物和/或所述下游引物延伸的步骤与所述多重 RT-PCR 反应的 RT 反应同时进行。

优选地，用所述特异性切割剂处理所述多重 RT-PCR 的反应体系的方法可以是：

使所述多重 RT-PCR 反应的体系包含所述特异性切割剂。

优选地，用所述特异性切割剂处理所述多重 RT-PCR 反应的体系的步骤在所述多重 RT-PCR 反应的 RT 反应过程中或所述多重 RT-PCR 反应的 RT 反应后进行。

优选地，所述多重 RT-PCR 反应的体系还包含：具有 3'-5'核酸外切酶活性的 DNA 聚合酶（优选本发明第二个方面中的具有 3'-5'核酸外切酶活性的 DNA 聚合酶）。

优选地，所述多重 RT-PCR 反应的体系还包含：逆转录酶。

优选地，所述多重 RT-PCR 反应的体系还包含：逆转录引物。

优选地，所述 RNA 通过所述待测样本发生裂解反应得到。

优选地，所述裂解反应在所述多重 RT-PCR 反应之前。

优选地，所述裂解反应和所述多重 RT-PCR 反应在同一体系中进行。

优选地，所述同一体系具体为同一反应容器。

优选地，所述裂解反应后和所述多重 RT-PCR 反应前不包含：提取纯化步骤。

优选地，所述裂解反应后和所述多重 RT-PCR 反应前还包含：提取纯化步骤。

优选地，所述提取纯化进一步包含：沉淀核酸或吸附核酸。

优选地，所述提取纯化后还包含：洗脱或溶解核酸。

优选地，所述裂解反应和所述多重 RT-PCR 反应在不同体系中进行，即不在同一体系中进行。

优选地，所述同一体系具体为同一反应容器。

优选地，所述裂解反应后还包含：提取纯化步骤。

优选地，所述提取纯化进一步包含：沉淀核酸或吸附核酸。

优选地，所述提取纯化后还包含：洗脱或溶解核酸。

优选地，所述裂解的方法包含：物理方式、化学方式、生物方式中的至少一种。

优选地，所述多重 RT-PCR 反应的体系中还包含检测探针、核酸染料中的至少一种。

优选地，所述检测探针包含 TaqMan 探针、分子信标、双杂交探针、复合探针中的至少一种；

优选地，所述核酸染料包含 EtBr、SYBR Green、SYBR Gold、GelRed、GelGreen 中的至少一种。

本发明的有益效果是：

本发明提供了 RT-PCR 引物，发明人创造性地将引物（上游引物和/或下游引物）设计为完全互补或部分互补的发卡结构（3'端部分互补的发卡结构或 5'端部分互补的发卡结构），从而使引物 3'端在 RT 过程中丧失结合能力（不与模板发生非特异性结合和/或避免引物之间结合）和延伸能力，并且该引物的 5'端链包含一个或多个可以被特异性切割剂切割的切割位点，从而在 RT-PCR 的 RT 过程中引物的 5'端链的切割位点被特异性切割剂切割（对于 3'端部分互补的发卡结构还包含引物在逆转录酶和/或 DNA 聚合酶的作用下延伸得到完全互补的发卡结构的步骤），但在 RT 过程中维持互补的双链状态；在后续的 PCR 的高温过程（例如热变性）中，被切割的 5'端链游离，释放出 3'端链作为目标区域扩增的引物，重新获得引物 3'端与模板结合和延伸的能力；采用本发明的 RT-PCR 引物可以实现一步法扩增，并且可以有效避免 RT 过程中多对引物在逆转录酶体系的作用下形成二聚体，以及多对引物在逆转录酶体系的作用下和模板非特异性结合，产生非特异性产物，大幅度提高 PCR 扩增的效率以及检测的灵敏度和特异性。

附图说明

图 1 是本发明的引物的结构示意图。

图 2 是本发明的引物进行 RT-PCR 扩增的原理图。

图 3 是实施例 1 和对比例 1 的荧光检测结果图。

图 4 是实施例 1 和对比例 1 的扩增产物的电泳图。

具体实施方式

在本发明的描述中，术语“第一”、“第二”、“第三”、“第四”仅用于描述目的，而不能理解为指示或暗示相对重要性或者隐含指明所指示的技术特征的数量。由此，限定有“第一”、“第二”、“第三”的特征可以明示或者隐含地包括至少一个该特征。在本发明的描述中，“多个”的含义是至少两个，例如两个，三个等，除非另有明确具体的限定。

本发明的第一个方面，提供 RT-PCR 引物，包含：上游引物和下游引物；

所述上游引物从 5'端到 3'端依次包含：第一序列和第二序列：

g1) 所述第一序列为与上游特异性序列完全互补的序列，所述第二序列与所述第一序列完全互补（即第二序列为上游特异性序列），即所述上游引物呈完全互补的发卡结构；或

g2) 所述第一序列为与上游特异性序列完全互补的序列，所述第二序列与所述第一序列部分互补（即第二序列为上游特异性序列的部分序列（优选为上游特异性序列的 5'端序列）），即所述上游引物呈 3'端部分互补的发卡结构（即具有 5'突出端的发卡结构）；或

g3) 所述第二序列为上游特异性序列，所述第一序列与所述第二序列部分互补（即第一序列为与上游特异性序列的部分序列互补的序列（优选为与上游特异性序列的 5'端序列互补的序列）），即所述上游引物呈 5'端部分互补的发卡结构（即具有 3'突出端的发卡结构）；

所述下游引物从 5'端到 3'端依次包含：第三序列和第四序列：

h1) 所述第三序列为与下游特异性序列完全互补的序列，所述第四序列与所述第三序列完全互补（即第四序列为下游特异性序列），即所述下游引物呈完全互补的发卡结构；或

h2) 所述第三序列为与下游特异性序列完全互补的序列，所述第四序列与所述第三序列部分互补（即第四序列为下游特异性序列的部分序列（优选为下游特异性序列的 5'端序列）），即所述下游引物呈 3'端部分互补的发卡结构（即具有 5'突出端的发卡结构）；或

h3) 所述第四序列为下游特异性序列，所述第三序列与所述第四序列部分互补（即第三序列为与下游特异性序列的部分序列互补的序列（优选为与下游特异性序列的 5'端序列互补的序列）），即所述下游引物呈 5'端部分互补的发卡结构（即具有 3'突出端的发卡结构）；

所述上游引物的 5'端链包含一个或多个可以被特异性切割剂切割的切割位点；

所述下游引物的 5'端链包含一个或多个可以被特异性切割剂切割的切割位点。

对于上述 RT-PCR 引物中的第一序列、第二序列、第三序列和第四序列，存在以下九种组合：

a1): g1)和 h1); a2): g1)和 h2); a3): g1)和 h3); a4): g2) 和 h1); a5): g2) 和 h2); a6): g2) 和 h3); a7): g3) 和 h1); a8): g3) 和 h2); a9): g3) 和 h3)。

优选地，所述第一序列为与上游特异性序列完全互补的序列，所述第二序列与所述第一序列完全互补（即第二序列为上游特异性序列），所述第三序列为与下游特异性序列完全互补的序列，所述第四序列与所述第三序列完全互补（即第四序列为下游特异性序列）。

在多重 RT-PCR 过程中，RT 过程中的副产物严重影响了 PCR 过程，主要表现在：b1) 不同特异性引物 3'端和模板会有局部的匹配，逆转录酶会进行会在局部匹配的情况下发生延伸反应，导致非特异性产物的产生，并在后续的 PCR 反应中指数放大；b2) 不同特异性引物 3'端之间会有局部的匹配，逆转录酶会进行会在局部匹配的情况下发生延伸反应，产生二聚体，在后续的 PCR 过程中指数放大；

在本发明中，发明人创造性地将引物（上游引物和/或下游引物）设计为完全互补或部分互补的发卡结构（3'端部分互补的发卡结构或 5'端部分互补的发卡结构），从而使引物 3'端在 RT 过程中丧失结合能力（不与模板发生非特异性结合和/或避免引物之间结合）和延伸能力，并且该引物的 5'端链包含一个或多个可以被特异性切割剂切割的切割位点（图 1），从而在 RT-PCR 的 RT 过程中引物的 5'端链的切割位点被特异性切割剂切割（对于 3'端部分互补的发卡结构的引物还包含引物在逆转录酶和/或 DNA 聚合酶的作用下延伸得到完全互补的发卡结构的引物的步骤），但在 RT 过程中维持互补的双链状态；在后续的 PCR 的高温过程（例如热变性）中，被切割的 5'端链游离，释放出 3'端链作为目标区域扩增的引物，重新获得引物 3'端与模板结合和延伸的能力，对于完全互补或部分互补的发卡结构的引物的扩增原理（图 2）具体如下：

e1)引物结构为完全互补的发卡结构：特异性序列（上游特异性序列和/或下游特异性序列，对应上述的第二序列和第四序列）和与其完全互补的寡核苷酸链（例如 DNA 链，对应上述的第一序列和第三序列）形成“封闭”发卡结构，可以阻止引物在 RT 过程中和模板非特异性结合以及引物之间的结合，其中，引物的 5'端链包含一个或多个被可以被特异性切割剂切割的切割位点，从而在 RT-PCR 的 RT 过程中引物的 5'端链的切割位点被特异性切割剂切割，但在 RT 过程中维持互补的双链状态；在后续的 PCR 的高温过程（例如热变性）中，被切割的 5'端链游离，释放出 3'端链作为目标区域扩增的引物；

e2)引物结构为部分互补的发卡结构：

e21)当引物结构为 3'端部分互补的发卡结构时，与特异性序列（上游特异性序列和/或下游特异性序列）互补的寡核苷酸链（对应上述的第一序列和第三序列）和部分特异性序列（特异性序列的 5'端序列，对应上述的第二序列和第四序列）形成 3'端部分互补的发卡结构（即具有 5'突出端的发卡结构），其中，引物的 5'端链包含一个或多个可以被特异性切割剂切割的切割位点；首先，RT 过程中，引物在逆转录酶和/或 DNA 聚合酶的作用下延伸，得到包含特异性序列全序列的引物，并形成完全互补的发卡结构；并且，引物的 5'端链的切割位点被特异性切割剂切割，但在 RT 过程中维持互补的双链状态；在后续的 PCR 的高温过程（例如热变性）中，被切割的 5'端链游离，释放出 3'端链作为目标区域扩增的引物；

e22)当引物结构为 5'端部分互补的发卡结构时，特异性序列（上游特异性序列和/或下游特异性序列，对应上述的第二序列和第四序列）和与其部分序列互补的寡核苷酸链（优选与特异性序列的 5'端序列互补的序列，例如 DNA 链，对应上述的第一序列和第三序列）形成 5'端部分互补的发卡结构，可以阻止引物在 RT 过程中和模板非特异性结合以及引物之间的结合，其中，引物的 3'突出 3 个碱基以上的末端可以防止被逆转录酶非特异性加上碱基或者可以被具有 3' -5' 核酸外切酶活性的 DNA 聚合酶切割成平末端，且引物的 5'端链包含一个或多个被可以被特异性切割剂切割的切割位点，从而在 RT-PCR 的 RT 过程中引物的 5'端链的切割位点被特异性切割剂切割，但在 RT 过程中维持部分互补或完全互补的双链状态；在后续的 PCR 的高温过程（例如热变性）中，被切割的 5'端链游离，释放出 3'端链作为目标区域扩增的引物。

采用本发明的 RT-PCR 引物可以实现一步法扩增，并且可以有效避免 RT 过程中多对引物在逆转录酶

体系的作用下形成二聚体，以及多对引物在逆转录酶体系的作用下和模板非特异性结合，产生非特异性产物，大幅度提高 PCR 扩增的效率以及检测的灵敏度和特异性。

优选地，所述上游特异性序列和下游特异性序列分别与目标区域的两个区段相同或互补。

优选地，所述引物（上游引物和/或下游引物）中的特异性序列（上游特异性序列和/或下游特异性序列）的设计遵循常规的引物设计原则，比如：上游特异性序列与目标区域上游负链（即反义链、cDNA 第二链）序列互补或正链（即有义链、cDNA 第一链）序列相同，下游特异性序列与目标区域的下游正链（即有义链、cDNA 第一链）序列互补或负链（即反义链、cDNA 第二链）序列相同。

优选地，所述上游特异性序列与目标区域的上游负链序列互补或正链序列相同。

优选地，所述下游特异性序列与目标区域的下游正链序列互补或负链序列相同。

优选地，所述特异性切割剂包含酶促切割剂。

优选地，所述酶促切割剂包含核糖核酸酶（例如：核糖核酸酶 H）、糖基化酶（例如：尿嘧啶-DNA 糖基化酶(UDG)、USER 酶（例如：尿嘧啶 DNA 糖基化酶（UDG）和 DNA 糖基化酶-裂解酶 Endo VIII 的混合物）、3-甲基腺嘌呤 DNA 糖基化酶、3-甲基腺嘌呤 DNA 糖基化酶 II、嘧啶水合物-DNA 糖基化酶、FaPy-DNA 糖基化酶、胸腺嘧啶错配-DNA 糖基化酶（例如：次黄嘌呤-DNA 糖基化酶、尿嘧啶 DNA 糖基化酶(UDG)、5-羟甲基尿嘧啶 DNA 糖基化酶(HmUDG)、5-羟甲基胞嘧啶 DNA 糖基化酶、1,N6-亚乙烯基腺嘌呤 DNA 糖基化酶))中的至少一种。

优选地，所述切割位点包含 c1)~c2)中至少一种：

c1)核糖核苷酸（rNTP，例如：rATP、rGTP、tCTP、rUTP），其对应的特异性切割剂为核糖核酸酶（例如：核糖核酸酶 H），当 rNTP 为 rUTP 时，其对应的特异性切割剂也可以是尿嘧啶-DNA 糖基化酶(UDG)或 USER 酶（尿嘧啶 DNA 糖基化酶（UDG）和 DNA 糖基化酶-裂解酶 Endo VIII 的混合物）；

c2)尿嘧啶脱氧核糖核苷酸（dUTP），其对应的特异性切割剂是尿嘧啶-DNA 糖基化酶(UDG)或 USER 酶（尿嘧啶 DNA 糖基化酶（UDG）和 DNA 糖基化酶-裂解酶 Endo VIII 的混合物）。

进一步优选地，所述切割位点包含 c1)。

进一步优选地，所述酶促切割剂包含核糖核酸酶（例如：核糖核酸酶 H）、糖基化酶（例如：尿嘧啶-DNA 糖基化酶(UDG)、USER 酶（例如：尿嘧啶 DNA 糖基化酶（UDG）和 DNA 糖基化酶-裂解酶 Endo VIII 的混合物）中的至少一种；更进一步为核糖核酸酶（例如：核糖核酸酶 H）。

优选地，所述核糖核酸酶 H 包含核糖核酸酶 H I、核糖核酸酶 H III 中至少一种。

优选地，所述上游引物和下游引物中所述的特异性切割剂可以相同或不同。

优选地，所述上游引物中的多个特异性切割剂可以相同或不同。

优选地，所述下游引物中的多个特异性切割剂可以相同或不同。

优选地，所述上游引物和下游引物中所述的切割位点可以相同或不同。

优选地，所述上游引物中的多个切割位点可以相同或不同。

优选地，所述下游引物中的多个切割位点可以相同或不同。

优选地，所述上游引物的 5'端链包含多个可以被特异性切割剂切割的切割位点，切割位点大于 N/10 碱基，例如：可以是切割位点的个数大于等于（优选大于）n 个；或者是 n~N 个；其中，上述 n=N/10，N 为第一序列的核苷酸个数；或者是 3~6 个。

优选地，所述下游引物的 5'端链包含多个可以被特异性切割剂切割的切割位点，切割位点大于 N/10 碱基，例如：可以是切割位点的个数大于等于（优选大于）n 个；或者是 n~N 个，其中，上述 n=N/10，N 为第三序列的核苷酸个数；或者是 3~6 个。

优选地，所述可以被特异性切割剂切割的切割位点的个数为整数。

优选地，所述多个可以被特异性切割剂切割的切割位点在所述上游引物的 5'端链中随机分布。

优选地，所述多个可以被特异性切割剂切割的切割位点在所述下游引物的 5' 端链中随机分布。

优选地，所述第一序列与第二序列直接或间接连接。

优选地，所述第一序列与第二序列通过以下任意一种方式连接：碱基连接、linker 连接（比如：间隔（spacer3、spacer6、spacer9、spacer18 等））。

优选地，所述第三序列与第四序列直接或间接连接。

优选地，所述第三序列与第四序列通过以下任意一种方式连接：碱基连接、linker 连接（比如：间隔（spacer3、spacer6、spacer9、spacer18 等））。

优选地，所述上游引物的 5' 端链包含第一序列。

优选地，所述下游引物的 5' 端链包含第三序列。

优选地，所述第一序列的核苷酸个数为 20~60。

优选地，所述第三序列的核苷酸个数为 20~60。

优选地，所述第二序列的核苷酸个数为 5~65。

优选地，所述第四序列的核苷酸个数为 5~65。

优选地，所述上游引物呈 3' 端部分互补的发卡结构时，所述第一序列与第二序列的核苷酸个数的差值为 1~55。

优选地，所述上游引物呈 5' 端部分互补的发卡结构时，所述第二序列与第一序列的核苷酸个数的差值为 3~10。

优选地，所述下游引物呈 3' 端部分互补的发卡结构时，所述第三序列与第四序列的核苷酸个数的差值为 1~55。

优选地，所述下游引物呈 5' 端部分互补的发卡结构时，所述第四序列与第三序列的核苷酸个数的差值为 3~10。

优选地，所述切割位点包含可以被特异性切割剂切割的核苷酸。

优选地，所述 RT-PCR 引物为 DNA 片段或其类似物。

优选地，所述 RT-PCR 引物包含多对 RT-PCR 引物。

优选地，所述多对为两对以上。

优选地，检测 SARS-COV-2 基因的 RT-PCR 引物，包含：上游引物和下游引物；

所述上游引物的序列如 SEQ ID NO.1、4、7、10、13 所示，所述下游引物的序列如 SEQ ID NO.2、5、8、11、14 所示；

序列如 SEQ ID NO.1、4、7、10、13 所示的上游引物的 5' 端各自独立包含一个或多个可以被特异性切割剂切割的切割位点；

序列如 SEQ ID NO.2、5、8、11、14 所示的下游引物的 5' 端各自独立包含一个或多个可以被特异性切割剂切割的切割位点。

优选地，所述特异性切割剂包含酶促切割剂。

优选地，所述酶促切割剂包含核糖核酸酶（例如：核糖核酸酶 H）、糖基化酶（例如：尿嘧啶-DNA 糖基化酶(UDG)、USER 酶（例如：尿嘧啶 DNA 糖基化酶（UDG）和 DNA 糖基化酶-裂解酶 Endo VIII 的混合物）、3-甲基腺嘌呤 DNA 糖基化酶、3-甲基腺嘌呤 DNA 糖基化酶 II、嘧啶水合物-DNA 糖基化酶、FaPy-DNA 糖基化酶、胸腺嘧啶错配-DNA 糖基化酶（例如：次黄嘌呤-DNA 糖基化酶、尿嘧啶 DNA 糖基化酶(UDG)、5-羟甲基尿嘧啶 DNA 糖基化酶(HmUDG)、5-羟甲基胞嘧啶 DNA 糖基化酶、1,N6-亚乙烯基腺嘌呤 DNA 糖基化酶))中的至少一种。

优选地，所述切割位点包含 c1)~c2)中至少一种：

c1)核糖核苷酸（rNTP，例如：rATP、rGTP、tCTP、rUTP），其对应的特异性切割剂为核糖核酸酶（例

如：核糖核酸酶 H），当 rNTP 为 rUTP 时，其对应的特异性切割剂也可以是尿嘧啶-DNA 糖基化酶(UDG)或 USER 酶（例如：尿嘧啶 DNA 糖基化酶（UDG）和 DNA 糖基化酶-裂解酶 Endo VIII 的混合物）；

c2)尿嘧啶脱氧核糖核苷酸（dUTP），其对应的特异性切割剂是尿嘧啶-DNA 糖基化酶(UDG)或 USER 酶（例如：尿嘧啶 DNA 糖基化酶（UDG）和 DNA 糖基化酶-裂解酶 Endo VIII 的混合物）。

进一步优选地，所述切割位点包含 c1)。

进一步优选地，所述酶促切割剂包含核糖核酸酶（例如：核糖核酸酶 H）、糖基化酶（例如，尿嘧啶-DNA 糖基化酶(UDG)、USER 酶（例如：尿嘧啶 DNA 糖基化酶（UDG）和 DNA 糖基化酶-裂解酶 Endo VIII 的混合物）中的至少一种；更进一步为核糖核酸酶（例如：核糖核酸酶 H）。

优选地，所述核糖核酸酶 H 包含核糖核酸酶 H I、核糖核酸酶 H II 中至少一种。

优选地，序列如 SEQ ID NO. 1、4、7、10、13 所示的上游引物的核糖核苷酸的位置如表 1 及附注所示。

优选地，序列如 SEQ ID NO. 2、5、8、11、14 所示的下游引物的核糖核苷酸的位置如表 2 及附注所示。

优选地，所述 RT-PCR 引物用于待测样本的 RNA 的扩增。

优选地，所述待测样本包含细胞、组织、体液、微生物、唾液、尿液、痰液、粪便、咽拭子、鼻拭子。

优选地，所述体液包含组织液、淋巴液、血液、脑脊液中的至少一种。

优选地，所述微生物包含细菌、病毒、真菌、放线菌、立克次氏体、支原体、衣原体、螺旋体中的至少一种。

优选地，所述 RNA 包含 mRNA、lncRNA、small RNA、cfRNA 和 tRNA 中的至少一种。

优选地，所述 small RNA 可为 miRNA、siRNA 和 piRNA 中的至少一种。

本发明的第二个方面，提供一种试剂盒，包含：本发明第一个方面的 RT-PCR 引物。

优选地，所述试剂盒还包含：所述特异性切割剂，其用于 RT-PCR 的 RT 过程中完全互补或部分互补的发卡结构的引物（上游引物和/或下游引物）的 5'端链的切割位点的切割。

优选地，所述试剂盒还包含：具有 3'-5'核酸外切酶活性的 DNA 聚合酶（例如：T4 DNA 聚合酶、DNA 聚合酶 I（Klenow）大片段、DNA 聚合酶 I（E.coli）），其用于保持所述引物（上游引物和/或下游引物）3'端平末端结构（抑制逆转录酶的末端转移活性），该 DNA 聚合酶也可以用于引物（上游引物和/或下游引物）延伸，得到包含特异性序列全序列的引物，并形成完全互补的发卡结构（所述第二序列与所述第一序列部分互补和/或所述第四序列与所述第三序列部分互补时）。

优选地，所述试剂盒还包含：逆转录反应混合液，其用于逆转录反应（即将 RNA 逆转录为 cDNA）。

优选地，所述逆转录反应混合液包含：逆转录酶、DNA 聚合酶、逆转录缓冲液、逆转录引物、dNTPs、RNA 酶抑制剂中的至少一种；优选地，所述逆转录反应混合液包含：逆转录酶、DNA 聚合酶、逆转录缓冲液、dNTPs、RNA 酶抑制剂和逆转录引物；其中的逆转录酶和/或 DNA 聚合酶也可以用于引物（上游引物和/或下游引物）延伸，得到包含特异性序列全序列的引物，并形成完全互补的发卡结构（所述引物结构为 3'端部分互补的发卡结构时）；对于试剂盒中已经包含的组分，所述逆转录反应混合液可以相应地减少该组分：比如：所述试剂盒包含具有 3'-5'核酸外切酶活性的 DNA 聚合酶时，所述逆转录反应混合液可以不含 DNA 聚合酶。

优选地，所述逆转录引物为 6-12nt 的随机引物；进一步为随机引物（N6）。

优选地，所述逆转录酶包含 AMV 逆转录酶、M-MuLV 逆转录酶中的至少一种。

优选地，所述试剂盒还包含：PCR 反应混合液，其用于 PCR 反应。

优选地，所述 PCR 反应混合液包含：DNA 聚合酶、Mg²⁺、PCR 缓冲液、dNTPs 中的至少一种；进一步优选地，所述 PCR 反应混合液还包含：DNA 聚合酶、Mg²⁺、PCR 缓冲液和 dNTPs；其中的 DNA 聚合

酶也可以用于引物（上游引物和/或下游引物）延伸，得到包含特异性序列全序列的引物，并形成完全互补的发卡结构（所述引物结构为 3'端部分互补的发卡结构时）；对于试剂盒已经包含的组分，所述 PCR 反应混合液可以相应地减少该组分，比如：所述试剂盒包含具有 3'-5'核酸外切酶活性的 DNA 聚合酶，和/或所述试剂盒的逆转录反应液中包含 DNA 聚合酶时，所述 PCR 反应混合液可以不包含 DNA 聚合酶。

优选地，所述 DNA 聚合酶为耐高温 DNA 聚合酶（例如 Taq DNA 聚合酶）；进一步为 Taq 热启动 DNA 聚合酶。

优选地，所述试剂盒包含：核酸提取试剂组合。

优选地，所述核酸提取试剂组合具体是用于选自以下任意一种方法的核酸提取试剂组合：碱裂解法、酚氯仿抽提法、螯合树脂法、离心柱膜吸附法以及磁珠法。

优选地，所述核酸提取试剂组合包含：裂解液、洗涤液、洗脱液、核酸吸附物中的至少一种；进一步优选地，所述核酸提取试剂组合包含：裂解液、洗涤液、洗脱液和核酸吸附物。

优选地，所述核酸吸附物包含磁珠、吸附膜中的至少一种。

优选地，所述试剂盒用于 d1)~d3)中任一种：

d1)扩增目标区域；

d2)检测目标区域；

d3)构建目标区域的文库（构建靶向文库）。

优选地，所述试剂盒用于检测目标区域时，所述试剂盒还包含：检测探针、核酸染料中的至少一种；进一步包含检测探针，所述检测探针是现有 RT-qPCR 中常用的探针，本领域技术人员可以基于所需要检测的目标区域设计。

优选地，所述检测探针包含 TaqMan 探针、分子信标、双杂交探针、复合探针中的至少一种；进一步为 TaqMan 探针。

优选地，所述核酸染料包含 EtBr、SYBR Green、SYBR Gold、GelRed、GelGreen 中的至少一种。

优选地，所述试剂盒用于检测 SARS-COV-2 基因时，所述 RT-PCR 引物为本发明第一个方面的检测 SARS-COV-2 基因的 RT-PCR 引物。

优选地，所述试剂盒用于检测 SARS-COV-2 基因时，所述试剂盒还包含检测 SARS-COV-2 基因的探针，所述检测 SARS-COV-2 基因的探针的序列如 SEQ ID NO. 3、6、9、10、15 所示。

优选地，所述检测 SARS-COV-2 基因的探针的两端分别连接有淬灭基团和荧光基团。

优选地，所述荧光基团包含 FAM、TET、VIC、HEX、Cy5、ROX、Texas Red、Tamara、JOE 中的至少一种；进一步优选地，所述荧光基团包含 FAM。

优选地，所述淬灭基团包含 BHQ1、BHQ2、BHQ3、MGB 中至少一种；进一步优选地，所述淬灭基团包含 BHQ1。

优选地，所述试剂盒用于构建目标区域的文库时，所述试剂盒还包含：用于添加测序接头的试剂。

优选地，所述用于添加测序接头的试剂是选自以下任一种添加测序接头的方法：通过 PCR 添加测序接头的方法，通过连接酶添加测序接头的方法。

本发明的第三个方面，提供一种测序试剂套装，包含：采用本发明第二个方面的试剂盒。

优选地，所述测序试剂套装还包含：测序试剂盒。

本发明的第四个方面，提供一种测序系统，包含：测序仪和本发明第三个方面的测序试剂套装。

本发明的第五个方面，提供一种多重 RT-PCR 扩增方法，包含采用本发明第一个方面的 RT-PCR 引物的步骤。

优选地，所述多重 RT-PCR 扩增方法包括如下步骤：利用本发明第一个方面的 RT-PCR 引物对待测样本的 RNA 进行多重 RT-PCR 反应。

优选地，所述反应进一步包括：

用所述特异性切割剂处理所述多重 RT-PCR 反应的体系。

优选地，所述多重 RT-PCR 反应的逆转录（RT）反应与扩增（PCR）反应在同一体系中进行。

优选地，所述同一体系具体为在同一反应体系中进行；即无需先在一个反应体系中进行逆转录反应，然后再在其他反应体系中进行扩增反应。

优选地，所述第一序列和第二序列为 g2)、和/或所述第三序列和第四序列为 h2)时，所述多重 RT-PCR 反应还包含所述上游引物和/或所述下游引物延伸的步骤，得到完全互补的发卡结构的上游引物和/或下游引物。

优选地，所述上游引物和/或所述下游引物延伸的步骤与所述多重 RT-PCR 反应的 RT 反应同时进行。

本发明的方法中，通过将引物（上游引物和/或下游引物）设计为完全互补或部分互补的发卡结构（3'端部分互补的发卡结构或 5'端部分互补的发卡结构），从而使引物 3'端在 RT 过程中丧失结合能力（不与模板发生非特异性结合和/或避免引物之间结合）和延伸的能力，并且该引物的 5'端链包含一个或多个可以被特异性切割剂切割的切割位点，从而在 RT-PCR 的 RT 过程中引物的 5'端链的切割位点被特异性切割剂切割（对于 3'端部分互补的发卡结构还包含引物在逆转录酶和/或 DNA 聚合酶的作用下延伸得到完全互补的发卡结构的步骤），但在 RT 过程中维持互补的双链状态；在后续的 PCR 的高温过程（例如热变性）中，被切割的 5'端链游离，释放出 3'端链作为目标区域扩增的引物，重新获得 3'端引物和模板结合和延伸的能力；从而使得采用本发明的方法可以实现一步法扩增，并且可以有效避免 RT 过程中多对引物在逆转录酶体系的作用下形成二聚体，以及多对引物在逆转录酶体系的作用下和模板非特异性结合，产生非特异性产物，大幅度提高 PCR 扩增的效率以及检测的灵敏度和特异性。

优选地，用所述特异性切割剂处理所述多重 RT-PCR 反应的体系的步骤在所述多重 RT-PCR 反应的 RT 反应过程中或所述多重 RT-PCR 反应的 RT 反应后进行。

优选地，用所述特异性切割剂处理所述多重 RT-PCR 反应的体系的方法可以是：

使所述多重 RT-PCR 反应的体系包含所述特异性切割剂。

优选地，所述多重 RT-PCR 反应的体系还包含：具有 3'-5'核酸外切酶活性的 DNA 聚合酶（优选本发明第二个方面中的具有 3'-5'核酸外切酶活性的 DNA 聚合酶），其用于保持所述引物（上游引物和/或下游引物）3'端平末端结构（抑制逆转录酶的末端转移活性），该 DNA 聚合酶也可以用于引物（上游引物和/或下游引物）延伸，得到包含特异性序列全序列的引物，并形成完全互补的发卡结构（所述引物结构为 3'端部分互补的发卡结构时）。

优选地，所述多重 RT-PCR 反应的体系还包含：逆转录反应混合液，其用于逆转录反应（即将 RNA 逆转录为 cDNA）。

优选地，所述逆转录反应混合液包含：逆转录酶、DNA 聚合酶、逆转录缓冲液、逆转录引物、dNTPs、RNA 酶抑制剂中的至少一种；优选地，所述逆转录反应混合液包含：逆转录酶、DNA 聚合酶、逆转录缓冲液、dNTPs、RNA 酶抑制剂和逆转录引物；其中的逆转录酶和/或 DNA 聚合酶也可以用于引物（上游引物和/或下游引物）延伸，得到包含特异性序列全序列的引物，并形成完全互补的发卡结构（所述引物结构为 3'端部分互补的发卡结构时）；对于 RT-PCR 反应的体系中已经包含的组分，所述逆转录反应混合液可以相应地减少该组分：比如：所述 RT-PCR 反应的体系包含具有 3'-5'核酸外切酶活性的 DNA 聚合酶时，所述逆转录反应混合液可以不包含 DNA 聚合酶。

优选地，所述逆转录引物为 6~12nt 的随机引物；进一步为随机引物（N6）。

优选地，所述逆转录酶包含 AMV 逆转录酶、M-MuLV 逆转录酶中的至少一种。

优选地，所述多重 RT-PCR 反应的体系还包含：PCR 反应混合液，其用于 PCR 反应。

优选地，所述 PCR 反应混合液包含：DNA 聚合酶、Mg²⁺、PCR 缓冲液、dNTPs 中的至少一种；进一

步优选地，所述 PCR 反应混合液还包含：DNA 聚合酶、 Mg^{2+} 、PCR 缓冲液和 dNTPs；其中的 DNA 聚合酶也可以用于引物（上游引物和/或下游引物）延伸，得到包含特异性序列全序列的引物，并形成完全互补的发卡结构（所述引物结构为 3'端部分互补的发卡结构时）；对于 RT-PCR 反应的体系已经包含的组分，所述 PCR 反应混合液可以相应地减少该组分，比如：所述 RT-PCR 反应的体系包含具有 3'-5'核酸外切酶活性的 DNA 聚合酶，和/或所述 RT-PCR 反应的体系的逆转录反应液中包含 DNA 聚合酶时，所述 PCR 反应混合液可以不包含 DNA 聚合酶。

优选地，所述 DNA 聚合酶为耐高温 DNA 聚合酶（例如 Taq DNA 聚合酶）；进一步为 Taq 热启动 DNA 聚合酶。

优选地，所述多重 RT-PCR 反应的体系中所说特异性切割剂的浓度小于用于延伸的酶（比如：所述 DNA 聚合酶和/或所述逆转录酶）的浓度，从而使延伸反应先于切割反应。

优选地，所述 RNA 通过所述待测样本发生裂解反应得到。

优选地，所述裂解反应在所述多重 RT-PCR 反应之前。

优选地，所述裂解反应和所述多重 RT-PCR 反应在同一体系中进行。

优选地，所述同一体系具体为同一反应容器。

优选地，所述裂解反应后和所述多重 RT-PCR 反应前不包含：提取纯化步骤。

优选地，所述裂解反应后和所述多重 RT-PCR 反应前还包含：提取纯化步骤，去除盐类，有机剂等杂质。

优选地，所述提取纯化进一步包含：沉淀核酸或吸附核酸。

优选地，所述提取纯化后还包含：洗脱或溶解核酸。

优选地，所述裂解反应和所述多重 RT-PCR 反应在不同体系中进行，即不在同一体系中进行。

优选地，所述同一体系具体为同一反应容器。

优选地，所述裂解反应后还包含：提取纯化步骤，去除盐类，有机剂等杂质。

优选地，所述提取纯化进一步包含：沉淀核酸或吸附核酸。

优选地，所述提取纯化后还包含：洗脱或溶解核酸。

优选地，所述裂解的方法包含：物理方式、化学方式、生物方式中的至少一种。

优选地，所述物理方式包含：煮沸法、玻璃珠法、超声波法、研磨法、冻融法、匀浆法中的至少一种。

优选地，所述化学方式包含：表面活性剂法(SDS 法)、碱裂解法中的至少一种。

优选地，所述生物方式包含：酶法，比如通过溶菌酶、蛋白酶 K 等酶裂解。

本发明的第六个方面，提供一种检测目标区域的方法，包括本发明第五个方面的多重 RT-PCR 扩增方法的步骤。

优选地，所述多重 RT-PCR 反应的体系中还包含检测探针和/或核酸染料（优选为本发明第二个方面中的检测探针和/或核酸染料）。

优选地，一种检测 SARS-COV-2 基因的方法，包括如下步骤：利用本发明第一个方面中的检测 SARS-COV-2 基因的 RT-PCR 引物对待测样本的 RNA 进行多重 RT-PCR 反应。

优选地，所述 RT-PCR 反应的体系中还包含本发明第二个方面中的检测 SARS-COV-2 基因的探针。

优选地，所述方法为非诊断目的方法。

本发明的第七个方面，提供一种构建靶向文库的方法，包含本发明第五个方面的多重 RT-PCR 扩增方法的步骤：

所述方法还包含如下步骤：对 RT-PCR 产物添加测序接头，得到测序文库。

优选地，得到测序文库前添加测序接头后还可以包括环化反应，即对扩增得到的线性文库进行环化。

优选地，所述方法还包括如下步骤：对测序文库进行纯化。

优选地，所述纯化采用磁珠进行。

本发明的第八个方面，提供一种测序方法，包含：本发明第七个方面的构建靶向文库的方法的步骤。

优选地，所述测序方法包括如下步骤：制备文库；测序；

所述制备文库的方法为本发明第七个方面的构建靶向文库的方法。

优选地，所述测序前还包括如下步骤：文库质检。

本发明第九个方面，提供一种获得目标区域基因信息的方法，包含：本发明第八个方面的测序方法的步骤。

优选地，所述获得目标区域基因信息的方法包括如下步骤：测序，获得测序数据；获得目标区域基因信息；所述信息包含序列信息、变异信息中的至少一种；

所述测序的方法为本发明第八个方面的测序方法。

优选地，所述信息包含变异信息时，所述获得目标区域基因信息的方法还包含如下步骤：将获得的测序数据与参考基因组进行比对，确定目标区域基因的变异信息。

优选地，所述变异包括基因融合、SNV、基因缺失、基因插入突变中的至少一种。

优选地，所述方法为非诊断目的方法。

本发明第十个方面，提供本发明第一个方面的 RT-PCR 引物、第二个方面的试剂盒、第三个方面的测序试剂套装和/或第四个方面的测序系统在 f1)~f10) 任一项中的应用；

f1)构建靶向文库；

f2)制备用于构建靶向文库的产品；

f3)测序；

f4)制备用于测序的产品；

f5)获得目标区域基因信息；

f6)制备用于获得目标区域基因信息的产品；

f7)多重 RT-PCR 扩增；

f8)制备用于多重 RT-PCR 扩增的产品；

f9)检测目标区域；

f10)制备用于检测目标区域的产品。

优选地，f5)、f9)所述应用为非诊断目的应用。

以下通过具体的实施例对本发明的内容作进一步详细的说明。

应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。

下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，或按照制造厂商所建议的条件。本实施例中所使用的材料、试剂等，如无特别说明，为从商业途径得到的试剂和材料。

下述实施例/对比例的方法用于检测新冠病毒多个基因序列，包含 5 对引物，分别扩增 5 个靶标序列，来增加新冠特异性序列被检出的概率；RT-qPCR 试剂采用诺唯赞公司（HiScript II One Step RT-PCR Kit，货号 P611-01），Rnase HII 酶来自 NEB 公司，货号 M0288S，klenow 酶来自美国 NEB 公司，货号 M0210S。

实施例 1 一种多重 RT-qPCR 检测 SARS-COV-2 基因的方法

一种多重 RT-qPCR 检测 SARS-COV-2 基因的方法，包括如下步骤：

在 PCR 管中按照表 1 所示反应体系配置 RT-qPCR 体系（其中，扩增引物和探针序列如表 2 所示，即扩增引物可以形成完全互补的发卡结构），在 Bio-radPCR 仪上进行 RT-qPCR 反应，反应程序如下：42℃ 30min；94℃ 2min；94℃ 30s，65℃ 30s，72℃ 5min，40cycles；72℃ 5min；12℃ ∞。

表 1 RT-qPCR 体系

RNA（新冠标准品(Twist 公司新冠标准品，货号：102024)）	8.5μL
-------------------------------------	-------

2×One-step Mix	12.5μL
One-step enzyme Mix （包含逆转录酶和高温 DNA 聚合酶）	2μL
RNase HII 酶	0.5μL
Klenow 酶	0.5μL
随机引物（N6-500ng）	0.5μL
扩增引物和探针池（20μM）	0.5μL
总体积	25 μL

表 2 扩增引物和探针序列

名称	序列（5'-3'）
N1-F	ATTT <u>C</u> GCTGATTTTGGGTCGACCCCAAATCAGCGAAAT（SEQ ID NO.1）
N1-R	CAGATTCAACTGGCAGTAACCAGATCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG（SEQ ID NO.2）
N1-P	FAM-ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC（SEQ ID NO.3）-BHQ1
N2-F	TTTGCGGCCAATGTTTGTAATTACAAACATTGGCCGCAA（SEQ ID NO.4）
N2-R	TTCTTCGGAATGTCGCGCGCGACATTCCGAAGAA（SEQ ID NO.5）
N2-P	FAM-ACAATTTGCCCCAGCGCTTCAG（SEQ ID NO.6）-BHQ1
N3-F	TTTTGGTGTATTCAAGGCTCCCGGGAGCCTTGAATACACCAAAA（SEQ ID NO.7）
N3-R	CAATGCTGCAATCGTGCTACATGTAGCACGATTGCAGCATTG（SEQ ID NO.8）
N3-P	FAM-ACATTGGCACCCGCAATCCTG（SEQ ID NO.9）-BHQ1
Orflab-F	TTAAGTGTA ⁺ AAACCCACAGGGCCCTGTGGGTTTTACACTTAA（SEQ ID NO.10）
Orflab-R	TCAGCTGATGCACAATCGTACGATTGTGCATCAGCTGA（SEQ ID NO.11）
Orflab-P	FAM-CCGTCTGCGGTATGTGGAAAGGTTATGG（SEQ ID NO.12）-BHQ1
RDRP-F	CCGCCACACATGACCATRTCATGARATGGTCATGTGTGGCGG（SEQ ID NO.13）
RDRP-R	TATGCTAATAGTGTSTTTAACATY ⁺ TARATGTTAAASACACTATTAGCAT ⁺ A（SEQ ID NO.14）
RDRP-P	FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC（SEQ ID NO.15）-BHQ1

注：上述引物/探针按照每条引物/探针20μM浓度进行混合，得到总浓度为20μM的引物/探针池；上述下划线碱基为核糖核酸碱基，即对应的核苷酸为核糖核苷酸（rNTP）；FAM为荧光基团，BHQ1为淬灭基团；上述引物中加粗部分为特异性序列（上游特异性序列或下游特异性序列）。

对比例 1 一种多重 RT-qPCR 检测 SARS-COV-2 基因的方法

一种多重 RT-qPCR 检测 SARS-COV-2 基因的方法，包括如下步骤：

在 PCR 管中按照表 3 所示反应体系配置 RT-qPCR 体系（其中，扩增引物和探针序列如表 4 所示），在 Bio-radPCR 仪上进行 RT-qPCR 反应，反应程序如下：42℃ 30min；94℃ 2min；94℃ 30s，65℃ 30s，72℃ 5min，40cycles；72℃ 5min；12℃ ∞。

表 3 RT-qPCR 体系

RNA（新冠标准品(Twist 公司新冠标准品，货号：102024)）	9μL
2× One-step Mix	12.5μL
随机引物（N6-500ng）	0.5μL
One-step enzyme Mix（包含逆转录酶和高温 DNA 聚合酶）	2μL
扩增引物和探针池（20μM）	0.5μL
蒸馏水	0.5μL
总体积	25 μL

表 4 扩增引物和探针序列

样本名称	序列（5'-3'）
C-N1-F	GACCCCAAATCAGCGAAAT（SEQ ID NO.16）
C-N1-R	TCTGGTACTGCCAGTTGAATCTG（SEQ ID NO.17）
C-N1-P	FAM-ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC（SEQ ID NO.3）-BHQ1
C-N2-F	TTACAAACATTGGCCGCAAA（SEQ ID NO.18）
C-N2-R	CGCGACATTCCGAAGAA（SEQ ID NO.19）
C-N2-P	FAM-ACAATTTGCCCCAGCGCTTCAG（SEQ ID NO.6）-BHQ1
C-N3-F	GGGAGCCTTGAATACACCAAAA（SEQ ID NO.20）
C-N3-R	TGTAGCACGATTGCAGCATTG（SEQ ID NO.21）
C-N3-P	FAM-ACATTGGCACCCGCAATCCTG（SEQ ID NO.9）-BHQ1
C-Orflab-F	CCCTGTGGGTTTTACACTTAA（SEQ ID NO.22）
C-Orflab-R	ACGATTGTGCATCAGCTGA（SEQ ID NO.23）
C-Orflab-P	FAM-CCGTCTGCGGTATGTGGAAAGGTTATGG（SEQ ID NO.12）-BHQ1
C-RDRP-F	TGARATGGTCATGTGTGGCGG（SEQ ID NO.24）
C-RDRP-R	ARATGTAAASACACTATTAGCATA（SEQ ID NO.25）
C-RDRP-P	FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC（SEQ ID NO.15）-BHQ1

注：上述引物/探针按照每条引物/探针20μM浓度进行混合，得到总浓度为20μM的引物/探针池； FAM 为荧光基团，BHQ1为淬灭基团。

效果实施例

分别采用实施例 1 和对比例 1 的方法对不同浓度的新冠标准品进行检测，然后进行荧光检测和扩增产物的电泳检测。

1.荧光检测结果

采用实施例 1 和对比例 1 的方法的荧光检测结果如表 5 及图 3 所示：当标准品浓度为 100、1000copies/ml

时，实施例 1 的方法的 CT 值（Cycle Threshold Value）小于对比例 1，当标准品浓度为 10 copies/ml 时，实施例 1 的方法的 CT 值为 39.3，而对比例 1 的方法无法检出；可见，相对于对比例 1 的方法，实施例 1 的方法能够大幅度提高 PCR 扩增的效率以及检测的灵敏度。

表 5 荧光检测结果

标准品	实施例1的方法CT值	对比例1的方法CT值
1000copies/ml	33.1	35.1
100copies/ml	36.3	37.4
10copies/ml	39.3	无CT值

2.电泳检测结果

将实施例 1 和对比例 1 的 RT-qPCR 得到的产物进行电泳，结果如图 4 所示：与对比例 1 的方法得到的产物相比，实施例 1 的方法得到的产物更单一（尤其是标准品浓度低，即低浓度病毒载量时），可见，实施例 1 的方法特异性更强。

当表 1 中的扩增引物存在一个或多个部分互补的发卡结构时（比如：N1-F、N2-F、N3-F、Orflab-F、RDRP-F 的 3’端分别减少 3 个核苷酸），其具有与实施例 1 相当的效果。

上述实施例为本发明较佳的实施方式，但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制，其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化，均应为等效的置换方式，都包含在本发明的保护范围之内。

权 利 要 求 书

1. RT-PCR 引物, 包含: 上游引物和下游引物;
所述上游引物从 5' 端到 3' 端依次包含: 第一序列和第二序列:
g1) 所述第一序列为与上游特异性序列完全互补的序列, 所述第二序列与所述第一序列完全互补; 或
g2) 所述第一序列为与上游特异性序列完全互补的序列, 所述第二序列与所述第一序列部分互补; 或
g3) 所述第二序列为上游特异性序列, 所述第一序列与所述第二序列部分互补;
所述下游引物从 5' 端到 3' 端依次包含: 第三序列和第四序列:
h1) 所述第三序列为与下游特异性序列完全互补的序列, 所述第四序列与所述第三序列完全互补; 或
h2) 所述第三序列为与下游特异性序列完全互补的序列, 所述第四序列与所述第三序列部分互补; 或
h3) 所述第四序列为下游特异性序列, 所述第三序列与所述第四序列部分互补;
所述上游引物的 5' 端链包含一个或多个可以被特异性切割剂切割的切割位点;
所述下游引物的 5' 端链包含一个或多个可以被特异性切割剂切割的切割位点。
2. 根据权利要求 1 所述的 RT-PCR 引物, 其特征在于:
所述特异性切割剂包含酶促切割剂;
优选地, 所述酶促切割剂包含核糖核酸酶(例如: 核糖核酸酶 H)、糖基化酶(例如: 尿嘧啶-DNA 糖基化酶(UDG)、USER 酶(例如: 尿嘧啶 DNA 糖基化酶(UDG)和 DNA 糖基化酶-裂解酶 Endo VIII 的混合物)、3-甲基腺嘌呤 DNA 糖基化酶、3-甲基腺嘌呤 DNA 糖基化酶 II、嘧啶水合物-DNA 糖基化酶、FaPy-DNA 糖基化酶、胸腺嘧啶错配-DNA 糖基化酶(例如: 次黄嘌呤-DNA 糖基化酶、尿嘧啶 DNA 糖基化酶(UDG)、5-羟甲基尿嘧啶 DNA 糖基化酶(HmUDG)、5-羟甲基胞嘧啶 DNA 糖基化酶、1,N6-亚乙基腺嘌呤 DNA 糖基化酶))中的至少一种。
3. 根据权利要求 2 所述的 RT-PCR 引物, 其特征在于:
所述切割位点包含 c1)~c2)中至少一种:
c1)核糖核苷酸;
c2)尿嘧啶脱氧核糖核苷酸。
4. 根据权利要求 3 所述的 RT-PCR 引物, 其特征在于:
所述酶促切割剂包含核糖核酸酶(例如: 核糖核酸酶 H)、糖基化酶(例如: 尿嘧啶-DNA 糖基化酶(UDG)、USER 酶(例如: 尿嘧啶 DNA 糖基化酶(UDG)和 DNA 糖基化酶-裂解酶 Endo VIII 的混合物))中的至少一种; 进一步包含核糖核酸酶;
优选地, 所述切割位点包含 c1);
优选地, 所述核糖核酸酶 H 包含核糖核酸酶 HI、核糖核酸酶 HII 中至少一种。
5. 根据权利要求 1~4 任一项所述的 RT-PCR 引物, 其特征在于:
所述上游引物的 5'端链包含多个可以被特异性切割剂切割的切割位点, 例如: 可以是切割位点的个数大于等于 n 个; 或者是 n~N 个; 或者是 3~6 个; 其中, 所述 n=N/10, N 为第一序列的核苷酸个数;
优选地, 所述下游引物的 5'端链包含多个可以被特异性切割剂切割的切割位点, 例如: 可以是切割位点的个数大于等于 n 个; 或者是 n~N 个; 或者是 3~6 个; 其中, 所述 n=N/10 个, N 为第三序列的核苷酸个数;
优选地, 所述上游引物的 5'端链包含第一序列;
优选地, 所述下游引物的 5'端链包含第三序列;
优选地, 所述第一序列的核苷酸个数为 20~60;
优选地, 所述第三序列的核苷酸个数为 20~60;
优选地, 所述第二序列的核苷酸个数为 5~65;
优选地, 所述第四序列的核苷酸个数为 5~65;

- 优选地，所述多个可以被特异性切割剂切割的切割位点在所述上游引物的 5' 端链中随机分布；
- 优选地，所述多个可以被特异性切割剂切割的切割位点在所述下游引物的 5' 端链中随机分布；
- 优选地，所述第一序列与第二序列直接或间接连接；
- 优选地，所述第一序列与第二序列通过以下任意一种方式连接：碱基连接、linker 连接（比如：间隔（spacer3、spacer6、spacer9、spacer18 等））；
- 优选地，所述第三序列与第四序列直接或间接连接；
- 优选地，所述第三序列与第四序列通过以下任意一种方式连接：碱基连接、linker 连接（比如：间隔（spacer3、spacer6、spacer9、spacer18 等））。
6. 根据权利要求 1~4 任一项所述的 RT-PCR 引物，其特征在于：
- 所述上游特异性序列和下游特异性序列分别与目标区域的两个区段相同或互补；
- 优选地，所述 RT-PCR 引物包含多对 RT-PCR 引物；
- 优选地，所述上游引物和下游引物中所述的特异性切割剂可以相同或不同；
- 优选地，所述上游引物中的多个特异性切割剂可以相同或不同；
- 优选地，所述下游引物中的多个特异性切割剂可以相同或不同；
- 优选地，所述上游引物和下游引物中所述的切割位点可以相同或不同；
- 优选地，所述上游引物中的多个切割位点可以相同或不同；
- 优选地，所述下游引物中的多个切割位点可以相同或不同。
7. 一种试剂盒，包含权利要求 1~6 任一项所述的 RT-PCR 引物；
- 所述试剂盒还包含：权利要求 1~6 任一项中所述特异性切割剂；
- 优选地，所述试剂盒还包含：具有 3'-5'核酸外切酶活性的 DNA 聚合酶；
- 优选地，所述试剂盒还包含：逆转录酶；
- 优选地，所述试剂盒还包含：逆转录引物。
8. 根据权利要求 7 所述的试剂盒，其特征在于：
- 所述试剂盒包含：核酸提取试剂组合；
- 优选地，所述核酸提取试剂组合是用于选自以下任意一种方法的核酸提取试剂组合：碱裂解法、酚氯仿抽提法、螯合树脂法、离心柱膜吸附法以及磁珠法；
- 优选地，所述试剂盒用于 d1)~d3)中任一种：
- d1)扩增目标区域；
- d2)检测目标区域；
- d3)构建靶向文库。
9. 根据权利要求 8 所述的试剂盒，其特征在于：
- 所述试剂盒用于检测目标区域时，所述试剂盒还包含：检测探针、核酸染料中的至少一种；
- 优选地，所述检测探针包含 TaqMan 探针、分子信标、双杂交探针、复合探针中的至少一种；
- 优选地，所述核酸染料包含 EtBr、SYBR Green、SYBR Gold、GelRed、GelGreen 中的至少一种。
10. 一种多重 RT-PCR 扩增方法，其特征在于：利用权利要求 1~6 任一项所述的 RT-PCR 引物对待测样本的 RNA 进行多重 RT-PCR 反应；
- 所述反应进一步包括：
- 用所述特异性切割剂处理所述多重 RT-PCR 反应的体系；
- 优选地，所述多重 RT-PCR 反应的逆转录反应与扩增反应在同一体系中进行；
- 优选地，所述第一序列和第二序列为 g2)、和/或所述第三序列和第四序列为 h2)时，所述多重 RT-PCR 反应还包含所述上游引物和/或所述下游引物延伸的步骤；

优选地，所述上游引物和/或所述下游引物延伸的步骤与所述多重 RT-PCR 反应的逆转录反应同时进行。

11. 根据权利要求 10 所述的方法，其特征在于：

用所述特异性切割剂处理所述多重 RT-PCR 的反应体系的方法可以是：

使所述多重 RT-PCR 反应的体系包含所述特异性切割剂；

优选地，用所述特异性切割剂处理所述多重 RT-PCR 反应的体系的步骤在所述多重 RT-PCR 反应的 RT 反应过程中或所述多重 RT-PCR 反应的 RT 反应后进行。

12. 根据权利要求 10 所述的多重 RT-PCR 扩增方法，其特征在于：

所述多重 RT-PCR 反应的体系还包含：具有 3'-5'核酸外切酶活性的 DNA 聚合酶；

优选地，所述多重 RT-PCR 反应的体系还包含：逆转录酶；

优选地，所述多重 RT-PCR 反应的体系还包含：逆转录引物；

优选地，所述 RNA 通过所述待测样本发生裂解反应得到；

优选地，所述裂解反应在所述多重 RT-PCR 反应之前；

优选地，所述裂解反应和所述多重 RT-PCR 反应在同一体系中进行；

优选地，所述同一体系具体为同一反应容器；

优选地，所述裂解反应后和所述多重 RT-PCR 反应前还包含：提取纯化步骤；

优选地，所述提取纯化进一步包含：沉淀核酸或吸附核酸；

优选地，所述提取纯化后还包含：洗脱或溶解核酸；

优选地，所述裂解的方法包含：物理方式、化学方式、生物方式中的至少一种。

13. 根据权利要求 10~12 任一项所述的多重 RT-PCR 扩增方法，其特征在于：

所述多重 RT-PCR 反应的体系中还包含检测探针、核酸染料中的至少一种；

优选地，所述检测探针包含 TaqMan 探针、分子信标、双杂交探针、复合探针中的至少一种；

优选地，所述核酸染料包含 EtBr、SYBR Green、SYBR Gold、GelRed、GelGreen 中的至少一种。

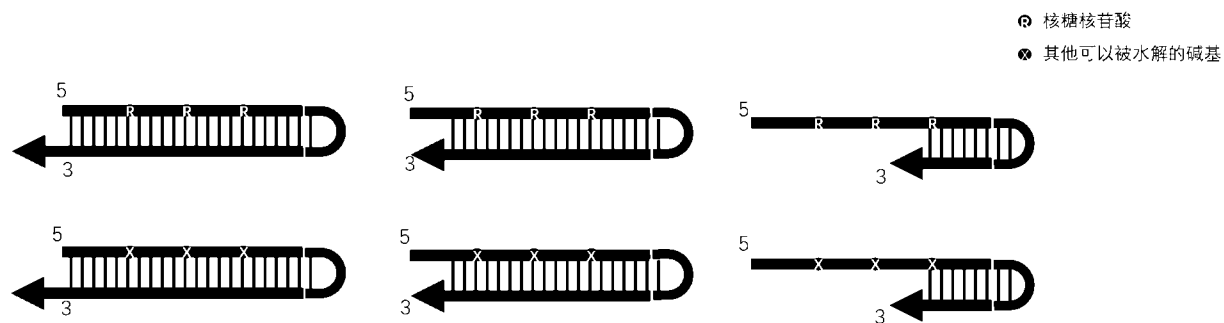


图 1

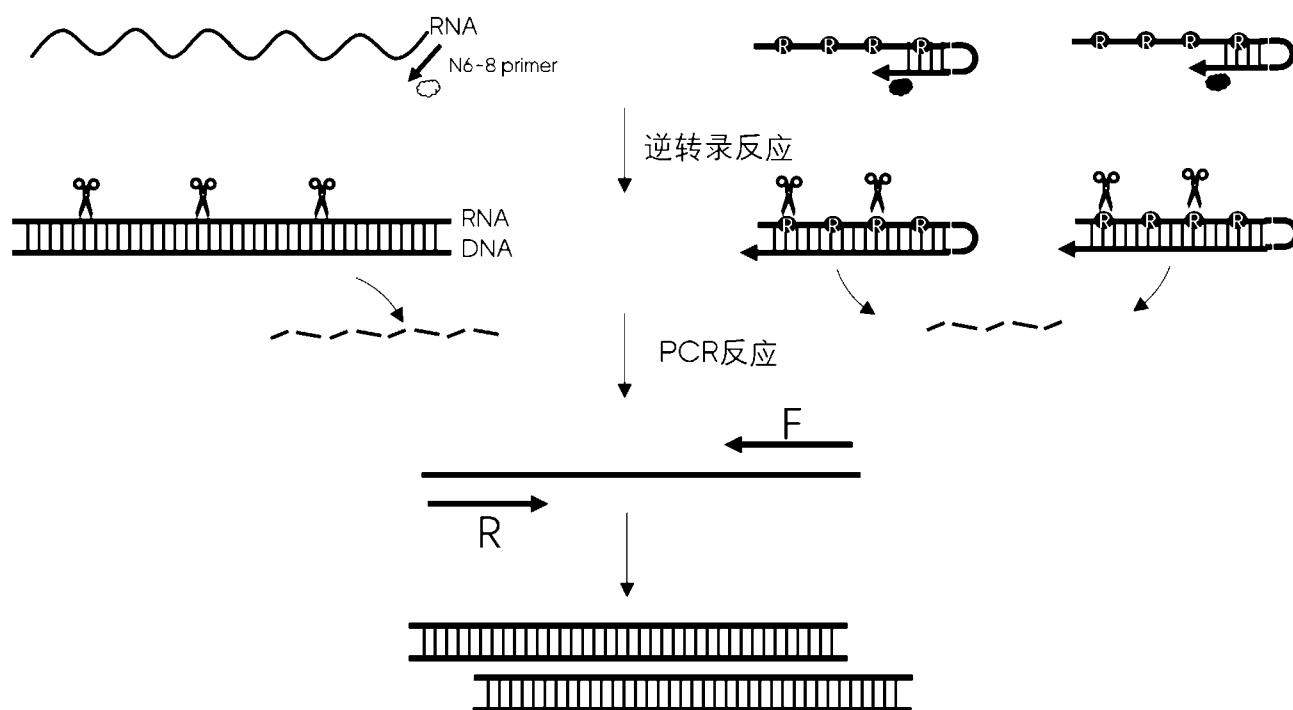


图 2

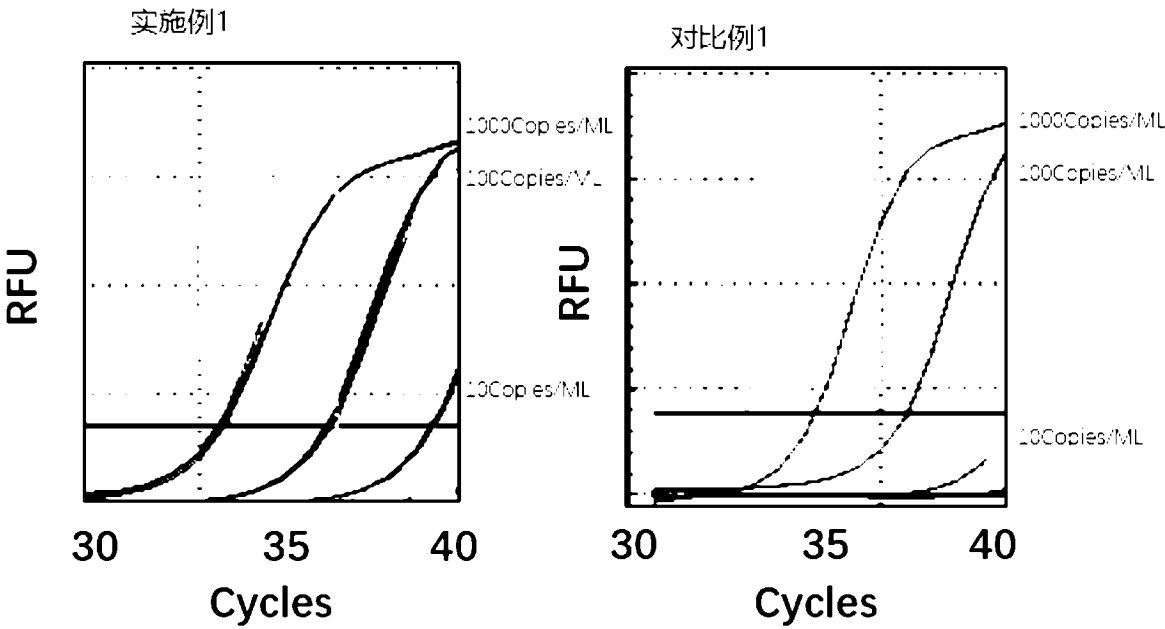


图 3

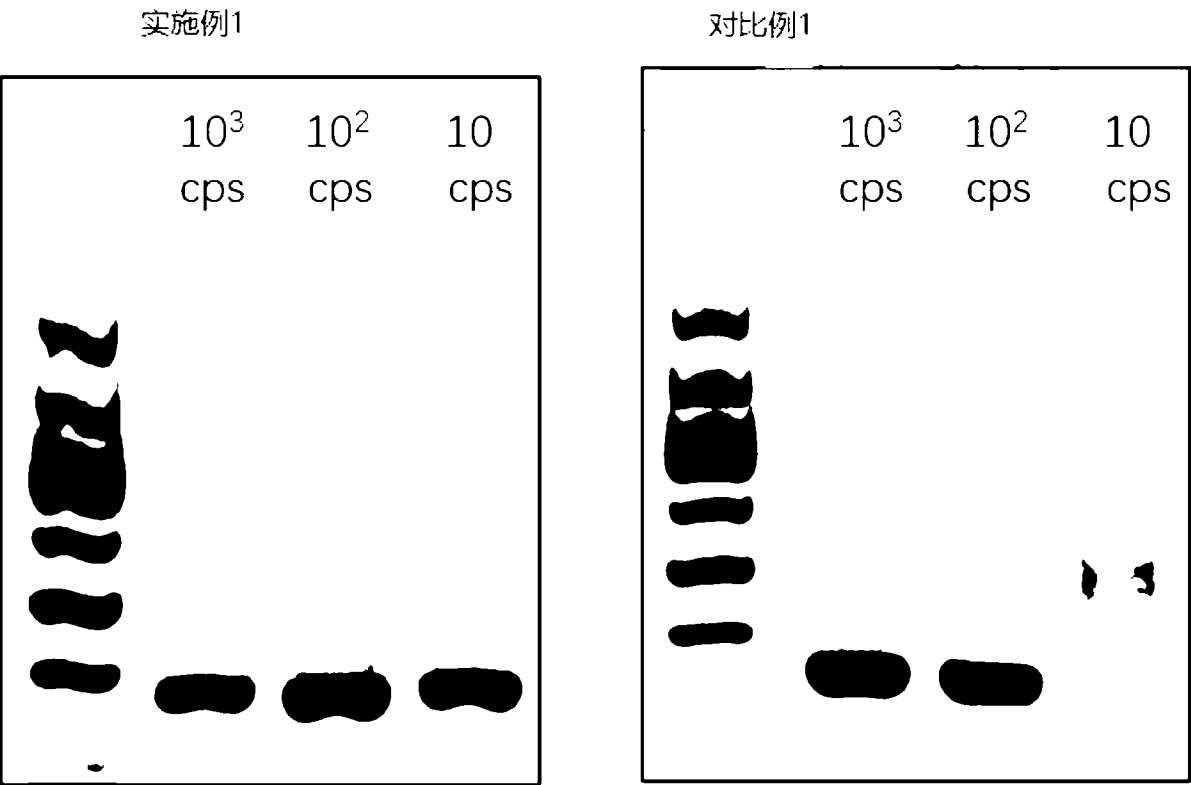


图 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/101078

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/6844(2018.01)i; C40B50/06(2006.01)i; C12N15/11(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C12Q, C40B, C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPABS, CNTXT, VEN, DWPI, WPABSC, CATXT, USTXT, EPTXT, WOTXT, KRTXT, JPTXT, CJFD, CNKI, WEB OF SCIENCE, PUBMED, 百度学术搜索, BAIDU SCHOLAR SEARCH: pcr, 引物, 发夹, 发卡, 互补, 切割, 切割位点, 核糖核酸酶, 核糖核苷酸, primer, hairpin, complement, cleavage, cleavable site, ribonuclease, RNase, ribonucleotide

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 106282353 A (SHANGHAI BIOWING APPLIED BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 04 January 2017 (2017-01-04) see abstract and claims 1-2	1-13
Y	US 2018057868 A1 (INTE-N) INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES, INC.01 March 2018 (2018-03-01) see abstract, description, paragraph 8, and claims 1-3	1-13
A	US 2016046995 A1 (LUMX) LUMINEX CORP.18 February 2016 (2016-02-18) see claims 1-3	1-13
A	CN 113046420 A (XIAMEN UNIVERSITY) 29 June 2021 (2021-06-29) see claim 1	1-13
A	CN 114717298 A (SHANGHAI HEALZONE BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 08 July 2022 (2022-07-08) see claims 1-4	1-13
A	CN 115461456 A (NISSAN CHEMICAL CORP.) 09 December 2022 (2022-12-09) see claim 1	1-13

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“D” document cited by the applicant in the international application

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 November 2023

Date of mailing of the international search report

05 January 2024

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District,
Beijing 100088

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/101078

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/101078

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	106282353	A	04 January 2017	None			
US	2018057868	A1	01 March 2018	WO	2018044831	A1	08 March 2018
				US	10858699	B2	08 December 2020
US	2016046995	A1	18 February 2016	US	2020263240	A1	20 August 2020
				US	11371082	B2	28 June 2022
				US	10011861	B2	03 July 2018
				US	2018355415	A1	13 December 2018
				US	10683535	B2	16 June 2020
				WO	2016025815	A1	18 February 2016
CN	113046420	A	29 June 2021	None			
CN	114717298	A	08 July 2022	None			
CN	115461456	A	09 December 2022	EP	4159766	A1	05 April 2023
				WO	2021241528	A1	02 December 2021
				KR	20230015347	A	31 January 2023
				JPWO	2021241528	A1	02 December 2021
				US	2023212214	A1	06 July 2023
				TW	202212568	A	01 April 2022
				CA	3185063	A1	02 December 2021

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2023/101078
A. 主题的分类 C12Q1/6844(2018.01)i; C40B50/06(2006.01)i; C12N15/11(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) IPC: C12Q, C40B, C12N 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) WPABS, CNTXT, VEN, DWPI, WPABSC, CATXT, USTXT, EPTXT, WOTXT, KRTXT, JPTXT, CJFD, CNKI, WEB OF SCIENCE, PUBMED, 百度学术搜索: pcr, 引物, 发夹, 发卡, 互补, 切割, 切割位点, 核糖核酸酶, 核糖核苷酸, primer, hairpin, complement, cleavage, cleavable site, ribonuclease, RNase, ribonucleotide		
C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	CN 106282353 A (上海翼和应用生物技术有限公司) 2017年1月4日 (2017 - 01 - 04) 参见说明书摘要, 权利要求1-2	1-13
Y	US 2018057868 A1 (INTE-N) INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES INC 2018年3月1日 (2018 - 03 - 01) 参见说明书摘要, 说明书第8段, 权利要求1-3	1-13
A	US 2016046995 A1 (LUMX) LUMINEX CORP 2016年2月18日 (2016 - 02 - 18) 参见权利要求1-3	1-13
A	CN 113046420 A (厦门大学) 2021年6月29日 (2021 - 06 - 29) 参见权利要求1	1-13
A	CN 114717298 A (上海慧众同康生物科技有限公司) 2022年7月8日 (2022 - 07 - 08) 参见权利要求1-4	1-13
A	CN 115461456 A (日产化学株式会社) 2022年12月9日 (2022 - 12 - 09) 参见权利要求1	1-13
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “D” 申请人在国际申请中引证的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 2023年11月12日		国际检索报告邮寄日期 2024年1月5日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088		受权官员 苏林 电话号码 (+86) 010-62411030

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的:

- a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的;
- b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三.1(a)),
☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。

2. ☐ 本报告是在没有收到符合WIPO ST.26标准的序列表的情况下,考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列,在可进行有意义检索的范围内做出的。

3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2023/101078

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	106282353	A	2017年1月4日	无			
US	2018057868	A1	2018年3月1日	WO	2018044831	A1	2018年3月8日
				US	10858699	B2	2020年12月8日
US	2016046995	A1	2016年2月18日	US	2020263240	A1	2020年8月20日
				US	11371082	B2	2022年6月28日
				US	10011861	B2	2018年7月3日
				US	2018355415	A1	2018年12月13日
				US	10683535	B2	2020年6月16日
				WO	2016025815	A1	2016年2月18日
CN	113046420	A	2021年6月29日	无			
CN	114717298	A	2022年7月8日	无			
CN	115461456	A	2022年12月9日	EP	4159766	A1	2023年4月5日
				WO	2021241528	A1	2021年12月2日
				KR	20230015347	A	2023年1月31日
				JPWO	2021241528	A1	2021年12月2日
				US	2023212214	A1	2023年7月6日
				TW	202212568	A	2022年4月1日
				CA	3185063	A1	2021年12月2日