

(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
2017年4月27日 (27.04.2017)



(10) 国际公布号
WO 2017/066908 A1

- (51) 国际专利分类号:
C40B 50/06 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2015/092181
- (22) 国际申请日: 2015年10月19日 (19.10.2015)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (71) 申请人: 安诺优达基因科技(北京)有限公司 (ANNOROAD GENE TECHNOLOGY (BEIJING) CO., LTD) [CN/CN]; 中国北京市北京经济技术开发区科创六街88号院8号楼2单元701室, Beijing 100176 (CN)。
- (72) 发明人: 李小林 (LI, Xiaolin); 中国北京市北京经济技术开发区科创六街88号院8号楼2单元701室, Beijing 100176 (CN)。 张介中 (ZHANG, Jiezhong); 中国北京市北京经济技术开发区科创六街88号院8号楼2单元701室, Beijing 100176 (CN)。 赵红梅 (ZHAO, Hongmei); 中国北京市北京经济技术开发区科创六街88号院8号楼2单元701室, Beijing 100176 (CN)。 裴志华 (PEI, Zhihua); 中国北京市北京经济技术开发区科创六街88号院8号楼2单元701室, Beijing 100176 (CN)。 玄兆伶 (XUAN, Zhaoling); 中国北京市北京经济技术开发区科创六街88号院8号楼2单元701室, Beijing 100176 (CN)。 李大为 (LI, Dawei); 中国北京市北京经济技术开发区科创六街88号院8号楼2单元701室, Beijing 100176 (CN)。 梁峻彬 (LIANG, Junbin); 中国北京市北京经济技术开发区科创六街88号院8

号楼2单元701室, Beijing 100176 (CN)。 陈重建 (CHEN, Chongjian); 中国北京市北京经济技术开发区科创六街88号院8号楼2单元701室, Beijing 100176 (CN)。

- (74) 代理人: 北京坤瑞律师事务所 (WU, FENG & ZHANG); 中国北京市海淀区海淀大街8号中钢国际广场A座21层A/D区, Beijing 100080 (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, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, 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, 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)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

(54) Title: METHOD FOR CONSTRUCTING HIGH-RESOLUTION SINGLE CELL HI-C LIBRARY WITH A LOT OF INFORMATION

(54) 发明名称: 构建高分辨率、大信息量单细胞 Hi-C 文库的方法

(57) Abstract: Provided in the present invention is a method for constructing a high-resolution single cell Hi-C library with a lot of information, comprising the following steps: step B: obtaining a small amount of immobilized chromatin; step C: digesting the immobilized chromatin obtained in step B to obtain an immobilized chromatin fragment; step D: relinking the immobilized chromatin fragment obtained in step C directly to obtain a relinked immobilized chromatin fragment; step E: un-immobilizing the relinked immobilized chromatin fragment obtained in step D to release the DNA fragment; step F: amplifying the DNA fragment released in step E, to obtain an amplification product; and step H: constructing a DNA library for sequencing using the amplified product as a DNA fragment to be sequenced.

(57) 摘要: 本发明提供一种构建高分辨率、大信息量单细胞 Hi-C 文库的方法, 包括下述步骤: 步骤 B: 获得少量的被固定化的染色质; 步骤 C: 对所述步骤 B 中获得的被固定化的染色质进行消化, 得到被固定化的染色质片段; 步骤 D: 将所述步骤 C 中得到的被固定化的染色质片段直接进行重新连接, 得到重新连接的被固定化的染色质片段; 步骤 E: 使所述步骤 D 中得到的重新连接的被固定化的染色质片段解除固定化, 释放 DNA 片段; 步骤 F: 对所述步骤 E 中释放的 DNA 片段进行扩增, 得到扩增产物; 以及步骤 H: 以所述扩增产物作为待测序 DNA 片段, 构建测序用 DNA 文库。



WO 2017/066908 A1

构建高分辨率、大信息量单细胞 Hi-C 文库的方法

技术领域

本发明涉及一种可在全基因组范围内对染色质三维构象进行捕获的文库构建方法，属于基因测序技术领域。

背景技术

DNA 是细胞遗传信息的载体，在生物体内以染色质的形式存在于每个细胞中，并控制着整个生命活动的进程。目前绝大多数对于 DNA 信息的研究是以研究 DNA 分子内碱基的序列（DNA 的一维信息）来进行，通过分析碱基排列信息来探究生命活动的规律。

真实状态中的细胞核是一个狭小的三维立体空间，直链分子结构的 DNA 会以复杂的卷曲方式位于细胞核内，原一维 DNA 序列被赋予三维空间构象，并导致了大量复杂的基因调控作用方式。对此，简单的一维 DNA 序列信息由于不能提供真实 DNA 空间分布相关的信息，因此也无法解释由于空间构象导致的一系列基因调控现象。

为解决这一问题，目前已有一系列的检测方法。如 3c（染色体结构捕获）方法及衍生的 4c、5c 方法。这些方法均以测序为基本检测手段，利用细胞核内蛋白形成 DNA 结构固定因子，之后通过对 DNA 的片段重联等构建带有空间结构信息的 DNA 序列，最后利用测序技术来检测染色质 DNA 信息，并计算其在空间中分布和相互作用。尽管此类方法在一定程度上能够提供部分染色质相互作用信息，但由于其方法与技术限制，这一类的方法仅能检测定点或部分的 DNA 相互作用位点，无法探究全细胞核水平上的立体互作信息。因此不可避免地大量信息将会遗漏。在对于未知相互作用信息的发现上，这一点尤为重要。

近年来随着高通量测序技术的出现，大规模基因组信息的获得变得更加容易。Hi-C 技术便是结合高通量测序的方法，对整个细胞核内染色质的信息进行检测的技术。Hi-C 技术是染色体构象捕获（Chromosome conformation capture，简称为 3C）的一种衍生技术，是指基于高通量测序进行染色体构象的捕获，它能够在全基因组范围内捕捉不同基因座位之间的空间交互，研究三维空间中调控基因的 DNA 元件。

例如，专利文献 1 和非专利文献 1 报导了一种 Hi-C 方法，该方法利用甲醛固定染色质结构，然后通过限制性内切酶打断原基因组序列，并进行生物素标记后，再重新连接形成带有结构信息的新 DNA 分子。在这一过程中，如果两个不同基因组位置的 DNA 分子片段连接形成一个杂合分子，这将被认为是这两个 DNA 分子在空间上相互临近的证据。然后对 DNA 进行纯化并打碎，再针对标记的生物素分子进行钓取，富集获得所需的空间上相互作用的 DNA 杂合分子。最后构建高通量测序的文库及通过双端测序检测，获得全染色质在空间上的相互作用信息。该方法主要包括下述步骤：1）首先对 10^6 个以上的细胞样本进行甲

醛交联固定，使其内部空间距离较近的 DNA 通过蛋白交联在一起，并收集细胞；2) 使用裂解体系并配合研磨进行细胞裂解，获得分离的细胞核；3) 使用限制型内切酶（如 *EcoR I*）对交联后细胞的染色质进行酶切；4) 对酶切末端进行标记生物素，并形成平末端；5) 使用 DNA 连接酶对平末端进行连接，处于同一个交联分子上的 DNA 片段间将有较大的概率连接形成新的分子；6) 高温（65°C）处理逆转交联，释放双链 DNA 分子；7) 去除未连接的末端生物素标记；8) 对 DNA 进行片段化，并进行生物素特异性调取，富集杂合分子连接位点区域；以及 9) 构建 Illumina 测序文库，进行双端测序，获得数据。

但是，该方法以 10^6 个细胞水平以上的大量样本起始，整个流程中使用了大规模的研磨及提取方法，并不适用于小量样本（ 10^5 个细胞以下）、特别是单细胞水平的 Hi-C 检测。此外，由于该方法针对大量细胞样本，只能检测群体细胞总的染色质构象，无法对细胞染色质构象个体间的区别进行检测和比较。

另一方面，非专利文献 2 报导了一种单细胞核 Hi-C 方法，但该方法起始样本依然为 10^6 数量级的大量细胞样本。前期处理利用甲醛固定染色质结构，然后通过限制性内切酶打断原基因组序列，并进行生物素标记后，再重新连接形成带有结构信息的新 DNA 分子。在这一过程中，如果两个不同基因组位置的 DNA 分子片段连接形成一个杂合分子，这将被认为是这两个 DNA 分子在空间上相互临近的证据。接下来，对经过前处理的细胞核在显微镜下进行挑选，获得单个的细胞核，再针对单个细胞核样本进行交联去除、生物素调取及限制性内切酶对 DNA 分子进行片段化，富集获得所需的空间上相互作用的 DNA 杂合分子。最后构建高通量测序的文库及通过双端测序检测，获得全染色质在空间上的相互作用信息。该方法主要包括下述步骤：1) 首先对 10^6 个以上的细胞样本进行甲醛交联固定，使其内部空间距离较近的 DNA 通过蛋白交联在一起，并收集细胞；2) 使用裂解体系并配合研磨进行细胞裂解，获得分离的细胞核；3) 使用限制型内切酶（如 *EcoR I*）对交联后细胞的染色质进行酶切；4) 对酶切末端进行生物素标记，并形成平末端；5) 使用 DNA 连接酶对平末端进行连接，处于同一个交联分子上的 DNA 片段间将有较大的概率连接形成新的分子；6) 在显微镜下进行单细胞核的挑取获得经过 Hi-C 化处理的单细胞核样本；7) 对单细胞核样本进行高温去除甲醛交联，释放 DNA；8) 对 DNA 分子进行生物素特异性调取，富集杂合分子连接位点区域；9) 使用第二种限制性内切酶对 DNA 进行片段化，使其适应于 Illumina 测序文库插入片段大小；10) 以结合生物素标记片段（空间上相互作用片段的杂合分子）的磁珠为载体，构建 Illumina 测序文库，进行双端测序，获得数据。

尽管此方法在后期的去交联及文库构建阶段开始针对单细胞核进行操作，并且最终获得的结果为单细胞水平的 Hi-C 结果，但是在处理初期，由于需要依靠大体积的甲醛交联处理及研磨破碎细胞等手段获取细胞核，因此该方法仍然需要 10^6 个细胞以上的大量样本作为起始进行 Hi-C 化处理，因此并未真正实现针对单细胞样本起始水平的 Hi-C 检测，仍然无法适用于小量样本（ 10^5 个细胞以下）、特别是单细胞样本。再者，由于该方法在文库扩增之前要经历酶切、末端修复、生物素标记、平末端连接、生物素调取、加接头等多个步骤，而这些步骤都是在一套基因组拷贝的情况下操作的，每一步骤的效率都会影响到最后捕获

的信息量，导致整个实验过程中信息损失严重，最终捕获到的 DNA 互作片段数目也很低。此外，由于该方法采用两种限制性核酸酶分别进行染色质消化和重连产物片段化。为了保证重连产物片段化的效率，该步骤所用内切酶在基因组中出现的频率要远高于染色质消化所用内切酶出现的频率。这个原因导致该方法无法使用基因组中高频出现的四碱基酶进行染色质消化，最终导致所得 Hi-C 文库数据分辨率较低。非专利文献 2 中也尝试过使用基因组中高频出现的四碱基酶进行染色质消化，但由于后面的重连产物片段化无更高频的内切酶可用，无法提高分辨率和信息量。而且，该方法对单细胞进行研究的方案是挑取单细胞核，其操作难度和对仪器、技术的要求远高于挑取单细胞。

因此，上述现有技术中的 Hi-C 方法均不是能够适用于单细胞或少量细胞的、实用化的 Hi-C 方法。

专利文献 1

国际公开号 WO2010036323A1

非专利文献 1

Lieberman-Aiden E et al. Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science* **326**, 289-293 (2009)

非专利文献 2

Takashi Nagano et al. Single-cell Hi-C reveals cell-to-cell variability in chromosome structure. *Nature* **502**, 59-64 (2013)

发明内容

鉴于上述现有技术中存在的不足，本发明的目的在于：提供一种能够适用于少量染色质（少量细胞甚至是单细胞的染色质）的构建 Hi-C 文库的方法。

本发明人为解决上述技术问题进行了深入研究，在传统的构建 Hi-C 文库的方法的基础上进行了巧妙的改进，首创了适用于少量染色质的 Hi-C 文库构建方法，从而完成了本发明。

即，本发明包括：

1. 一种构建 Hi-C 文库的方法，该方法包括下述步骤：

步骤 B：获得少量的被固定化的染色质；

步骤 C：对所述步骤 B 中获得的被固定化的染色质进行消化，得到被固定化的染色质片段；

步骤 D：将所述步骤 C 中得到的被固定化的染色质片段直接进行重新连接，得到重新连接的被固定化的染色质片段；

步骤 E：使所述步骤 D 中得到的重新连接的被固定化的染色质片段解除固定化，释放 DNA 片段；

步骤 F：对所述步骤 E 中释放的 DNA 片段进行扩增，得到扩增产物；以及

步骤 H: 以所述扩增产物作为待测序 DNA 片段, 构建测序用 DNA 文库。

2. 根据项 1 所述的方法, 其中, 所述少量的被固定化的染色质是 10^{-6} ~ 10^2 ng 的染色质, 以裸 DNA 计。

3. 根据项 1 或 2 所述的方法, 其中, 所述少量的被固定化的染色质是 10^{-5} ~10ng 的染色质, 以裸 DNA 计。

4. 根据项 1~3 中任一项所述的方法, 其中, 所述步骤 C 中使用脱氧核糖核酸酶对所述被固定化的染色质进行消化。

5. 根据项 4 所述的方法, 其中, 所述脱氧核糖核酸酶是 I 型限制性内切酶、II 型限制性内切酶或 III 型限制性内切酶。

6. 根据项 1~5 中任一项所述的方法, 其中, 所述步骤 D 中采用粘末端或平末端连接方法将所述步骤 C 中得到的被固定化的染色质片段进行重新连接。

7. 根据项 1~6 中任一项所述的方法, 其还包括:

步骤 G: 将所述步骤 F 中得到的扩增产物片段化, 得到更小的 DNA 片段; 且

所述步骤 H 中, 以所述步骤 G 中得到的更小的 DNA 片段作为待测序 DNA 片段, 构建测序用 DNA 文库。

8. 根据项 7 所述的方法, 其中, 所述步骤 G 中采用超声打断法、转座酶法、内切酶酶切法或液压剪切法将所述扩增产物片段化。

9. 根据项 8 所述的方法, 其中, 所述步骤 G 中得到的更小的 DNA 片段的大小为 50~1000bp。

10. 根据项 1~9 中任一项所述的方法, 其还包括:

步骤 A: 获取少量的染色质被固定化的细胞; 且

在所述步骤 B 中, 裂解所述步骤 A 中获取的细胞, 获得少量的被固定化的染色质。

11. 根据项 10 所述的方法, 其中, 所述少量的染色质被固定化的细胞是 1~10000 个细胞。

12. 根据项 10 所述的方法, 其中, 所述少量的染色质被固定化的细胞是 1~1000 个细胞。

13. 根据项 10 所述的方法, 其中, 所述少量的染色质被固定化的细胞是单个细胞。

14. 根据项 10 所述的方法, 其中, 所述步骤 A 包括:

步骤 A-1: 对一定量的细胞的染色质进行固定化, 得到一定量的染色质被固定化的细胞; 以及

步骤 A-2: 从所述步骤 A-1 得到的一定量染色质被固定化的细胞中挑取少量的染色质被固定化的细胞。

15. 根据项 10 所述的方法, 其中, 所述步骤 A 包括:

步骤 A-3: 对少量的细胞的染色质进行固定化, 得到少量的染色质被固定化的细胞。

16. 一种测定可能在空间上相互作用的染色质区域的方法, 该方法包括:

采用项 1~15 中任一项所述的方法构建 Hi-C 文库；以及
对所述 Hi-C 文库的全部或部分进行测序，并将所获得信息与染色质 DNA 一级序列信息进行比对。

发明效果

根据本发明，提供了一种起始样本量少、分辨率高、信息量大、操作简便的构建 Hi-C 文库的方法。

针对现有技术无法处理微量样本和单细胞样本的问题，本发明从最起始的步骤便可针对单一细胞或微量样本（1-1000 个细胞）进行操作，解决了小样本量细胞进行 Hi-C 检测的难题。

针对现有技术无法检测单细胞染色质构象的问题，本发明可针对单个细胞进行 Hi-C 分析，检测和研究生理单个细胞的染色质构象以及不同细胞间染色质构象的区别。

针对现有技术中 DNA 相互作用信息损失较大的问题，本发明摒弃了酶切后的末端修复、生物素标记和调取等步骤，而且可以采用连接效率较高的粘末端连接来代替连接效率较低的平末端连接，因而降低了信息量的损失，可以捕获到更多的染色质构象信息。

针对现有技术获得染色质构象分辨率较低的问题，本发明可在文库片段化时采用随机打断的方法，其片段化效果远高于限制性内切酶酶切。这一操作使得染色质消化时可选用更高分辨率的限制性内切酶如识别 4 碱基序列的限制性内切酶，从而能够提高染色质构象分辨率。

针对现有技术中挑取单细胞核操作困难的问题，本发明可以挑取单个细胞进行文库构建，其难度小于挑取单个细胞核。

发明的具体实施方式

本说明书中提及的科技术语具有与本领域技术人员通常理解的含义相同的含义，如有冲突以本说明书中的定义为准。

在一个方面中，本发明提供一种构建 Hi-C 文库的方法（本发明的方法），该方法包括下述步骤：

步骤 B：获得少量的被固定化的染色质；

步骤 C：对所述步骤 B 中获得的被固定化的染色质进行消化，得到被固定化的染色质片段；

步骤 D：将所述步骤 C 中得到的被固定化的染色质片段直接进行重新连接，得到重新连接的被固定化的染色质片段；

步骤 E：使所述步骤 D 中得到的重新连接的被固定化的染色质片段解除固定化，释放 DNA 片段；

步骤 F：对所述步骤 E 中释放的 DNA 片段进行扩增，得到扩增产物；以及

步骤 H：以所述扩增产物作为待测序 DNA 片段，构建测序用 DNA 文库。

优选地，本发明的方法还包括：

步骤 G：将所述步骤 F 中得到的扩增产物片段化，得到更小的 DNA 片段；且所述步骤 H 中，以所

述步骤 G 中得到的更小的 DNA 片段作为待测序 DNA 片段，构建测序用 DNA 文库。

本发明的方法还包括：

步骤 A：获取少量的染色质被固定化的细胞；且在所述步骤 B 中，裂解所述步骤 A 中获取的细胞，获得少量的被固定化的染色质。

对于步骤 A 中获取少量的染色质被固定化的细胞的方式没有特殊限制，例如，可以首先对一定量的细胞的染色质进行固定化，得到一定量的染色质被固定化的细胞，然后从得到的一定量染色质被固定化的细胞中挑取少量的染色质被固定化的细胞；或者可以直接对少量的细胞的染色质进行固定化，得到少量的染色质被固定化的细胞。需要说明的是，这里的细胞也可是细胞核。

在本说明书中，Hi-C 是指染色质三维空间互作组，它是一种可以在全基因组范围内进行染色质空间构象捕获，研究染色质的三维结构和不同 DNA 区域在空间上相互关系的方法。Hi-C 文库是指：Hi-C 方法中通过高通量测序来获取可能的染色质相互作用信息，用于这种高通量测序的 DNA 文库即为 Hi-C 文库。

在本说明书中，“少量的染色质”是指少至现有技术的 Hi-C 方法无法进行操作的量的染色质，通常可以指 1~10000 个细胞的染色质，或者 1~1000 个细胞的染色质，或者 1~100 个细胞的染色质，甚至是 1 个细胞（单细胞）的染色质，再甚至是 1 个细胞（单细胞）的染色质的一部分。如果以质量计，所述“少量的染色质”可以是 10^{-6} ~ 10^2 ng，优选是 10^{-5} ~10ng，以裸 DNA 计。

在本说明书中，“少量的细胞”是指少至现有技术的 Hi-C 方法无法进行操作的数量的细胞，通常可以指 1~10000 个细胞，或者 1~1000 个细胞，或者 1~100 个细胞，甚至是 1 个细胞（单细胞）。

在本说明书中，“固定化”是指：细胞中，染色质在三维空间上相互接近的部分被以接近天然构象的状态被固定。在本说明书中，染色质也包括染色体形态。所述固定化通常可以通过将染色质上的蛋白质交联来进行。染色质上的蛋白质的交联方法是本领域技术人员已知的，例如，可以单独使用紫外线，或者可以单独使用四硝基甲烷、碳二酰亚胺类、甲醛、甲醇、乙醇、戊醛、氮芥、二甲基硫酸、甲醛释放剂、酰亚胺酯类、有丝裂霉素 C、芥子气和扫若仑等化学试剂，还可以采用以上化学试剂结合紫外线照射的方法进行交联。例如，在通过甲醛交联来进行所述固定化的情况下，可以将细胞置于适当量（例如 1~10000000 μ L）的水、TE 缓冲液、生理盐水、PBS 或细胞培养基中制成细胞悬浮液滴，再加入适当量（例如 1-10000000 μ L）的甲醛溶液（对其浓度没有限制，例如可以是 1~20 重量%），室温静置一定时间（例如 1-100min），进行交联。然后，向上述反应液滴中加入一定量的氨基酸（一种氨基酸或多种氨基酸的混合物）或蛋白质（例如 BSA 等）来终止交联反应。

在所述步骤 A 中，可以先对一定量（例如 10^5 个以上，优选 10^6 ~ 10^8 个）的细胞的染色质进行固定化，得到一定量的染色质被固定化的细胞，然后再从中挑取少量的染色质被固定化的细胞；也可以直接对少量的细胞的染色质进行固定化，从而得到少量的染色质被固定化的细胞。所述少量细胞的挑取可以通过毛细管法、稀释法、梯度稀释法或流式细胞仪分选法来进行。

在所述步骤 B 中, 对所述步骤 A 中获取的细胞进行裂解, 从而得到被固定化的染色质。细胞裂解通常可以通过将所述细胞置于适当的细胞裂解液中来进行。所述细胞裂解液的配方及用量可由本领域技术人员根据所述细胞的种类及量适宜确定。

在所述步骤 C 中, 对所述步骤 B 中获得的被固定化的染色质进行消化, 得到被固定化的染色质片段。所述消化可以使用脱氧核糖核酸酶来进行。作为所述脱氧核糖核酸酶优选 I 型限制性内切酶、II 型限制性内切酶或 III 型限制性内切酶。在非专利文献 2 所记载的 Hi-C 方法中, 因为后续步骤中还要使用识别 4 碱基序列的限制性内切酶进行 DNA 片段化, 所以只能使用识别 6 碱基序列的限制性内切酶对染色质进行消化。这种消化方式的分辨率低, 保留的信息量小。另一方面, 在本发明的方法中, 因为后续步骤中可以采用超声打断法、转座酶法、液压剪切法等方法进行 DNA 片段化, 所以在该步骤 C 中可以使用分辨率更高的识别 4 碱基序列的限制性内切酶或其他核酸酶对染色质进行消化, 这使得理论上分辨率提高了十数倍, 可获得的染色质互作信息量大幅增加。当然, 在步骤 C 中同样可以使用识别 6 碱基序列的限制性内切酶进行染色质消化。

在所述步骤 D 中, 将所述步骤 C 中得到的被固定化的染色质片段直接进行重新连接, 得到重新连接的被固定化的染色质片段。在这里, “直接进行重新连接”是指: 不对所述被固定化的染色质片段进行生物素标记, 而将这些片段重新连接起来。此外, 在所述步骤 C 中使用粘性末端限制性内切酶进行染色质消化时, 得到的被固定化的染色质片段具有粘性末端, 优选地, 本发明的方法中不像现有技术那样对这些粘性末端进行修复使之成为平末端, 而是采用粘性末端连接方式将这些染色质片段重新连接起来, 这样效率要高于平末端连接。当然, 本方法也可以采用修复后进行平末端连接(但不进行连接点标记如加入带生物素标记的核苷酸修复粘末端)或者采用平末端限制性内切酶酶切然后进行平末端连接。末端连接可以例如通过使用具有末端连接活性的 DNA 连接酶来进行, 所述具有末端连接活性的 DNA 连接酶例如 T4 DNA 连接酶、T3 DNA 连接酶、大肠杆菌 DNA 连接酶、热稳定 DNA 连接酶等。连接反应中使用的酶和底物的量、以及反应条件可由本领域技术人员视需要适宜选择。例如, 通常可以在 0.1~10×连接酶缓冲液中于 0~80℃(优选 10~40℃)进行约 1 分钟~200 小时(优选 1~30 小时)。

在所述步骤 E 中, 使所述步骤 D 中得到的重新连接的被固定化的染色质片段解除固定化, 释放 DNA 片段。在本说明书中, “解除固定化”是指: 解除所述被固定化的染色质片段中、在三维空间上相互接近的部分的被固定状态。例如, 在所述固定化是通过将染色质上的蛋白质交联而实现的情况下, 所述“解除固定化”是指蛋白质去交联。蛋白质去交联的方法是本领域技术人员已知的, 通常可以采用生物、化学处理进行解交联的方法和/或高温处理解交联的方法, 从而释放 DNA 片段。例如, 作为高温处理解交联的方法, 可以通过将上述连接反应后的体系置于 50~100℃(优选 60~80℃)、1 分钟~200 小时(优选 1~30 小时)来进行蛋白质解交联。作为生物、化学处理解交联的方法, 可以通过向所述体系中加入内肽酶、丝氨酸蛋白酶、巯基蛋白酶、金属蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶、组织蛋白酶、木瓜蛋白酶、枯

草杆菌蛋白酶、蛋白酶 K、DTT、NaCl、KCl 或它们的组合来进行。当然，也可以通过组合使用生物、化学处理解交联的方法和高温处理解交联的方法来进行蛋白质解交联。此外，在下述步骤 F 的 DNA 片段扩增步骤中存在高温处理步骤的情况下，所述步骤 E 也可以与步骤 F 一并进行。

在步骤 F 中，对所述步骤 E 中释放的 DNA 片段进行扩增，得到扩增产物。对于扩增方法没有特殊限制，只要能够获得对构建测序用 DNA 文库而言为充足量（例如 0.001~1000ng）的扩增产物即可。例如，可以采用 MDA、MALBAC、NEB-WGA、GenomePlex（优选 MALBAC）等适合少量细胞、单细胞或微量 DNA 的扩增方法，这些扩增方法的具体条件可由本领域技术人员视需要适宜选择。上述扩增方法通常可基于 PCR 反应（聚合酶链反应）来进行，所述 PCR 反应一般通过一定的 PCR 反应程序（温度循环）来实现。所述 PCR 反应程序一般包括变性、退火、延伸等步骤。PCR 反应中使用的引物的设计是本领域技术人员熟知的，例如可以按照《分子克隆实验指南》（J.萨姆布鲁克（Sambrook.J.）等著，黄培堂等译，第 3 版，2005）的教导来进行设计，或者利用计算机软件（例如 Premier 公司开发的 Primer Premier 6.0）来进行设计。

在所述步骤 G 中，将所述步骤 F 中得到的扩增产物片段化，得到更小的 DNA 片段。在本说明书中，“更小的 DNA 片段”是指其大小适于构建测序（例如二代测序、三代测序或四代测序）用 DNA 文库，例如 Illumina DNA 测序文库。“更小的 DNA 片段”的具体大小可以是例如 10~50000bp、优选 50~1000bp。在非专利文献 2 所记载的 Hi-C 方法中，只适合使用识别 4 碱基序列的限制性内切酶进行扩增产物片段化，但是，在本发明的方法中，还可以采用超声打断法、转座酶法、液压剪切法将所述扩增产物片段化。这提高了分辨率，能够获得更多的信息。采用上述方法将扩增产物片段化的技术是本领域技术人员已知的，可视需要选择适宜条件来进行。

在所述步骤 H 中，以所述步骤 G 中得到的更小的 DNA 片段作为待测序 DNA 片段，构建测序用 DNA 文库。可以采用例如标准 Illumina DNA 小片段建库方法、PCR free 方法、一步法等 DNA 小片段建库方法来构建所述测序用 DNA 文库。各种构建测序用 DNA 文库的方法是本领域技术人员已知的，可以由本领域技术人员按照常规操作来进行。例如，标准 Illumina DNA 小片段建库方法通常包括末端修复、末端加 A、Adapter 连接、扩增、扩增产物纯化等步骤，可以按照 Illumina 公司推荐的方法来进行。

需要说明的是，在上述步骤 C~G 中均可以视需要取一部分产物进行下一步骤。

通过对采用本发明的方法构建的测序用 DNA 文库的全部或部分进行测序，再与染色质 DNA 一级序列信息进行比对，即可获得可能在空间上相互作用的染色质区域的信息。

实施例

以下结合实施例，对本发明进行进一步详细说明。应当理解，此处所描述的具体实施例是用于解释本发明，并非对本发明的限定。

实施例 1

1. 样本处理

1.1 交联

1.1.1 将 1-10 个人白细胞样本置于 10 μ L 的 PBS 中制成细胞悬浮液滴；

1.1.2 加入 10 μ L 4%的甲醛溶液进行交联，室温静置 5min；

1.1.3 向反应液滴中加入 5 μ L 浓度为 0.25M 的甘氨酸溶液终止交联。在室温下静置 5min，然后冰浴 15min。

1.2 单细胞（少量细胞）挑取

采用毛细管法挑出单个细胞或少量细胞置于裂解液中。

裂解液配方：

10mM Tris-HCl pH 7.4

30mM NaCl

0.2% NP-40

10% protease inhibitor cocktail

无菌水

2. 细胞裂解

2.1 将含有单细胞样本的细胞裂解缓冲液微离心将液体汇聚于管底，之后冰浴 45min；

2.2 加入 4%的 SDS 溶液使 SDS 终浓度为 0.35%，37 $^{\circ}$ C 温浴 60min；

2.3 加入 20%的 Triton X-100 溶液使 Triton X-100 终浓度为 3%，37 $^{\circ}$ C 温浴 60min。

3. 染色质消化

3.1 对每个样品，加入 8U（国际单位）的 *Mbo* I，以及终浓度为 1 \times 的 NEBuffer 3.1 缓冲液。37 $^{\circ}$ C 温浴 16 小时。

3.2 失活内切酶。65 $^{\circ}$ C，温浴 20min。

4. DNA 重连和 DNA、蛋白解交联

4.1 对每个样品，加入 8U（国际单位）T4 DNA 连接酶以及终浓度为 1x 的连接酶缓冲液。16 $^{\circ}$ C 温浴 16 小时。

4.2 65 $^{\circ}$ C 温浴 16 小时。

5. DNA 扩增

使用基于 MALBAC 方法的亿康单细胞全基因组扩增试剂盒，按照试剂盒说明书、对前面得到的样品进行 DNA 扩增，获得重连 DNA 的扩增产物。

6. DNA 片段化

使用 Diagenode Bioruptor UCD-600 (NGS) 对扩增产物进行超声打断, 打断程序为: 30 秒超声, 30 秒休息, 22 个循环。将前面扩增的 DNA 片段化成片段大小在 100-700bp 之间的 DNA 片段。

7. 小片段文库构建

7.1 末端修复

根据下表向上步产物中加入加末端修复反应体系:

打断后DNA样品	75 μ L
10 \times PNK buffer	10 μ L
dNTP Solution Set (10mM)	4 μ L
T4 DNA Polymerase	5 μ L
T4 Polynucleotide Kinase	5 μ L
Klenow Fragment	1 μ L
Total volume	100 μ L

将样本置于 Thermomixer 中 20 $^{\circ}$ C 温浴 30 min。反应结束后使用 Beckman Agencourt AMPure XP 核酸纯化试剂盒回收纯化反应体系中的 DNA, 溶于 32 μ L 的水中。

7.2 末端加“A”

根据下表向上步产物中加入加“A”反应体系:

来自上一步样品	32 μ L
10 \times blue buffer	5 μ L
dATP (1mM)	10 μ L
Klenow (3'-5'exo-)	3 μ L
Total volume	50 μ L

将样本置于 Thermomixer 中 37 $^{\circ}$ C 温浴 30min。使用 Beckman Agencourt AMPure XP 核酸纯化试剂盒回收纯化反应体系中的 DNA, 溶于 18 μ L 的水中。

7.3 “Adapter”连接:

根据下表向上步产物中加入“Adapter”反应体系:

来自上一步样品	18 μ L
2 \times Rapid ligation Buffer	25 μ L
PE Index Adapter	2 μ L

T4 DNA Ligase	5 μ L
Total volume	50 μ L

将样本置于Thermomixer中20 $^{\circ}$ C温浴15min。使用Beckman Agencourt AMPure XP 核酸纯化试剂盒回收纯化反应体系中的DNA，溶于30 μ L的水中。

7.4 文库扩增

根据下表向上步产物中加入以下反应体系：

加Adapter纯化后样本	X μ L
Index-X (10pmol/ μ L)	2 μ L
Ann公共引物 (10pmol/ μ L)	2 μ L
HiFi DNA Polymerase Mix	25 μ L
ddH ₂ O	(21-X) μ L
Total volume	50 μ L

PCR 反应的程序设定如下：

94 $^{\circ}$ C	3 min	
94 $^{\circ}$ C	15 s	} 10 cycles
63 $^{\circ}$ C	30 s	
72 $^{\circ}$ C	30 s	
72 $^{\circ}$ C	5 min	
4 $^{\circ}$ C	∞	

使用 Beckman Agencourt AMPure XP 核酸纯化试剂盒进行纯化；15 μ L 水溶解；纯化后测定 DNA 浓度。

7.5 文库质检，上机进行双端测序，获得数据

与非专利文献 1 和 2 不同，本发明不使用生物素钩取重连位点 DNA 片段，而是利用信息学分析过滤掉非重连位点所处的片段。由于标准的 Hi-C 测序数据分析方法中即有对这种片段的过滤（该过滤条件在非专利文献 1 和 2 中是为了去除文库中残余的被生物素标记的未重连片段），所以本发明产生的文库无需额外的过滤条件即可进行生物信息学分析并获得染色体在三维空间上的互作信息。

7.6 获得的信息量及与现有文献中的单细胞核 Hi-C 对比

本发明使用 *Mbo* I（识别位点是 GATC 但对 Dam、Dcm 和 CpG 甲基化敏感）进行染色质消化，在 14M-19M 双端测序 reads 对的测序量下，捕获到染色质区域间的相互作用对数为 270-331K。与之相对比，非专利文献 2 的单细胞核 Hi-C 中使用 *Dpn* II（识别位点也是 GATC 但对 Dam、Dcm 甲基化敏感，也就是它的识别位点数理应高于 *Mbo* I，因此理论上应该获得更多的酶切片段和染色质区域互作信息）进行染色

质消化，在 13M 双端测序 reads 对的测序量下只能捕获到 12K 的染色质区域间的相互作用个数；非专利文献 2 中其余单细胞核采用 *Bgl* II 内切酶进行染色质消化，在 5.5M-15.3M 双端测序 reads 对的测序量下捕获到染色质区域间的相互作用个数为 11.7k-30.6k。采用本发明的获得的染色质构象信息显著高于非专利文献 2 的单细胞核 Hi-C 的方法。

	单细胞核 Hi-C 方法 (非专利文献 2)		本发明
染色质消化用酶	<i>Dpn</i> II	<i>Bgl</i> II	<i>Mbo</i> I
测序量	13M	5.5-15.3M	14-19M
捕获染色质互作对数	12K	11.7-30.6K	270-331K

还需要说明的是，在可实施且不明显违背本发明的主旨的前提下，在本说明书中作为某一技术方案的构成部分所描述的任一技术特征或技术特征的组合同样也可以适用于其它技术方案；并且，在可实施且不明显违背本发明的主旨的前提下，作为不同技术方案的构成部分所描述的技术特征之间也可以以任意方式进行组合，来构成其它技术方案。本发明也包含在上述情况下通过组合而得到的技术方案，并且这些技术方案相当于记载在本说明书中。

上述说明示出并描述了本发明的优选实施例，如前所述，应当理解本发明并非局限于本文所披露的形式，不应看作是对其他实施例的排除，而可用于各种其他组合、修改和环境，并能够在本文所述发明构想范围内，通过上述教导或相关领域的技术或知识进行改动。而本领域技术人员所进行的改动和变化不脱离本发明的精神和范围，则都应在本发明所附权利要求的保护范围内。

工业实用性

根据本发明，可以对少量细胞的样本进行染色质构象的检测。细胞类型包括但不限于：动物细胞、植物细胞、微生物细胞、病毒、癌细胞；这些细胞来源包括但不限于：原代培养、细胞系培养、组织、生物体、环境来源、化石。

根据本发明，可以比较不同细胞之间染色体构象的区别。这些细胞之间的区别包括但不限于：不同物种来源、不同器官来源、不同细胞种类、不同细胞周期、不同发育阶段、不同培养条件、不同处理条件、不同细胞个体。

根据本发明，可以分析细胞内染色质构象变化与其他 DNA、RNA、蛋白质的变化之间的联系。这些变化包括但不限于以下方面：DNA 突变、DNA 甲基化变化、基因敲除、基因敲入、转基因、RNA 表达变化、RNA 沉默、microRNA 表达变化、长非编码 RNA 表达变化，16s rDNA 变化、mRNA 表达变化、核糖

体 RNA 表达变化、RNA 构象变化、DNA 构象变化、DNA 调控元件变化、染色体异常、染色体缺失、染色体重复、染色体异位、染色体构象变化、CNV、蛋白表达变化、抗原抗体变化、分泌蛋白变化、膜蛋白变化。

根据本发明，可以研究细胞染色质构象与特定基因、DNA、RNA、蛋白之间的关系，分析细胞内特定蛋白与细胞核内 DNA、RNA 之间的相互作用。

根据本发明，可以与其他研究 DNA、RNA、蛋白的方法联合使用研究细胞特性或功能，以及染色质构象、DNA、RNA 和蛋白质的功能。这些其他研究 DNA、RNA、蛋白的方法包括但不限于：基因芯片、QPCR、一代测序、二代测序、三代测序、四代测序、基因测序、基因组测序、宏基因组测序、外显子测序、内含子测序、目标基因捕获测序、RNA 测序、表达谱测序、转录组测序、小 RNA 转录组、微 RNA 测序、宏转录组测序、LncRNA 测序、肿瘤基因测序、肿瘤基因组测序、Bisulfite 甲基化测序、ChIP-DNA 测序、MeDIP 测序、RRBS 测序、Target-BS 测序、hmC 测序。

权利要求

1. 一种构建 Hi-C 文库的方法，该方法包括下述步骤：
步骤 B：获得少量的被固定化的染色质；
步骤 C：对所述步骤 B 中获得的被固定化的染色质进行消化，得到被固定化的染色质片段；
步骤 D：将所述步骤 C 中得到的被固定化的染色质片段直接进行重新连接，得到重新连接的被固定化的染色质片段；
步骤 E：使所述步骤 D 中得到的重新连接的被固定化的染色质片段解除固定化，释放 DNA 片段；
步骤 F：对所述步骤 E 中释放的 DNA 片段进行扩增，得到扩增产物；以及
步骤 H：以所述扩增产物作为待测序 DNA 片段，构建测序用 DNA 文库。
2. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，所述少量的被固定化的染色质是 10^{-6} ~ 10^2 ng 的染色质，以裸 DNA 计。
3. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，所述少量的被固定化的染色质是 10^{-5} ~10ng 的染色质，以裸 DNA 计。
4. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，所述步骤 C 中使用脱氧核糖核酸酶对所述被固定化的染色质进行消化。
5. 根据权利要求 4 所述的方法，其中，所述脱氧核糖核酸酶是 I 型限制性内切酶、II 型限制性内切酶或 III 型限制性内切酶。
6. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，所述步骤 D 中采用粘末端或平末端连接方法将所述步骤 C 中得到的被固定化的染色质片段进行重新连接。
7. 根据权利要求 1 所述的方法，其还包括：
步骤 G：将所述步骤 F 中得到的扩增产物片段化，得到更小的 DNA 片段；且
所述步骤 H 中，以所述步骤 G 中得到的更小的 DNA 片段作为待测序 DNA 片段，构建测序用 DNA 文库。
8. 根据权利要求 7 所述的方法，其中，所述步骤 G 中采用超声打断法、转座酶法、内切酶酶切法或液压剪切法将所述扩增产物片段化。
9. 根据权利要求 8 所述的方法，其中，所述步骤 G 中得到的更小的 DNA 片段的大小为 50~1000bp。
10. 根据权利要求 1 所述的方法，其还包括：
步骤 A：获取少量的染色质被固定化的细胞；且
在所述步骤 B 中，裂解所述步骤 A 中获取的细胞，获得少量的被固定化的染色质。
11. 根据权利要求 10 所述的方法，其中，所述少量的染色质被固定化的细胞是 1~10000 个细胞。
12. 根据权利要求 10 所述的方法，其中，所述少量的染色质被固定化的细胞是 1~1000 个细胞。

13. 根据权利要求 10 所述的方法，其中，所述少量的染色质被固定化的细胞是单个细胞。

14. 根据权利要求 10 所述的方法，其中，所述步骤 A 包括：

步骤 A-1：对一定量的细胞的染色质进行固定化，得到一定量的染色质被固定化的细胞；以及

步骤 A-2：从所述步骤 A-1 得到的一定量的染色质被固定化的细胞中挑取少量的染色质被固定化的细胞。

15. 根据权利要求 10 所述的方法，其中，所述步骤 A 包括：

步骤 A-3：对少量的细胞的染色质进行固定化，得到少量的染色质被固定化的细胞。

16. 一种测定可能在空间上相互作用的染色质区域的方法，该方法包括：

采用权利要求 1~15 中任一项所述的方法构建 Hi-C 文库；以及

对所述 Hi-C 文库的全部或部分进行测序，并将所获得信息与染色质 DNA 一级序列信息进行比对。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2015/092181

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C40B 50/06 (2006.01) i; C12Q 1/68 (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)

C40B; C12Q

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)

CPRSABS, SIPOABS, CNTXT, CNKI and Key words: chromosome conformation, Hi-C, single cell etc.;

DWPI, WOTXT, EPTXT, USTXT, ISI Web of Science and key words: chromosome conformation, Hi-C, single cell etc.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2015071748 A1 (ERASMUS UNIVERSITEIT MEDISCH CT ROTTERDAM), 21 May 2015 (21.05.2015), claim 1, and description, page 16, lines 6-36, page 18, lines 31-34, page 20, lines 26-35 and page 21, lines 33-37	1-16

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search
18 July 2016 (18.07.2016)

Date of mailing of the international search report
25 July 2016 (25.07.2016)

Name and mailing address of the ISA/CN:
State Intellectual Property Office of the P. R. China
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao
Haidian District, Beijing 100088, China
Facsimile No.: (86-10) 62019451

Authorized officer
YANG, Zhenyu
Telephone No.: (86-10) **62089435**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2015/092181

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2015071748 A1	21 May 2015	AU 2014349817 A1	19 May 2016
		GB 201320351 D0	01 January 2014
		CA 2928012 A1	21 May 2015

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2015/092181

<p>A. 主题的分类</p> <p>C40B 50/06(2006.01)i; C12Q 1/68(2006.01)i</p> <p>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</p>								
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C40B; C12Q</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>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))</p> <p>CPRSABS, SIPOABS, CNTXT, CNKI和关键词: 染色体构象, Hi-C, 单细胞, 等; DWPI, WOTXT, EPTXT, USTXT, ISI_Web of Science和关键词: chromosome conformation, Hi-C, single cell, 等</p>								
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 2015071748 A1 (ERASMUS UNIVERSITEIT MEDISCH CT ROTTERDAM) 2015年 5月 21日 (2015 - 05 - 21) 权利要求1, 说明书第16页第6-36行, 第18页第31-34行, 第20页第26-35行, 第21页第33-37行</td> <td>1-16</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	WO 2015071748 A1 (ERASMUS UNIVERSITEIT MEDISCH CT ROTTERDAM) 2015年 5月 21日 (2015 - 05 - 21) 权利要求1, 说明书第16页第6-36行, 第18页第31-34行, 第20页第26-35行, 第21页第33-37行	1-16
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求						
X	WO 2015071748 A1 (ERASMUS UNIVERSITEIT MEDISCH CT ROTTERDAM) 2015年 5月 21日 (2015 - 05 - 21) 权利要求1, 说明书第16页第6-36行, 第18页第31-34行, 第20页第26-35行, 第21页第33-37行	1-16						
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>								
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“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)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” 同族专利的文件</p>								
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2016年 7月 18日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2016年 7月 25日</p>						
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>受权官员</p> <p>杨振宇</p> <p>电话号码 (86-10)62089435</p>						

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2015/092181

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)
WO	2015071748	A1	2015年 5月 21日	AU	2014349817	A1	2016年 5月 19日
				GB	201320351	D0	2014年 1月 1日
				CA	2928012	A1	2015年 5月 21日
.....							