

(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
2023 年 1 月 19 日 (19.01.2023)



(10) 国际公布号
WO 2023/284768 A1

(51) 国际专利分类号:
C12Q 1/6869 (2018.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/105384

(22) 国际申请日: 2022 年 7 月 13 日 (13.07.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202110788220.5 2021年7月13日 (13.07.2021) CN

(71) 申请人: 北京爱普益生物科技有限公司 (IPE BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) [CN/CN]; 中国北京市北京经济技术开发区地盛东路1号院1幢A座五层, Beijing 100176 (CN)。

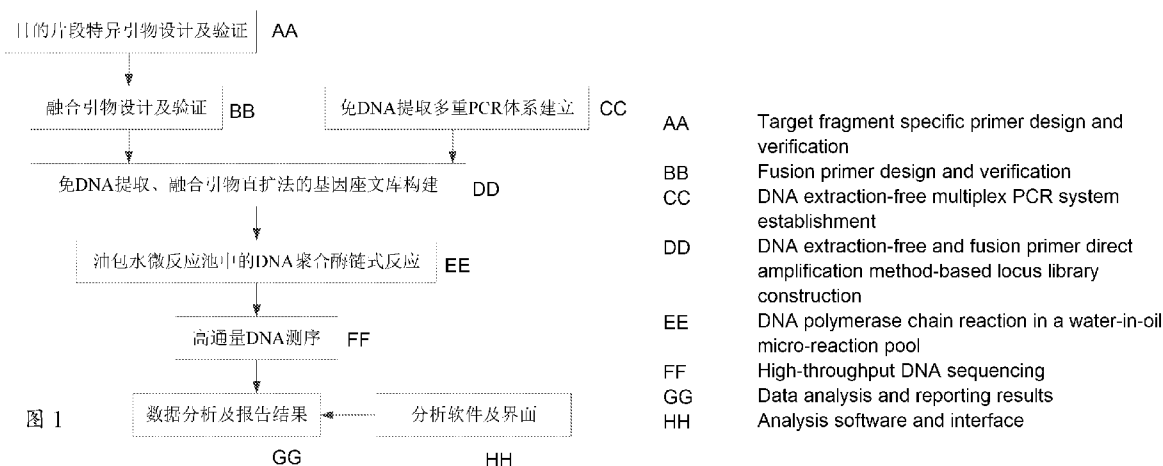
(72) 发明人: 潘雅姣 (PAN, Yajiao); 中国北京市北京经济技术开发区地盛东路1号院1幢A座五层, Beijing 100176 (CN)。 曲保旺 (QU, Baowang); 中国北京市北京经济技术开发区地盛东路1号院1幢A座五层, Beijing 100176 (CN)。 陈朝辉 (CHEN, Chaohui); 中国北京市北京经济技术开发区地盛东路1号院1幢A座五层, Beijing 100176 (CN)。

(74) 代理人: 北京方圆嘉禾知识产权代理有限公司 (BEIJING FINELAND IP FIRM); 中国北京市海淀区彩和坊路8号11层1104-2, 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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,

(54) Title: FUSION PRIMER DIRECT AMPLIFICATION METHOD-BASED HUMAN MITOCHONDRIAL WHOLE GENOME HIGH-THROUGHPUT SEQUENCING KIT

(54) 发明名称: 融合引物直扩法人类线粒体全基因组高通量测序试剂盒



(57) Abstract: Disclosed in the present invention is a fusion primer direct amplification method-based human mitochondrial whole genome high-throughput sequencing kit, comprising a library preparation kit, a sequencing template preparation kit, and a sequencing kit, wherein the library preparation kit comprises multiplex PCR primer pools labeled with different sample tags, a DNA extraction-free PCR amplification enzyme, a PCR reaction buffer solution, 2800 control DNA and DNA purification magnetic beads. The fusion primer direct amplification method-based human mitochondrial whole genome high-throughput sequencing kit of the present invention has low test costs and is convenient to operate.

(57) 摘要: 本发明公开了一种融合引物直扩法人类线粒体全基因组高通量测序试剂盒, 包括文库制备试剂盒、测序模板制备试剂盒和测序试剂盒; 其中所述文库制备试剂盒包含不同样本标签标记的多重PCR引物池、免DNA提取PCR扩增酶、PCR反应缓冲液、2800对照DNA和DNA纯化磁珠。本发明的融合引物直扩法人类线粒体全基因组高通量测序试剂盒, 检测成本低, 操作方便。

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, 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, 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, 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))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

融合引物直扩法人类线粒体全基因组高通量测序试剂盒

本申请要求于 2021 年 07 月 13 日提交中国专利局、申请号为“202110788220.5”、发明名称为“融合引物直扩法人类线粒体全基因组高通量测序试剂盒”的中国专利申请的优先权，其全部内容通过引用结合在本申请中。

技术领域

本发明涉及法医学、刑侦及物证鉴定技术领域，尤其是涉及一种融合引物直扩法人类线粒体全基因组高通量测序试剂盒。

背景技术

线粒体 DNA 在人类起源进化研究和法医身份识别领域具有重要作用，其中，线粒体 DNA 具有母系遗传不重组的特点，可利用该遗传特征进行人类起源进化研究。与核 DNA 相比，线粒体 DNA 拷贝数高、结构稳定，在恶劣的条件下仍能完整保存，适用于法医陈旧检材和高度降解检材鉴定。

人类线粒体基因组序列是一个长度为 16569bp 的环状遗传物质，按照功能可分长度为 1122bp 的控制区和长度为 15447bp 的编码区，其中在控制区内包含 3 个高变区，具有良好多态性。

目前，对线粒体的研究常常局限于控制区的高变区、部分特征性编码区单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)。但是，仅对线粒体部分区域进行检测会降低多态信息含量，导致随机匹配人数增加并降低系统排除能力，增加冤假错案增加的可能。

毫无疑问，线粒体全基因组数据将会比现在提供更准确的信息。目前多数的线粒体基因组数据是由传统的 Sanger 测序法获得，但这个工作费时费力。高通量测序技术(high-throughput sequencing, HTS)，又称大量并行测序技术(Massive parallel sequencing, MPS)，一次可对多个样本的几十万到几百万条 DNA 分子进行序列测定，为 DNA 分析提供了一种全新的技术手段。但是，MPS 技术需要进行 DNA 提取、连接等操作，过程复杂，工作效率低。

发明内容

本发明的目的是提供一种融合引物直扩法人类线粒体全基因组高通量测序试剂盒，检测成本低，操作方便。

为实现上述目的，本发明提供了一种融合引物直扩法人类线粒体全基因组高

高通量测序试剂盒，包括文库制备试剂盒、测序模板制备试剂盒和测序试剂盒；

文库制备试剂盒包含不同样本标签标记的多重 PCR 引物池、免 DNA 提取 PCR 扩增酶、PCR 反应缓冲液、2800 对照 DNA 和 DNA 纯化磁珠。

优选的，多重 PCR 引物池包括 SEQ ID NO: 91~129 所示的样本标签序列以及 tcacgaata。

优选的，测序模板制备试剂盒来自美国赛默飞公司。

优选的，测序试剂盒来自美国赛默飞公司。

融合引物直扩法人类线粒体全基因组高通量测序试剂盒，制备步骤如下：

(1))设计由特异引物、样本标签和接头序列组成的融合引物；

(2)建立免 DNA 提取的 PCR 体系：PCR 体系由抗血液中 PCR 抑制成分的特殊扩增酶和对应缓冲液 buffer 组成；

(3)建立免 DNA 提取、融合引物直扩的基因座文库；

(4)乳液 DNA 聚合酶链式反应(emulsion PCR, ePCR)获得测序模板，通过携带单一 DNA 片段的颗粒经乳液覆盖形成独立的 PCR 微反应池，实现整个片段文库的独立平行扩增；

(5)高通量 DNA 测序；

(6)数据分析及展示报告结果。

因此，本发明采用上述一种融合引物直扩法人类线粒体全基因组高通量测序试剂盒，形成全套适用于高通量 DNA 测序平台，实现多样本线粒体全基因组平行、稳定测试的试剂盒。

试剂盒免 DNA 提取、免连接文库构建，单次测定可在一个工作日内完成，一次测定实现几十到几百人份的线粒体全基因组检测，测定成本和操作时间容许大批量的建库使用。

本发明的基于高通量 DNA 测序的人类线粒体全基因组检测试剂盒，包含文库制备、油包水 PCR 测序模板制备和高通量测序流程的全部试剂，具有如下技术效果：

(1)线粒体全基因组序列检测，提高多态信息含量；

(2)实现多样本的平行测试，提高检测效率；

(3)免 DNA 提取、免连接的直扩法建库，文库构建时间压缩至 2 个小时，单次测定时间压缩至一个工作日。

下面通过附图和实施例，对本发明的技术方案做进一步的详细描述。

附图说明

图1是本发明一种融合引物直扩法人类线粒体全基因组高通量测序试剂盒的制备技术流程图；

5图2是免DNA提取PCR体系(10mL)下，不同模板类型对多重PCR扩增效率电泳示意图；

图3是应用Ion S5XL™测序平台对线粒体基因组全序列测序结果示意图。

具体实施方式

以下通过附图和实施例对本发明的技术方案作进一步说明。

10 实施例一

直扩法测序文库的构建

增殖子文库指两端连有不同接头的DNA片段，其中，一侧为测序接头：可以含样本标签，以区分不同样本的测序结果；另外一侧为固定接头：用于连接捕获颗粒。

15 增殖子文库结构如下：P接头-目的扩增子-样本标签-A接头通用部分。

由目的片段特异性引物、接头和样本标签组成的融合引物，具有血源扩增能力的PCR扩增酶和缓冲液，血液样本经多重PCR扩增即可直接获得由多个STR目的片段组成，并且两端连有不同接头序列，带有样本标签的DNA文库，节约了现有高通量DNA测序文库构建的DNA提取、单重PCR、PCR产物混合和接头连接多个步骤。

20

表1 直扩法构建测序文库的PCR体系组成

组成	功能	获得方式
融合引物	使扩增产物连有接头和样本标签，用于后续的高通量测序反应和样本区分。	融合引物设计，包括目的片段特异引物、接头和样本标签设计。
PCR 扩增酶	抗血液PCR抑制成分，使血液可以作为PCR模板直接使用，避免DNA提取。	筛选基因突变的Taq工程菌
PCR 缓冲液	增强PCR扩增效率，使血液可以作为PCR模板直接使用。	PCR缓冲液的配制，包括PCR增强剂、pH值调整
融合引物比例	各融合引物的比例经过调整，使各STR基因座的PCR产物量基本一致。	多重PCR平衡性调整

一、融合引物设计

融合引物是除了目的片段特异性引物外，还含有其他包括测序接头、固定接

头、样本标签的长引物序列。融合引物结构如下，其中 A 接头为测序引物区，P 接头为捕获颗粒结合区，样本标签用以区分不同样本。

上游融合引物：

5'-A 接头(30 个碱基)样本标签(10 个碱基)目的片段上游引物(19-23 碱基)-3'

下游融合引物：

5'-P 接头(23 个碱基)目的片段下游引物(19-23 碱基)-3'

其中，目的片段特异引物用于扩增人类线粒体全基因组目的片段；接头序列包括固定接头和测序接头，分别用于绑定捕获磁珠及测序引物，以完成后续的油包水 PCR 和测序反应。样本标签序列用于区分不同样本。

(1)人线粒体全基因组目的片段引物设计及验证

以 NC_012920.1 剑桥修正版人类线粒体全基因组序列为基础，采用 Primer5.0 在线工具进行目的片段引物设计。NC_012920.1 参考基因组全长 16569bp，表 2 列出引物设计分布，序列编号 1~44 是上游引物，序列编号 45~88 是对应的下游引物，引物包含线粒体参考基因组末尾及开头(线粒体为环状)。采用琼脂糖电泳对扩增产物的特异性和含量进行检测，采用测序法对扩增产物序列的准确性进行检测，证明其可用性。

表 2 特异引物的序列对应线粒体基因组位置

序列编号	线粒体基因组位置	序列编号	线粒体基因组位置	序列编号	线粒体基因组位置
1、45	17-332	16、60	6070-6447	31、75	11460-11793
2、46	361-774	17、61	6458-6839	32、76	11798-12107
3、47	869-1253	18、62	6859-7191	33、77	12113-12470
4、48	1347-1677	19、63	7238-7612	34、78	12471-12806
5、49	1697-2125	20、64	7617-7958	35、79	12836-13229
6、50	2167-2531	21、65	7992-8304	36、80	13234-13587
7、51	2549-2932	22、66	8333-8675	37、81	13607-13957
8、52	2986-3380	23、67	8676-8978	38、82	13990-14388
9、53	3395-3756	24、68	8982-9330	39、83	14453-14807
10、54	3790-4173	25、69	9339-9639	40、84	14817-15166
11、55	4187-4581	26、70	9640-9949	41、85	15187-15537
12、56	4639-5026	27、71	9973-10289	42、86	15550-15941
13、57	5045-5378	28、72	10294-10622	43、87	15971-16294
14、58	5382-5713	29、73	10651-10981	44、88	16316-16
15、59	5718-6069	30、74	11002-11423		

(2)接头序列设计(选择高通量测序平台)

不同的高通量测序平台均具有特定的接头序列，具有以下特点：①基于离子

半导体测序原理，测序成本低；②快速，上机测序只需 2~3 小时③测序读长 200~400 碱基，可以满足测序读长需要；④灵活性强，具有满足不同通量需求的多种芯片。

本发明选择赛默飞测序系统为检测平台，其对应的接头序列见表 3。P 接头即固定接头，用于绑定 DNA 捕获磁珠，A 接头即测序接头用于以通用引物测序。

表 3 接头序列

序列编号	接头	序列
89	A 接头	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
90	P 接头	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT

(3)样本标签序列设计及验证

平行检测的样本均由唯一的样本标签加以区分，在通量足够的前提下，平行检测的样本数由可用的样本标签数决定，表 4 列出经过本发明验证的 40 个样本标签。

表 4 样本标签序列

样本标签编号	序列编号	样本标签编号	序列编号	样本标签编号	序列编号
code001	91	code015	104	code029	118
code002	92	code016	105	code030	119
code003	93	code017	106	code031	120
code004	94	code018	107	code032	121
code005	95	code019	108	code033	122
code006	96	code020	109	code034	123
code007	tcacgaata	code021	110	code035	124
code008	97	code022	111	code036	125
code009	98	code023	112	code037	126
code010	99	code024	113	code038	127
code011	100	code025	114	code039	128
code012	101	code026	115	code040	129
code013	102	code027	116		
code014	103	code028	117		

二、建立血源直扩的 PCR 扩增体系(包括 PCR 酶和缓冲液)

筛选基因突变的 Taq 工程菌，由于 N 端含约 10 个氨基酸的缺失突变，该工程菌的 Taq 酶蛋白产物具有抗血液 PCR 抑制成分的功能。配合含有 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 等 PCR 增强剂、且具有较高的 pH 值的 PCR 缓冲液。性能验证结果显示，在含有抗血源 PCR 抑制成分的情况下，该 PCR 反应体系仍能保持理想的多重 PCR 扩增效

率。在图 2 中，1、2 泳道为 10ng 基因组 DNA 模板，3、4 泳道为直径 1mm 血片模板，M 为 100bp marker。

三、建立平衡的多重 PCR 体系

通过调整多重 PCR 扩增体系中各引物对的比例，实现各 STR 目的扩增产物量的平衡，多重 PCR 体系的各引物池内 44 对融合引物比例见表 5。

表 5 各引物池内 44 对融合引物比例表

引物名称（以产物在线粒体基因组位置表示）	浓度（M/PCR 反应体系）	引物名称（以产物在线粒体基因组位置表示）	浓度（M/PCR 反应体系）
17-332	0.01-0.03	8676-8978	0.06-0.08
361-774	0.05-0.07	8982-9330	0.04-0.07
869-1253	0.03-0.05	9339-9639	0.03-0.05
1347-1677	0.03-0.05	9640-9949	0.04-0.07
1697-2125	0.06-0.08	9973-10289	0.04-0.07
2167-2531	0.03-0.05	10294-10622	0.03-0.05
2549-2932	0.03-0.05	10651-10981	0.04-0.07
2986-3380	0.06-0.08	11002-11423	0.04-0.07
3395-3756	0.1-0.3	11460-11793	0.1-0.3
3790-4173	0.03-0.06	11798-12107	0.05-0.08
4187-4581	0.01-0.04	12113-12470	0.050-0.08
4639-5026	0.03-0.05	12471-12806	0.05-0.08
5045-5378	0.05-0.09	12836-13229	0.08-0.12
5382-5713	0.05-0.08	13234-13587	0.060-0.08
5718-6069	0.04-0.07	13607-13957	0.1-0.1
6070-6447	0.04-0.07	13990-14388	0.08-0.12
6458-6839	0.04-0.07	14453-14807	0.08-0.12
6859-7191	0.03-0.05	14817-15166	0.04-0.07
7238-7612	0.05-0.08	15187-15537	0.04-0.07
7617-7958	0.04-0.07	15550-15941	0.08-0.12
7992-8304	0.04-0.07	15971-16294	0.04-0.07
8333-8675	0.04-0.07	16316-16	0.04-0.07

实施例二

油包水微反应器中的 DNA 聚合酶链式反应(emPCR)以获得测序模板

(1)上述多重 PCR 直接扩增生成的文库内容经 P 接头被固定在捕获磁珠上，使每个磁珠携带一个单一的 DNA 片段。

(2)将水相的 PCR 试剂与油相的试剂乳化，形成了乳液，携带模板的磁珠与乳液混合后进入液滴中，其中每个液滴为一个油包水的微反应池。

(3)整个片段文库的扩增在每个油包水微反应池中平行进行，形成测序模板。

实施例三

平行批量式 DNA 测序

采用高通量 DNA 测序仪进行，例如赛默飞的 PGM 或 S5/S5 XL，测序反应

5 采用边合成边测序的方式进行。

(1)上述文库内容的 emPCR 产物经 A 接头与测序通用引物结合；

(2)4 种脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP, N 为 A、G、C、T)依次参入 PCR 合成体系；

(3)当加入的 dNTP 与测序模板配对时，发生 DNA 聚合反应；

10 (4)DNA 聚合反应释放的 H 离子引发 pH 变化被识别，完成 1 个碱基的测序；

(5)重复步骤 2~4，直至整条 DNA 片段的测序完成。

实施例四

数据分析及报告结果

(1)数据质控：根据测序长度和质量，对原始数据进行过滤；

15 (2)测序信息归类：根据测序结果中的样本标签序列进行，测序结果能够被有效归类至不同样本文件夹中。

(3)根据与标准参考序列比对，发现样本线粒体基因组序列的变异。

实施例五

40 份样品的线粒体全基因组序列平行检测

20 (一)实验材料

试剂：融合引物直扩法人类线粒体全基因组(mtDNA)高通量测序试剂盒，包括：

1)文库制备试剂盒,含 40 套由不同样本标签标记的多重 PCR 引物池,免 DNA 提取 PCR 扩增酶，PCR 反应缓冲液，2800 对照 DNA、DNA 纯化磁珠；

25 2)测序模板制备试剂盒(购自美国赛默飞公司)；

3)测序试剂盒(购自美国赛默飞公司)。

样本：以点制于滤纸基质的全血为样本。

(二)实验步骤

1.文库制备

30 1)样本制备

以直径 1mm 打孔器，按一定顺序将 39 份血片打入 96 孔 PCR 板，每个样本取血片 1 份，每个 96 孔板的第 1 孔加入 1ng 2800 control DNA。

2)多重 PCR

将保存于 96 孔板的 40 个多重 PCR 体系，以每孔 10mL 加入到对应的装有血片的 PCR 板中。10mL 多重 PCR 体系包括如下组分：

组分名称	组分	体积 (mL)
5*PCR buffer	Tris-HCl、Mg ²⁺ 、(NH ₄) ₂ SO ₄ 等 PCR 增强剂	2.0
Taq	PCR 扩增酶	0.8
10mM dNTPs	4 种脱氧核糖核苷三核酸	0.2
PCR Mix1-40	由不同样本标签标记的上游融合引物，下游融合引物组成	1.0
dd H ₂ O	超纯水	2.0
总体积		10

按照如下程序进行 PCR：

温度	时间	循环数
95℃	3m	1
95℃	30s	22
60℃	30s	
68℃	1m	
68℃	10m	1
4℃	hold	hold

3)PCR 产物纯化

a、每孔取 5μL PCR 产物混合，放入 1.5mL 的 EP 管中，振荡混匀后取 50μL 用于纯化。

10 b、吸取 50μL PCR 混合产物到一个 1.5mL EP 管中，再加入 60mL 的纯化磁珠(磁珠需提前平衡至室温)，将移液器调至 150μL 吸打 10 次混匀。

c、将步骤 a 中的混合液在室温下平衡 5 分钟以达到最高回收效果。

d、将混合物放在磁力架上，静置 10 分钟。

e、移除上清液后，将离心管从磁力架取下来。

15 f、吸取 200μL 70%乙醇到离心管中，吸打 10 次以充分清洗磁珠，然后将离心管放置磁力架上静置 2 分钟，并移除上清。

g、重复步骤 e 一遍。

h、磁力架静置 10 分钟以充分干燥磁珠。

i、将 EP 管从磁力架拿出，加入 50μL 无核酸酶水洗脱，吸打混匀，室温静

置 30 分钟，期间吸打混匀 2-3 次。

j、EP 管放回磁力架，静置 2 分钟。取 48 μ L 上清液转移到一个新的 1.5mL EP 管，-20℃ 保存备用。

4)测序模板制备

5 以纯化后 PCR 产物 0.75ng 为模板，通过油包水 PCR 和阳性产物富集，制备高通量 DNA 测序模板。所用试剂为 510/520/530 TM Kit-Chef(A34019)中的 3 个小货号组分：Ion S5 chefsupplies(A27755)、Ion chef solutions(A27754)、Ion 510/520/530chef regents(A34018)。实验步骤如下，也可参照 510/520/530 TM Kit-Chef(A34019)试剂盒操作说明。

10 Chef 油包水 PCR 及芯片 loading

a、试剂及耗材入位

将 Ion PGM TM Hi-Q TM View Chef Reagents、Ion PGM TM Hi-Q TM Chef Solutions 分别放入 Ion 520/530Kit chef 里的 27756 和 27754 试剂卡盘；

15 Ion PGM TM Hi-Q TM View Chef Reagents 试剂卡盘的右上角 2 个文库孔，用来加测序文库，即步骤 2 的纯化产物

放入耗材、芯片。

b、创建运行程序

登录 Server 开始 Plan 创建

Plan→Templates→Whole Genome→ Plan New Run→ IonReporter→
20 Application→Next

参数设置

Sample Preparation Kit: 空白；

Library Kit Type: 空白；

Template Kit: Ion 520&530Kit Chef

25 Templating Size: 400；

Sequencing Kit: Ion S5 Sequencing Kit

Flow: 520 或 840；

Chip Type: 520chip

Plugins: FileExporter

30 输入项目名称，开始运行

Projects→添加新的“Project”→Plan→Run Plan Name 填写实验名称。

5)高通量 DNA 测序

将上述 loading 好的芯片放入 S5 或 S5 XL 设备开始测序，所用试剂为 510/520/530 TM Kit-Chef(A34019)中的 2 个小货号组分：Ion S5 sequencing solutions(A27767)、IonS5 sequencing regents(A27768)。实验步骤如下，具体也可参考参照 510/520/530 TM Kit-Chef(A34019)试剂盒说明书。

S5 设备的操作步骤如下：

- a、打开电源开关；
- b、触屏点 initialize；
- 10 c、放 Ion 520/530Kit chef 里小货号 27767 的 Ion S5 Wash solution bottle；
- d、放 Ion 520/530Kit chef 里小货号 27767 的 Ion S5 cleaning solutionbottle；
- e、废液缸清空；
- f、放 Ion 520/530Kit chef 里小货号 27768 的 Ion S5 sequencing regentcartridge；
- g、放步骤 3loading 好的芯片；
- 15 h、一切就绪后点击 Next 开始。

6)数据分析

a、数据质控结果

不同芯片得出的数据量有所差别，以其中一块 520 芯片为例，结果如图 3。芯片中的有效区域达 94%，其中连接有文库的为 99%。除去 28.4%的多克隆，11.9%的低质量文库和 0%的测试片段，最终有效文库为 59.7%，共 6.9×10^6 个读取片段，片段平均读长为 310bp，产生原始测序数据总量为 2.13Gb。

b、测序信息归类

根据样本标签序列信息，测序数据被归类至不同样本文件夹，结果如下：

表 6 样本标签归类结果

样本标签编号	测序数	样本标签编号	测序数	样本标签编号	测序数	样本标签编号	测序数
barcode001	3381530	barcode011	52755	barcode021	64071	barcode031	63318
barcode002	150873	barcode012	61214	barcode022	257648	barcode032	68201
barcode003	51281	barcode013	47439	barcode023	91980	barcode033	58947
barcode004	142962	barcode014	33061	barcode024	78880	barcode034	29074
barcode005	134333	barcode015	42572	barcode025	102635	barcode035	44606

barcode006	105587	barcode016	74482	barcode026	71364	barcode036	32848
barcode007	60085	barcode017	31497	barcode027	57655	barcode037	70967
barcode008	108503	barcode018	48408	barcode028	39988	barcode038	39734
barcode009	71192	barcode019	22828	barcode029	43889	barcode039	48045
barcode010	176430	barcode020	42900	barcode030	45132	barcode040	101478
其他（因测序误差无法归类）							298574
总计							6548939

c、序列微变异识别

有 937Mb 与参考序列匹配，占总序列数的 44%，平均测序深度为 1500×，其中达到与参考序列 99% 匹配的数据量为 851Mb。以突变比例 $\geq 80\%$ ，测序条数 ≥ 50 作为筛选标准，对线粒体基因组内序列微变异进行筛查。除去 barcode001 为质控品 2800，其他 39 个血卡样本的突变位点分布如表 7。

表 7 39 个血卡样本的点突变个数分布

样本编号	点突变个数	样本编号	点突变个数	样本编号	点突变个数
1	33	14	15	27	10
2	34	15	9	28	34
3	10	16	26	29	34
4	9	17	26	30	33
5	9	18	14	31	35
6	15	19	22	32	40
7	15	20	6	33	29
8	33	21	34	34	40
9	26	22	33	35	39
10	27	23	10	36	9
11	15	24	23	37	10
12	10	25	22	38	10
13	9	26	21	39	39

以样本 1 为例，与参考序列(NC_012920.1 剑桥修正版人类线粒体全基因组序列)相比，该样本在线粒体基因组的第 73、150、489、1048、1107、1438、2706、4048、4769、4883、5153、5178、5301、7028、8701、8857、8860、9180、9540、9667、10397、10398、10400、11176、11719、12705、15043、15301、15326、15724、16223、16362、16519 号碱基共发生 33 个点突变(表 8)。其中 6 个发生在线粒体高变区(高变区 1：16024-16569，高变区 2：1-576)，其余 27 个均发生在编码区。相比局限于高变区的线粒体测序方法，融合引物直扩法人类线粒体全基因组(mtDNA)高通量测序试剂盒提高了多态信息含量，减少了人员随机匹配几率，

提高线粒体母系排查能力。

表 8 1 号样本线粒体全基因组测序的单碱基突变

位置	深度	参考序列	占比	突变序列	占比	注释
73	2363	A	0.5%	G	99.5%	intergenetic region
150	2360	C	1.5%	T	98.5%	intergenetic region
489	266	T	0.4%	C	99.6%	intergenetic region
1048	1802	C	9.4%	T	90.6%	gene=RNR1;gene_biotype=rRNA
1107	1777	T	9.5%	C	90.5%	gene=RNR1;gene_biotype=rRNA
1438	4081	A	8.3%	G	91.7%	gene=RNR1;gene_biotype=rRNA
2706	1324	A	0.6%	G	99.4%	gene=RNR2;gene_biotype=rRNA
4048	2610	G	0.3%	A	99.7%	gene=ND1;gene_biotype=protein_coding
4769	1172	A	0.2%	G	99.8%	gene=ND2;gene_biotype=protein_coding
4883	973	C	9.7%	T	90.3%	gene=ND2;gene_biotype=protein_coding
5153	17556	A	8.9%	G	91.1%	gene=ND2;gene_biotype=protein_coding
5178	17456	C	8.8%	A	91.2%	gene=ND2;gene_biotype=protein_coding
5301	14400	A	10.8%	G	89.2%	gene=ND2;gene_biotype=protein_coding
7028	2315	C	9.5%	T	90.5%	gene=COX1;gene_biotype=protein_coding
8701	1918	A	0.1%	G	99.9%	gene=ATP6;gene_biotype=protein_coding
8857	1848	G	7.1%	A	92.9%	gene=ATP6;gene_biotype=protein_coding
8860	1846	A	0.1%	G	99.9%	gene=ATP6;gene_biotype=protein_coding
9180	6204	A	1.0%	G	99.0%	gene=ATP6;gene_biotype=protein_coding
9540	2588	T	0.4%	C	99.6%	gene=COX3;gene_biotype=protein_coding
9667	3021	A	0.1%	G	99.9%	gene=COX3;gene_biotype=protein_coding
10397	2733	A	0.0%	G	100.0%	gene=ND3;gene_biotype=protein_coding
10398	2750	A	0.3%	G	99.7%	gene=ND3;gene_biotype=protein_coding

10400	2751	C	0.4%	T	99.6%	gene=ND3;gene_biotype=protein_coding
11176	2203	G	0.5%	A	99.5%	gene=ND4;gene_biotype=protein_coding
11719	9626	G	1.0%	A	99.0%	gene=ND4;gene_biotype=protein_coding
12705	2307	C	0.5%	T	99.5%	gene=ND5;gene_biotype=protein_coding
15043	2813	G	6.0%	A	94.0%	gene=CYTB;gene_biotype=protein_coding
15301	2424	G	5.0%	A	95.0%	gene=CYTB;gene_biotype=protein_coding
15326	2435	A	0.2%	G	99.8%	gene=CYTB;gene_biotype=protein_coding
15724	1362	A	6.0%	G	94.0%	gene=CYTB;gene_biotype=protein_coding
16223	2176	C	15.2%	T	84.8%	intergenetic region
16362	5110	T	1.9%	C	98.1%	intergenetic region
16519	5178	T	0.4%	C	99.6%	intergenetic region

因此，本发明采用上述一种融合引物直扩法人类线粒体全基因组高通量测序试剂盒，检测成本低，操作方便。

最后应说明的是：以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对其进行限制，尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细的说明，本领域的普通技术人员应当理解：其依然可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换，而这些修改或者等同替换亦不能使修改后的技术方案脱离本发明技术方案的精神和范围。

权 利 要 求

1、一种融合引物，包括上游融合引物和下游融合引物；所述上游融合引物从 5'至 3'端依次串联有 A 接头、样本标签和目的片段上游引物；

所述下游融合引物从 5'至 3'端依次串联有 P 接头和目的片段下游引物；

5 所述 A 接头为测序接头，用于以通用引物测序；所述 P 接头为捕获颗粒结合区，用于绑定捕获磁珠；

所述目的片段上游引物和目的片段下游引物用于扩增人类线粒体全基因组目的片段；

2、根据权利要求 1 所述的融合引物，其特征在于，所述 A 接头的长度为 30bp；
10 所述样本标签的长度为 10bp；所述目的片段上游引物的长度为 19~23bp；所述 P 接头的长度为 23bp；所述目的片段下游引物的长度为 19~23bp。

3、根据权利要求 1 所述的融合引物，其特征在于，所述 A 接头的核苷酸序列如 SEQ ID NO：89 所示；所述 P 接头的核苷酸序列如 SEQ ID NO：90 所示。

4、多重 PCR 引物池，包括不同样本标签标记的权利要求 1~3 任意一项所述
15 融合引物。

5、根据权利要求 4 所述的多重 PCR 引物池，其特征在于，所述融合引物包括 SEQ ID NO：1~88 所示的目的片段特异性引物；SEQ ID NO：1~44 所示的目的片段特异性引物为上游引物，SEQ ID NO：45~88 是对应的下游引物，其中 SEQ ID NO：1 所示的上游引物和 SEQ ID NO：45 所示的下游引物对应，SEQ ID NO：2 所示的上游引物和 SEQ ID NO：46 所示的下游引物对应，依次类推。
20

6、根据权利要求 5 所述的多重 PCR 引物池，其特征在于，各引物池内 44 对融合引物比例表如下所示：

引物名称（以产物在线粒体基因组位置表示）	浓度（M/PCR 反应体系）	引物名称（以产物在线粒体基因组位置表示）	浓度（M/PCR 反应体系）
17-332	0.01-0.03	8676-8978	0.06-0.08
361-774	0.05-0.07	8982-9330	0.04-0.07
869-1253	0.03-0.05	9339-9639	0.03-0.05
1347-1677	0.03-0.05	9640-9949	0.04-0.07
1697-2125	0.06-0.08	9973-10289	0.04-0.07
2167-2531	0.03-0.05	10294-10622	0.03-0.05
2549-2932	0.03-0.05	10651-10981	0.04-0.07
2986-3380	0.06-0.08	11002-11423	0.04-0.07
3395-3756	0.1-0.3	11460-11793	0.1-0.3

3790-4173	0.03-0.06	11798-12107	0.05-0.08
4187-4581	0.01-0.04	12113-12470	0.050-0.08
4639-5026	0.03-0.05	12471-12806	0.05-0.08
5045-5378	0.05-0.09	12836-13229	0.08-0.12
5382-5713	0.05-0.08	13234-13587	0.060-0.08
5718-6069	0.04-0.07	13607-13957	0.1-0.1
6070-6447	0.04-0.07	13990-14388	0.08-0.12
6458-6839	0.04-0.07	14453-14807	0.08-0.12
6859-7191	0.03-0.05	14817-15166	0.04-0.07
7238-7612	0.05-0.08	15187-15537	0.04-0.07
7617-7958	0.04-0.07	15550-15941	0.08-0.12
7992-8304	0.04-0.07	15971-16294	0.04-0.07
8333-8675	0.04-0.07	16316-16	0.04-0.07

。

7、根据权利要求4所述的多重PCR引物池，其特征在于，所述样本标签的核苷酸序列为tcacgaata和SEQ ID NO：91~129所示核苷酸序列。

8、一种文库制备试剂盒，包括权利要求4~7任意一项所述的多重PCR引物池。

9、根据权利要求8所述的文库制备试剂盒，其特征在于，还包括：免DNA提取PCR扩增酶、PCR反应缓冲液、2800对照DNA和DNA纯化磁珠。

10、一种融合引物直扩法人类线粒体全基因组高通量测序试剂盒，包括权利要求8或9所述的文库制备试剂盒、测序模板制备试剂盒和测序试剂盒。

11、根据权利要求10所述的融合引物直扩法人类线粒体全基因组高通量测序试剂盒，其特征在于，所述测序模板制备试剂盒来自美国赛默飞公司。

12、根据权利要求10所述的融合引物直扩法人类线粒体全基因组高通量测序试剂盒，其特征在于，所述测序试剂盒来自美国赛默飞公司。

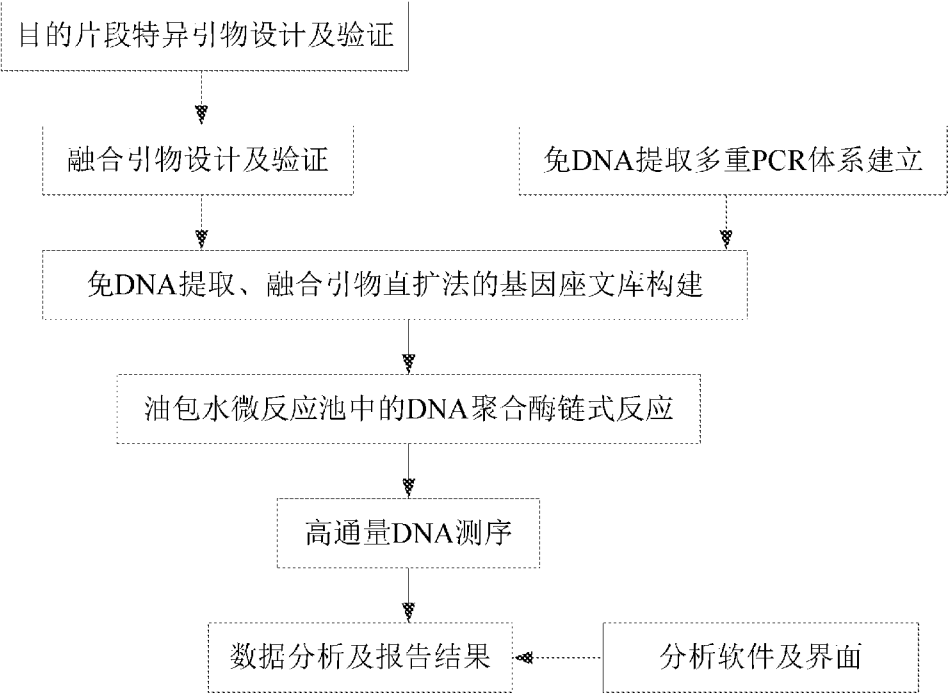


图 1

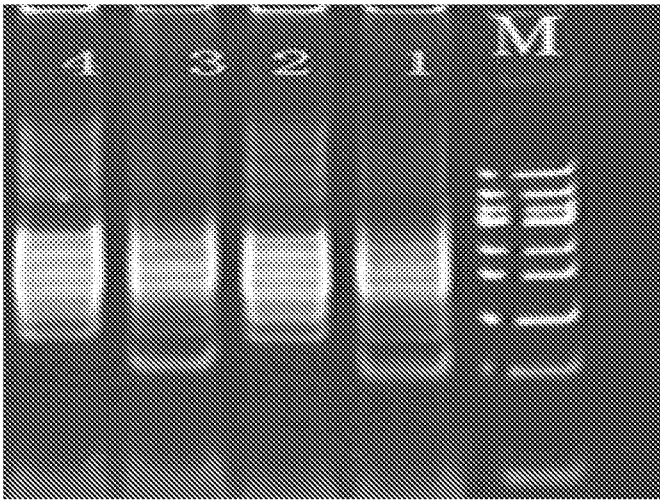
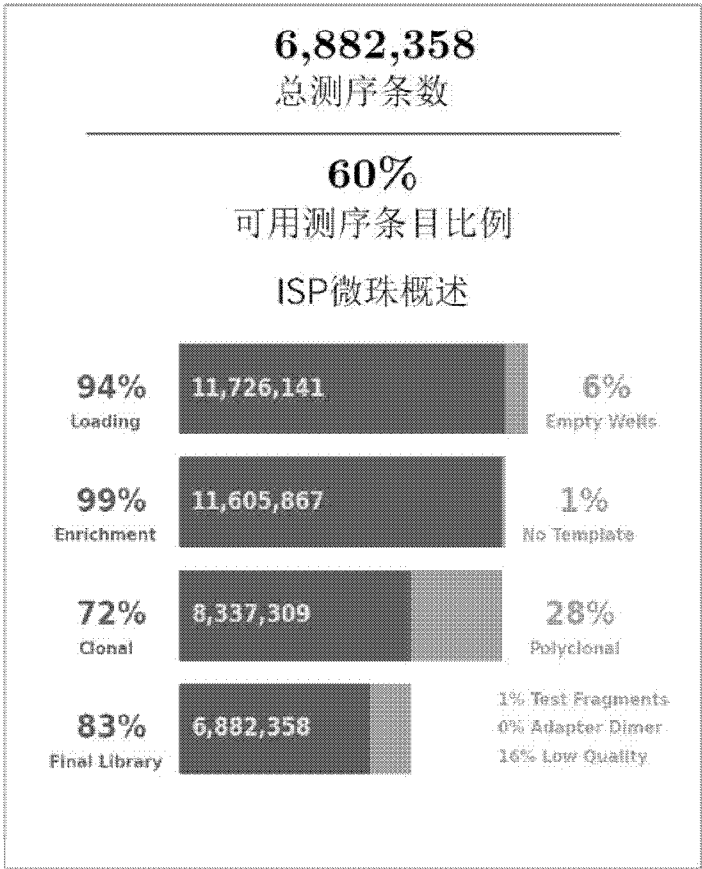
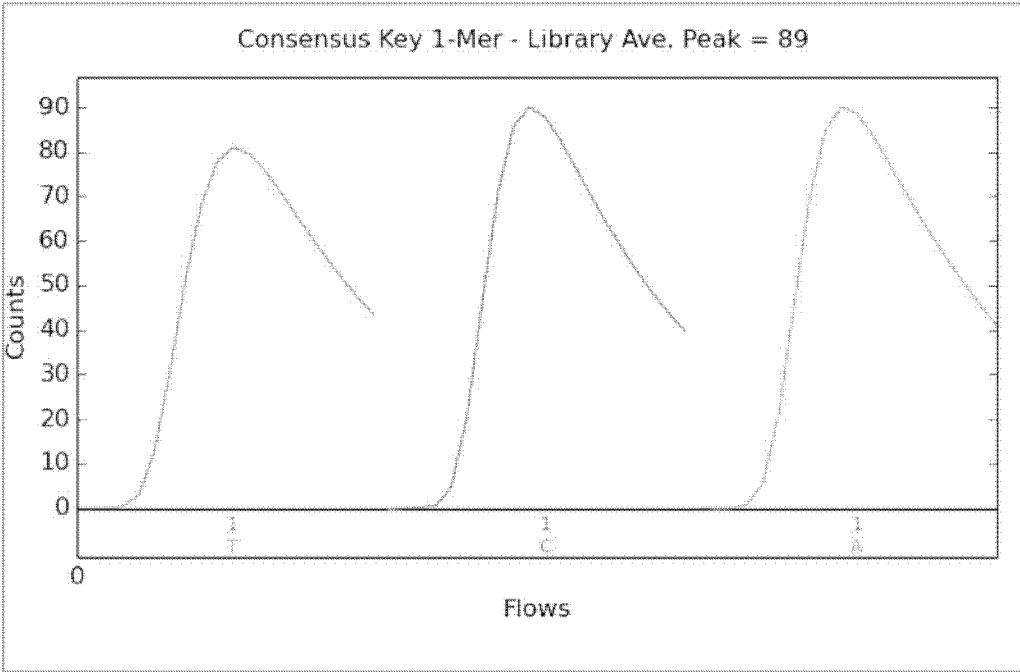
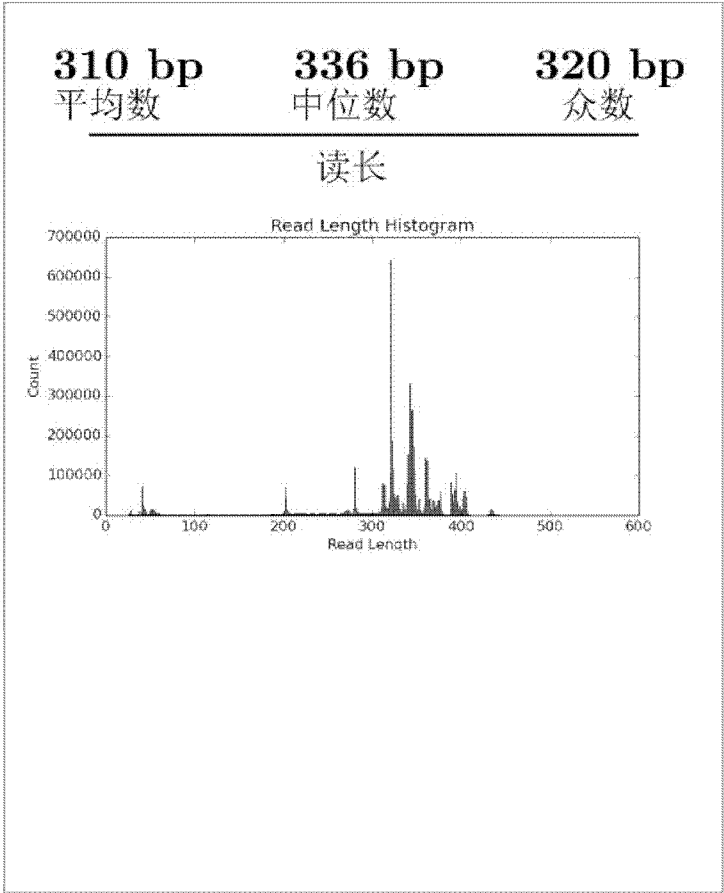


图 2





可编址的孔位数	12,530,194	
含有ISP微珠	11,726,141	93.6%
活珠即连有测序片段微珠	11,605,867	99.0%
测试片段	80,68	00.7%
文库	11,525,183	99.3%
文库ISP微珠	11,525,183	
过滤掉：多克隆	3,268,558	28.4%
过滤掉：低质量	1,369,634	11.9%
过滤掉：接头二聚体	4,633	00.0%
最终文库ISPs	6,882,358	59.7%

图 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/105384

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/6869(2018.01)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)

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)

CNABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, JPTXT, KRTXT, CNKI, Web of Science, Elsevier Science, STN, GenBank, EBI, Ensembl, 中国专利生物序列检索系统, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System, 超星读秀, DUXIU: 融合引物, A接头, 测序接头, 样本标签, P接头, 捕获接头, 捕获结合区, 线粒体, Fusion primer, A linker, sequencing linker, sample tag, barcode, P linker, capture linker, capture binding region, mitochondria, 对SEQ ID NOs: 1-130进行序列检索, search for SEQ ID NOs: 1-130

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 106834428 A (BEIJING AIPUYI BIOLOGICAL SCI-TECH CO., LTD.) 13 June 2017 (2017-06-13) see claims 1-3 and 9; and figure 2; abd description, paragraphs 60-63	1-12
A	US 2019352711 A1 (GENETRON HEALTH BEIJING CO., LTD.) 21 November 2019 (2019-11-21) see claims 1-16	1-12
A	CN 103614482 A (GUANGZHOU SAGENE BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 05 March 2014 (2014-03-05) see claims 1-3	1-12
A	US 2021032702 A1 (MASSACHUSETTS GEN HOSPITAL et al.) 04 February 2021 (2021-02-04) see claims 1-28	1-12
A	CN 105779590 A (BEIJING MYGENOSTICS CO., LTD.) 20 July 2016 (2016-07-20) see claims 1-8	1-12



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
 “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

13 September 2022

Date of mailing of the international search report

14 October 2022

Name and mailing address of the ISA/CN

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

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/105384

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 113308526 A (BEIJING AIPUYI BIOLOGICAL SCI-TECH CO., LTD.) 27 August 2021 (2021-08-27) see entire document	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/105384

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:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

[1] the sequence table acutually submitted is an XML document of a ST.26 standard

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/105384

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	106834428	A	13 June 2017	None			
US	2019352711	A1	21 November 2019	SG	11201908777 P	A	30 October 2019
				EP	3608452	A1	12 February 2020
				KR	20190104611	A	10 September 2019
				JP	2020512405	A	23 April 2020
				WO	2018184495	A1	11 October 2018
				CN	106835292	A	13 June 2017
CN	103614482	A	05 March 2014	None			
US	2021032702	A1	04 February 2021	None			
CN	105779590	A	20 July 2016	None			
CN	113308526	A	27 August 2021	None			

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/105384

A. 主题的分类

C12Q 1/6869(2018.01) 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)

C12Q

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))

CNABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, JPTXT, KRTXT, CNKI, Web of Science, Elsevier Science, STN, GenBank, EBI, Ensembl, 中国专利生物序列检索系统, 超星读秀: 融合引物, A接头, 测序接头, 样本标签, P接头, 捕获接头, 捕获结合区, 线粒体, Fusion primer, A linker, sequencing linker, sample tag, barcode, P linker, capture linker, capture binding region, mitochondria, 对SEQ ID N0s:1-130进行序列检索

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
X	CN 106834428 A (北京爱普益生物科技有限公司) 2017年6月13日 (2017 - 06 - 13) 参见权利要求1-3, 9; 图2; 说明书第60-63段	1-12
A	US 2019352711 A1 (GENETRON HEALTH BEIJING CO LTD) 2019年11月21日 (2019 - 11 - 21) 参见权利要求1-16	1-12
A	CN 103614482 A (广州赛哲生物科技有限公司) 2014年3月5日 (2014 - 03 - 05) 参见权利要求1-3	1-12
A	US 2021032702 A1 (MASSACHUSETTS GEN HOSPITAL等) 2021年2月4日 (2021 - 02 - 04) 参见权利要求1-28	1-12
A	CN 105779590 A (北京迈基诺基因科技有限责任公司) 2016年7月20日 (2016 - 07 - 20) 参见权利要求1-8	1-12
PX	CN 113308526 A (北京爱普益生物科技有限公司) 2021年8月27日 (2021 - 08 - 27) 参见全文	1-12

☐ 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

“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

2022年9月13日

国际检索报告邮寄日期

2022年10月14日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

周洋

电话号码 01062089439

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:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见:

[1] 实际提交的序列表是ST. 26标准的XML文件。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/105384

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	106834428	A	2017年6月13日	无	
US	2019352711	A1	2019年11月21日	SG 11201908777P A	2019年10月30日
				EP 3608452 A1	2020年2月12日
				KR 20190104611 A	2019年9月10日
				JP 2020512405 A	2020年4月23日
				WO 2018184495 A1	2018年10月11日
				CN 106835292 A	2017年6月13日
CN	103614482	A	2014年3月5日	无	
US	2021032702	A1	2021年2月4日	无	
CN	105779590	A	2016年7月20日	无	
CN	113308526	A	2021年8月27日	无	