

(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
2013 年 6 月 27 日 (27.06.2013)

W I P O | P C T

(10) 国际公布号
W O 2013/091276 A 1

- (51) 国际分类号 :
C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 国际申请号 :
PCT/CN2012/001390
- (22) 国际申请日 :
2012 年 10 月 15 日 (15.10.2012)
- (25) 申报语言 :
中文
- (26) 公布语言 :
中文
- (30) 优先权 :
201110426291.7 2011 年 12 月 19 日 (19.12.2011) CN
- (71) 申请人:深圳华大基因科技有限公司 (BGI SHEN - ZHEN CO., LIMITED) [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山路 146 号北山工业区综合楼 11F-3, Guangdong 518083 (CN)。深圳华大基因研究院 (BGI SHENZHEN) [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。
- (72) 发明人:魏晓明 (WEI, Xiaoming); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区 11 栋 8 楼, Guangdong 518083 (CN)。章彰 (LAN, Zhangzhang); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区 11 栋 8 楼, Guangdong 518083 (CN)。谢姝琦 (XIE, Shuqi); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区 11 栋 8 楼, Guangdong 518083 (CN)。瞿宁 (QU, Ning); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区 11 栋 8 楼, Guangdong 518083 (CN)。陈洋 (CHEN, Yang); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区 11 栋 8 楼, Guangdong 518083 (CN)。

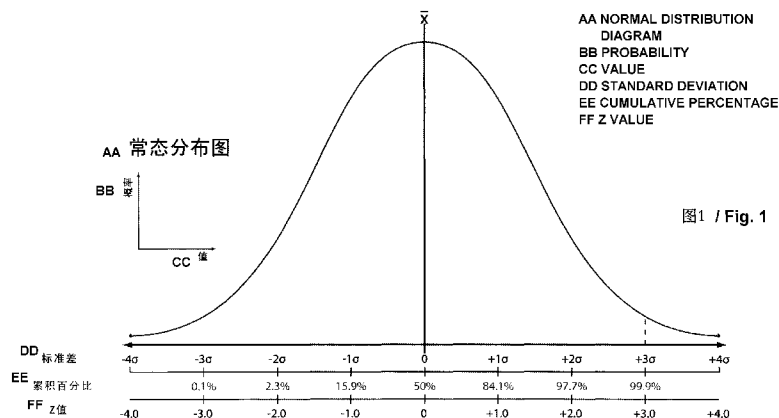
- (74) 代理人:北京北翔知识产权代理有限公司 (PEK-SUNG INTELLECTUAL PROPERTY LTD.); 中国北京市海淀区学院路 35 号世宁大厦 908 室, Beijing 100191 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, 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, 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, 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))。

(54) Title: METHOD FOR DETECTING DELETION AND/OR DUPLICATION OF EXONS IN DMD GENE

(54) 发明名称: 一种检测 DMD 基因外显子缺失和/或重复的方法



(57) Abstract: The present invention provides a method for detecting deletion and/or duplication of exons in DMD gene. The method is implemented by designing a probe using sequence information of DMD gene, sequencing a DNA fragment which is obtained by capturing and enrichment, and analyzing to obtain exon deletion and/or duplication information of the DMD gene.

(57) 摘要: 本发明提供了一种检测 DMD 基因外显子缺失和/或重复的方法, 该方法利用 DMD 基因的序列信息设计探针, 将捕获富集获得的 DNA 片段进行测序, 通过分析获得 DMD 基因外显子的缺失和/或重复信息。

— 种检测 DMD 基因外显子缺失和/或重复的方法

技术领域

本发明涉及基因检测领域，尤其涉及 DMD 基因的分析及其方法。

背景技术

5 DMD 基因是迄今为止发现的最大的人基因，该基因有时会发生突变，例如新生男婴中 1:3500 出现该基因的突变。DMD 基因内一个或多个外显子的大片段会发生缺失，涉及基因近端和中部两个热点区域（外显子 3-7 和外显子 44-55）。DMD 基因内一个或多个外显子的大片段会发生重复，约占 DMD 突变的 6%。DMD 基因发生更多的是点突变、小片段的缺失和插入。

10 杜氏肌营养不良（DMD）是一种 X 染色体隐性遗传病，与该疾病相关的基因是 DMD。约 60% 的 DMD 病例的发病与该基因内一个或多个外显子的大片段缺失相关，涉及基因近端和中间两个热点区域（外显子 3-7 和外显子 44-55）。约 6% 的 DMD 病例的基因变异与基因内大片段重复相关。剩下的病例源于基因的点突变，小片段的缺失和插入。

目前，DMD 基因的检测方法主要有以下几种：微阵列比较基因组杂交技术（a-CGH）、
15 MLPA、MAPH、SCAIP、多重 PCR、DNA 印迹、Sanger 测序法和第二代测序技术。对于高通量检测 DMD 基因外显子缺失和重复而言，上述这些检测方法的缺点是通量低、效率差。所以，本领域中需要新的高通量检测 DMD 基因外显子缺失和重复的方法。

发明内容

本发明涉及一种检测 DMD 基因外显子缺失和/或重复方法，所述方法利用现在 DMD 基
20 因的序列信息设计探针，将捕获富集获得的 DNA 片段进行测序，通过分析获得 DMD 基因外显子缺失信息。

本发明提供了一种检测 DMD 基因外显子缺失和/或重复的方法，包括步骤：

- 1) 将从待测样品和正常对照样品提取基因组 DNA 分别打断为双链 DNA 片段，并在所述双链 DNA 片段的两端添加接头序列；
- 25 2) 以第一引物和第二引物扩增所述带有接头的双链 DNA 片段，获得第一扩增产物；
- 3) 将所述第一扩增产物变性后，用核酸芯片进行杂交捕获；
- 4) 以第三引物和第四引物扩增所捕获的核酸，获得第二扩增产物；
- 5) 对上述第二扩增产物进行测序，获得测序序列片段；
- 6) 将所述测序序列片段比对到参考 DMD 基因的外显子序列及外显子侧翼上；
- 30 7) 通过比较待测样品和正常对照样品比对结果确定所述待测样品 DMD 基因的外显子是否有重复和/或缺失，即如果比对到所述基因外显子参考序列上的所述待测样品测序序列显著

多于/少于所述正常对照样品测序序列，表示所述基因的外显子是否有重复和/或缺失。

本发明还提供了一种检测受试者杜氏肌营养不良症的方法，包括：

利用本发明的检测 DMD 基因外显子缺失和/或重复的方法检测来自所述受试者样本中的 DMD 基因突变；

5 如果检测到 DMD 基因突变，则该受试者患有杜氏肌营养不良症或易患杜氏肌营养不良症。

由于 DMD 是 X 染色体伴性遗传病，对于女性而言，她的 DMD 基因突变可以是纯合的或杂合的，因此女性受试者可以被诊断为杜氏肌营养不良症患者，或者杜氏肌营养不良症易感者或 DMD 突变携带者。可以理解杂合 DMD 基因突变的女性受试者的男性后代发生杜氏肌营养不良症的几率是 50%。

对于男性而言，由于他只有一条 X 染色体，如果检测到他的 DMD 基因发生了突变，则可以将其诊断为杜氏肌营养不良症。

本发明的方法结合序列捕获技术、高通量测序和生物信息分析对 DMD 基因进行检测。这三种技术的结合是一种非常有效的 DMD 基因缺失和/或重复的检测策略。

15 附图说明

下列附图用于说明本发明的具体实施方案，而不用限于由权利要求书所界定的本发明范围。

图 1 显示了用于确定本发明的设截止值的正态分布图。

具体实施方式

20 以下实施更详细的描述了本发明，这些实施例仅为示例性的，但是本领域技术人员将会理解，下列实施例仅用于说明本发明，而不应视为限定本发明的范围。

利用目标区域捕获技术，使用外显子捕获芯片对人 DMD 基因的外显子测序，进而开展 DMD 基因外显子缺失和重复突变相关研究，目前还是一项新技术。该技术的基本原理是使用一套寡核苷酸探针来捕获基因组上的目标序列，然后使用根据 DMD 基因基因区序列和/或所述接头序列设计的引物对这些捕获到的序列进行 PCR 扩增，再对这些扩增产物进行高通量测序，从而识别 DNA 样品中的碱基序列，通过生物信息分析方法对测序所得序列信息进行分析，从而找到目标序列的变异信息，包括单核苷酸变异、插入/缺失、重复、外显子拷贝数变化等。

30

本发明提供了一种检测 DMD 基因外显子缺失和/或重复的方法，包括步骤：

1) 将从待测样品和正常对照样品提取基因组 DNA 分别打断为双链 DNA 片段，并在所

述双链 DNA 片段的两端添加接头序列；

2) 以第一引物和第二引物扩增所述带有接头的双链 DNA 片段，获得第一扩增产物；

3) 将所述第一扩增产物变性后，用核酸芯片进行杂交捕获；

4) 以第三引物和第四引物扩增所捕获的核酸，获得第二扩增产物；

5) 对上述第二扩增产物进行测序，获得测序序列片段；

6) 将所述测序序列片段比对到参考 DMD 基因的外显子序列及外显子侧翼上；

7) 通过比较待测样品和正常对照样品比对结果确定所述待测样品 DMD 基因的外显子是否有重复和/或缺失，即如果比对到所述基因外显子参考序列上的所述待测样品测序序列显著多于/少于所述正常对照样品测序序列，表示所述基因的外显子是否有重复和/或缺失。

在本发明的方法步骤 1) 中，经打断后的所述双链 DNA 优选为 100-1000 bp，更优选在 150-500 bp，最优选在 200-300 bp，特别是在 200-250 bp，上述长度表示为双链 DNA 电泳的主带位置。

在本发明的方法步骤 1) 中，所述双链 DNA 经打断后优选具有平末端，例如通过末端修复造成所述平末端。在另一优选例中，还包括步骤：在所述平末端双链 DNA 片段的 3'端加 "A"，所述 3'端加 "A" 的双链 DNA 片段与带有一个 "T" 的接头相连，成为两端都带有接头的双链的 DNA 片段混合物。所述接头序列长度优选是 20-150nt，特别是 50-100nt。本领域技术人员可以根据序列选择合适的接头序列，也可以市售的试剂盒中常用的序列作为接头序列。

在本发明的方法步骤 1) 中，优选所述双链的 DNA 片段两末端通过接头连接序列与接头序列连接。在另一优选例中，所述接头连接序列为 $\text{poly}(\text{N})_n$ ，其中，各个 N 分别独立地选自 A、T、G 或 C，n 为选自 1-20 的任一正整数。在另一优选例中，所述的接头连接序列为 $\text{poly}(\text{A})_n$ ，其中，n 为 1-20 的正整数，较佳地 $n=1-2$ 。在另一优选例中，所述的接头连接互补区序列为 $\text{poly}(\text{N}')_m$ ，其中各 N' 分别独立地选自 A、T、G 或 C，m 为 1-20 的正整数，并且 $\text{poly}(\text{N})_n$ 和 $\text{poly}(\text{N}')_m$ 为互补序列。在另一优选例中，m 为选自 1-3 的任一正整数。在另一优选例中，所述的接头连接互补区的长度与接头连接序列的长度相同，即 $\text{poly}(\text{N})_n$ 和 $\text{poly}(\text{N}')_m$ 为完全互补序列。在另一优选例中，所述的接头连接互补区为 $\text{poly}(\text{T})_m$ ，其中，m 为 1-20 的正整数，较佳地 $m=1-2$ 。本领域技术人员可以根据序列选择合适的接头连接序列，也可以市售的试剂盒中常用的序列作为接头连接序列。

在本发明的方法步骤 2) 中，优选所述第一引物和第二引物根据 DMD 基因的基因区序列和/或所述接头序列设计。在一个优选例中，所述的第一引物和第二引物具有对应于所述接头的引物结合区的接头结合区，以及位于接头结合区外侧的测序探针结合区。在另一优选例中，所述的第一引物和第二引物为长度 30-80 nt 的寡核苷酸。在另一优选例中，第一引物和第二引物长度为 55-65 nt。在另一优选例中，所述的第一引物和第二引物是不同的

在本发明的方法步骤 3) 中, 本发明使用的芯片可以通过以下方式进行设计: 通过微阵列技术, 将高密度 DNA 片段阵列以一定的顺序或排列方式使其附着在如玻璃片等固相表面, 以荧光标记的 DNA 探针, 借助碱基互补杂交原理, 进行大量的基因表达及监测, 捕获目标序列。例如, 芯片可以由美国 Roche NimbleGen 公司设计合成。

5 在本发明的方法步骤 3) 中, 优选所述的核酸芯片固定有 5-200,000 种对应于所述 DMD 基因的特异性探针。在另一优选例中, 所述芯片上特异性探针的种类为 50-150,000 种, 更佳地 500-100,000 种, 最佳地 5000-80,000 种。在另一优选例中, 所述探针的序列对应于 DMD 基因的以下区域: 外显子和/或外显子前后两端优选 50-500 nt, 更优选 100-300 nt, 最优选 200 nt。在另一优选例中, 所述特异性探针的长度为 20-120 nt, 较佳地, 50-100 nt, 更佳地, 60-80
10 nt。在另一优选例中, 所述特异性探针为全人工合成或体外克隆合成。

在本发明的方法步骤 3) 后, 优选包括步骤: 用封闭分子封闭位于所述扩增产物两端的、对应于第一引物和第二引物的区域, 从而获得两端被封闭的单链扩增产物的混合物, 用所述的经封闭的单链扩增产物的混合物进行后续步骤 4)。在另一优选例中, 所述的封闭分子封闭第一 PCR 扩增产物中对应于第一引物和第二引物的 70%-100% 区域。在另一优选例中, 所述
15 的封闭分子封闭第一 PCR 扩增产物中对应于第一引物和第二引物的 100% 区域。

在本发明的方法步骤 4) 中, 优选所述第三引物和第四引物根据 DMD 基因的基因区序列和/或所述接头序列设计。在一个优选例中, 所述第三引物和第四引物分别特异性对应于或结合于所述的第一引物和第二引物。在另一优选例中, 所述的第三引物和第四引物分别特异性结合于所述的第一引物和第二引物的外侧, 并且长度小于第一引物和第二引物。在另一优选例
20 中, 所述的第三引物和第四引物长度为 15-40 nt, 较佳地为 20-25 nt。在另一优选例中, 所述的第三引物和第四引物是不同的。

在本发明的方法步骤 5) 中, 所述测序优选采用第二代测序技术, 例如 illumina sol_{exa}、Hiseq 2000、ABI SOLiD、Roche 454 测序平台和/或 Ion torrent。在另一优选例中, 将所述的第二扩增产物的混合物与固相载体上固定的测序探针进行杂交, 并进行固相桥式 PCR 扩增,
25 形成测序簇; 然后对所述测序簇用"边合成-边测序"法进行测序, 从而得到样本中疾病相关核酸分子的核苷酸序列。目前, 有一些生物技术服务公司可提供测序服务。

在本发明的方法步骤 6) 中, 将所述测序序列比对到参考 DMD 基因外显子序列及外显子侧翼上可以通过本领域中已知的软件进行, 例如短寡核苷酸分析包 (Short Oligonucleotide Analysis Package, SOAP) 比对和 BWA (Burrows-Wheeler Aligner) 比对; 所述侧翼长度优选
30 为 50-500 nt, 更优选 100-300 nt, 最优选 200 nt。

在本发明的方法步骤 6) 后, 可以先对测序结果原始测序序列质控, 去除不合格的测序序列, 其中原始 read 质控包括的项目见下表;

质控指标	质控标准
Read 碱基 Q20 统计	90% 以上为合格，低于 85% 不合格
插入片段长度波动幅度	上下均小于插入片段长度的一半为合格
Read 上 AT 及 CG 的统计量吻合度	通过质控图判断
Read 上的碱基错误率分布	尾部最高不超过 5% 为合格
Insertsize 分布均匀度	通过质控图判断

在本发明的方法步骤 7) 中，通过对测序结果进行生物信息学分析方法，可以判断待测者 DMD 基因发生突变的外显子与正常人之间是否具有统计学上的显著性差异。在一优选例中，可以通过适当的计算机语言进行深度计算，例如 java、C++ 或 Perl。

在一优选例中，比较待测样品和正常对照样品比对结果的步骤如下：

5 第一步：

对于每个 DMD 基因外显子，将待测样品比对到该外显子上的测序序列数目相对于比对到全部外显子的测序序列数目标标准化，获得标准化的待测样品测序序列数目比值，

将对照样品比对到该外显子上的测序序列数目相对于比对到全部外显子的测序序列数目标标准化，获得标准化的对照样品测序序列数目比值；

10 第二步：

对所述标准化的待测样品测序序列数目比值和标准化的对照样品测序序列数目比值进行比较，如果它们在统计学上差异显著，则

当所述标准化的待测样品测序序列数目比值小于标准化的对照样品测序序列数目比值时，将所述标准化的待测样品测序序列数目比值乘以 2 后和标准化的对照样品测序序列数目比值进行比较，如果它们在统计学上差异显著，表示该外显子没有发生杂合缺失，

当所述标准化的待测样品测序序列数目比值大于标准化的对照样品测序序列数目比值时，将所述标准化的待测样品测序序列数目比值除以 2 后和标准化的对照样品测序序列数目比值进行比较，如果它们在统计学上差异显著，表示该外显子没有发生杂合缺失。

通过这两步计算方法，可以确定 DMD 基因的外显子拷贝数的变化，从而判断是否发生了重复和/或缺失。

在又一优选例中，比较待测样品和正常对照样品比对结果的步骤如下：

a. 对于 DMD 基因的一个外显子，通过式①计算待测样品比对到该外显子上的测序序列的测序深度 $exonN_depth$ 和比对到全部外显子上的测序序列的平均测序深度 $averaged_depth$ 的比值 $\%exonN$ ；

将 $\%exonN$ 代入式②，计算出所述外显子测序深度的 Z -score。

$$\% \text{exonN} = \frac{\text{exonN} \times \text{depth}}{\text{averaged} \times \text{depth}} \dots\dots\dots ①,$$

$$\text{exonN} \text{ — } Z \text{ - score for test sample} = \frac{|\% \text{exonN} - \text{mean}\% \text{exonN}(\text{normal})|}{\text{S.D.}\% \text{exonN}(\text{normal})} \dots\dots\dots ②$$

其中，对于所述外显子，利用对照样品比对到该外显子上的测序序列的测序深度和比
 5 到全部外显子上的测序序列的平均测序深度，根据式①计算 $\% \text{exonN}(\text{normal})$ ， $\text{mean} \%$
 $\text{exonN}(\text{normal})$ 是所有对照样品 $\% \text{exonN}(\text{normal})$ 的平均值， $\text{S.D.} \%$
 $\text{exonN}(\text{normal})$ 是所有对照样品 $\% \text{exonN}(\text{normal})$ 的标准差；如果 $Z\text{-score}$ 大于第一预设截止值，则该 DMD 基因外显子的
 测序深度在待测样品和正常样品之间有差异显著，对其进行进一步筛选；

b. 分两种情况对上述测序深度差异显著的 DMD 基因外显子进行筛选：

10 当 exonN 小于 averaged_depth 值时，将 $\% \text{exonN}$ 乘以 2 代入式②中，计算得到的 $Z\text{-score}$
 值小于第二预设截止值表示该外显子发生了杂合缺失，计算得到的 $Z\text{-score}$ 值大于第二预设
 截止值表示该外显子没有发生杂合缺失；

当 exonN 大于 averaged_depth 值时，将 $\% \text{exonN}$ 除以 2 代入式②中，计算得到的 $Z\text{-score}$
 15 值小于第三预设截止值表示该外显子发生了重复，计算得到的 $Z\text{-score}$ 值大于第三预设截止
 值表示该外显子没有发生杂合缺失。

通过这两步计算方法，可以确定 DMD 基因的外显子拷贝数的变化，从而判断是否发生
 了重复和/或缺失。

对于上述步骤 a 和 b 中的第一预设截止值、第二预设截止值和第三预设截止值相同或不
 20 同。截止值的选取由发明人在进行大量实验后依据统计理论确定，具体如下：

在进行实验的案例中，发明人发现利用本发明方法得到的 Z 值 ($Z\text{ scores}$) 符合统计学上
 的正态分布图，见附图 1。对于确定所述待测样品 DMD 基因的外显子是否有重复和/或缺失
 的第一步，当 Z 值为 3.0 的时候，有 99.9% 的可信度——DMD 女性携带者与正常人在相同外
 显子的拷贝数是不一样的。对于第二步，为了排除第一步中的假阳性，如果女性携带者缺失
 25 拷贝，那么她的二倍应该和正常人（正常人应该是两倍）没有显著差异，所以要乘以 2 后
 进行检测。同理，重复拷贝的情况也一样。

虽然在本发明实施例中使用了截止值 3.0，截止值也可以大于 3.0 或小于 3.0。例如，可
 以使用截止值 1.64（对应 90% 的可信度）、1.96（对应 95% 的可信度）或 2.58（对应 99% 的
 可信度），可能性百分数越大，可信度越高。本领域一般采用 90% 以上的可信度，即截止值
 30 至少要在 1.64 以上。

在本发明中，基因突变包括拷贝数变异 (CNV) 。

由于 DMD 基因位于 X 染色体上，所以本发明的方法特别适用于发生 DMD 基因外显子杂合缺失的女性。

因此，本领域技术人员可以理解，本发明的突变检测方法可以用于基于检测 DMD 基因的突变。

在本发明中，进行 PCR 所用的探针、引物可以基于目前固相芯片杂交技术进行设计，也可以由生物技术服务公司进行。本领域技术人员可以理解，在同一张芯片上以高特异性和高覆盖率捕获 DMD 基因区域。例如，罗氏 MmbleGen 的 2.1 M 人外显子序列捕获芯片可捕获约 18 万个外显子和约 550 个 miRNA 。

利用本发明方法得到 DMD 基因外显子缺失和重复信息可以用于例如对人群进行基因分型。

在本发明的实施方案中，采用本发明的结合序列捕获技术、高通量测序和生物信息分析的方法，对 DNA 样本的 DMD 基因进行检测，获得样本中 DMD 基因的突变信息。

在本发明中，测序序列、测序序列片断、读段都是指测序仪产生的数据 DNA 序列 (read)。测序深度是指读段数。

实施例

如本实施例所用，术语 "引物" 指的是能与模板互补配对，在 DNA 聚合酶的作用合成与模板互补的 DNA 链的寡聚核苷酸的总称。引物可以是天然的 RNA、DNA，也可以是任何形式的天然核苷酸，引物甚至可以是非天然的核苷酸如 LNA 或 ZNA 等。引物 "大致上" (或 "基本上") 与模板上一条链上的一个特殊的序列互补。引物必须与模板上的一条链充分互补才能开始延伸，但引物的序列不必与模板的序列完全互补。比如，在一个 3' 端与模板互补的引物的 5' 端加上一段与模板不互补的序列，这样的引物仍大致上与模板互补。只要有足够长的引物能与模板充分的结合，非完全互补的引物也可以与模板形成引物-模板复合物，从而进行扩增。

在本实施例中，几类重要引物的序列和名称见表 1。

表 1

SEQ ID NO.	引物名称	序列(5' -3')
1	第一引物	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCC CTACACGACGCTCTTCCGATCT

2	第二引物	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGGTCTCGGCAT
		TCCTGCTGAACCGCTCTTCCGATCT
3	封闭分子 1	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCC
		CTACACGACGCTCTTCCGATCT
4	封闭分子 2	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGGTCTCGGCAT
		TCCTGCTGAACCGCTCTTCCGATCT
5	第三引物	AATGATACGGCGACCACCGAGA
6	第四引物	CAAGCAGAAGACGGCATACGAG

第一引物 (SEQ ID NO: 1) 和第二引物 (SEQ ID NO: 2) 对带有接头的 DNA 双链核酸片段进行扩增, 获得第一 PCR 扩增产物, 第一引物和第二引物具有对应于所述接头的引物结合区的接头结合区, 并且位于接头结合区外侧的测序探针结合区。封闭分子 1 (SEQ ID NO: 3) 和封闭分子 2 (SEQ ID NO: 4) 的作用是在进行序列捕获时, 与接头互补, 避免捕获非特异性序列。第三引物 (SEQ ID NO: 5) 和第四引物 (SEQ ID NO: 6) 的作用是大量扩增捕获的特异性 DNA 片段, 以便进行下一步测序。

本研究募集 1 名 DMD 女性携带者和 4 名女性正常人, 签署书面的知情同意书。

根据罗氏 MmbleGen 的说明书进行芯片制备和杂交, 根据 Illumina 的说明书进行测序, 步骤如下。

1: 芯片设计

参考序列为 NCBI build 37/hg19 (获自 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 的 DMD 基因外显子序列及外显子前后 200 bp, 由美国 Roche MmbleGen 公司设计合成。

2: 文库制备

取人的外周血, 提取基因组 DNA, 获得 3 μ g DNA。将抽提获得的人基因组 DNA 样品, 在 Covaris S2 仪器 (购自美国 Covaris 公司) 上进行片段化, 最终打断成为主带在 200 bp 的 DNA 双链片段的混合物。

接下来, 对上述片段进行纯化, 纯化过程采用 Ampure Beads 方法, 按照 Agencourt AMPure protocol 进行 (美国 Beckman 公司)。简而言之: 将 DNA 片段进行末端修复, 成为带有平末端的片段混合物, 并在每一条单链的 3' 端添加一个 "A"; 然后在接头连接反应体系 (PE 文库) 中按照试剂盒内的说明书进行连接, 通过此过程为 DNA 片段加上带有 "T" 的接头; 在连接后继续按照 Agencourt AMPure protocol (美国 Beckman 公司) 进行纯化, 并除多余试剂如缓冲物、酶、ATP 等, 最终得到连有接头的 DNA。

由于连有接头的 DNA 样品浓度很低, 接下来进行扩增富集, PCR 反应在 Bio-Rad 公司

的 PTC-200PCR 仪上运行 (PCR 反应体系 : 94 °C , 2 min ; 94 °C 变性 15 s , 62 °C 退火 30 s , 72 °C 延伸 30 s , 共扩增 4 个循环 ; 最终 72 °C 延伸 5 min) 。

50 μ L PCR 扩增反应体系含有 : 34 μ L Nuclease-Free water 、 10 μ L 10 $\times$ pfe Amplification Buffer 、 4 μ L dNTP (10 mM) 、 4 pLMgSO₄ (50 mM) 、 2 pLPlatinumP&DN A polymerase 、 8 μ L 第一引物 (SEQ ID NO:1) (10 μ M) 、 8 μ L 第二引物 (SEQ ID NO:2) (10 μ M) 、 23 μ L 连接接头后的样品 DNA (缓冲液和酶购自 INVITROGEN 公司的 Platinum® Pfu DNA Polymerase 试剂盒) 。

经扩增的 DNA 都带有接头 , 使用 Ampure beads 法 , 按照 Agencourt AMPure protocol 的程序 (美国 Beckman 公司) 纯化 PCR 产物 。

反应完成后的纯化产物可在 4 °C 保存数天 , 也可在 -20 °C 保存数周 , 也可直接用于后续的序列捕获 。

3 : 序列捕获

将准备好的 DNA 样品置于 SpeedVac 中 60 °C 蒸干 , 然后加入 11.2 μ L 的超纯水 , 充分溶解 。 全速离心样品 30 秒 , 分别加入以下两种试剂 : 18.5 μ L 的 2xSC Hybridization Buffer (购于美国 Roche NimbleGen 公司) 和 7.3 μ L 的 1xSC Hybridization Component A (购于美国 Roche NimbleGen 公司) 。 震荡混匀后置于离心机上全速离心 30 秒 , 然后于 95 °C 使 DNA 充分变性 , 变性过程 10 分钟 , 得到单链的带有接头的 DNA 文库 。

按照 Roche NimbleGen 的试剂盒说明书 , 将带有相应探针的芯片按要求固定在杂交仪 (美国 Roche NimbleGen 公司) 上 , 将变性后的样品加入芯片中并封闭芯片 , 然后设定杂交程序 , 于 42 °C 在严格的条件下杂交 64-72 小时 。 在杂交体系中 , 基因芯片上探针分子的浓度要远远高于靶分子浓度 。 杂交反应体系含 : 450 μ g Cot-1 DNA, 5 μ g DNA 文库 (步骤 1 中制备获得) 、 10 μ L 封闭分子 1 (SEQ ID NO:3) 、 110 μ L 封闭分子 2 (SEQ ID NO:4) 。 其中 Cot-1 DNA 通过 Human Cot-1 DNA®-Fluorometric QC (Invitrogen) 按照提供商说明书获取 。

待杂交完毕后 , 将芯片洗漆与样品按以下次序洗脱 :

次序	洗涤 / 洗脱缓冲液 (Roche NimbleGen)	颠倒洗脱次数	水浴时间	水浴温度
1	1 $\times$ Wash Buffer II	10 次	/	常温
2	1 $\times$ Stringent Wash Buffer	10 次	5 min	47.5 °C
3	1 $\times$ Stringent Wash Buffer	10 次	5 min	47.5 °C
3	1 $\times$ Wash Buffer I	2 分钟 (1 次 / 秒)	/	常温

5	I × Wash Buffer II	I 分钟 (I 稱、I	常温
6	I × Wash Buffer III	10 I	常温
7	NaOH (900 μL)	1 I O min	常温

将 NaOH 洗脱液回收，并用 40 μL 的 20% 冰醋酸中和；将上述中和液用 QiagenMinElute PCR Purification Kit 纯化，捕获后的样品最后溶解于 165 μL 纯水中。

对上述捕获的 DNA 文库进行 PCR 扩增。反应条件是：98℃ 30 s; 15 个循环 (98℃ 15 s; 60℃ 30 s; 72℃ 30 s); 72℃ 5 min; 4℃ 静置。

5 所述扩增分为 6 管 50 μL 进行：

捕获的 DNA 文库	23.8 μL
Phusion DNA polymerase	25 μL
第三引物 (SEQ ID NO: 5) (10 μM)	0.6 μL
第四引物 (SEQ ID NO: 6) (10 μM)	0.6 μL
总体积	50.0 μL

Phusion DNA polymerase 来自 FINNZYMES 的 F-531L，在 2x Phusion High-Fidelity PCR Master Mix with HF Buffer 中 (500 reactions in 50 μl volume)。

PCR 产物采用 Ampure Beads 方法，按照 Agencourt AMPure protocol 进行 (美国 Beckman 公司) 进行纯化，完成后溶于 32 μl 洗脱缓冲液 (Elution Buffer, 来自 QIAGEN: QIAquick

10 PCR Purification Kit (Cat. no.28106) 或 MnElute PCR Purification Kit (Cat. no.28006) 中，使用 Nanodrop (Thermo Fisher Scientific Inc.; 型号: Nanodrop 8000) 及 Bioanalyzer 2100 (Agilent; 型号: 2100) 检测浓度。

4：以接头介导的 PCR (LM-PCR) 扩增产物和实时荧光定量 PCR (QPCR) 进行检测富集度：

15 依照美国 Roche NimbleGen 公司的 NSC Assay mix 试剂盒内提供说明书进行以下步骤：

1) 将稀释好的 4 种 NSC Assay mix 取出在冰上溶解。

2) 根据之前 Nanodrop 检测浓度，将未捕获的 (Non-Captured) 以及成功捕获的 (Captured LM-PCR) 产物稀释至 20 ng/μl，最后体积要求 > 5 μl。

3) 按照每个样品 4 种 NSC Assay，每个样品包括 2 种 DNA 模版，每个样品需要 4x2=8 20 个反应，每个平板需要 1 个阴性对照共 4 个反应。96 孔平板最多能进行 11 个样品检测。

4) 在 1.5 ml 的离心管中配制 QPCR 反应混合液，一下为每个反应试剂使用量，可以根据具体样品量统一配置混合液，需要将阴性对照和阳性对照纳入计算。

5) 将配置好的 12 μl QPCR 反应混合液转移至 96 孔 QPCR 反应板中，向其中加入 3 μl 稀

释的 1 ng/μl LM-PCR 产物，把所有的试剂和样品加完后使用封口膜将平板封口。以 4000 rpm 离心 2 min。

6) 将 96 孔板置于 QPCR 仪上，按照下表 2 所示程序进行检测

表 2

进程	循环次数	分析模式	温度 (°C)	持续时间 (hh:mm:ss)	升降温速度 (°C/s)
预变性	1	无	95	00:05:00	4.8
扩增	40	定量	95	00:00:10	4.8
溶解曲线	1	溶解曲线	60	00:01:00	2.5
			95	00:00:10	4.8
			65	00:01:00	2.5
			95	--	--
冷却	1	无	40	00:00:10	2

7) 实验完成后分析试验结果，整理 QPCR 试验数据，利用 Ct 值的差 ΔCt 计算富集度 $E=(ef)^{\Delta Ct}$ ，其中 ef 代表目的基因的 Q-PCR 扩增效率，理想的扩增效率 ef 值为 2。其中为了计算 ΔCt，Non-capture Ct 是指以杂交前的 N-LM-PCR 纯化产物为模板、用目的基因特异性引物来进行 Q-PCR 扩增，检测到的 Ct 值；capture Ct 是指以杂交后的 C-LM-PCR 纯化产物为模板、用目的基因特异性引物来进行 Q-PCR 扩增，检测到的 Ct 值。见下表：

QPCR 引物	产物长度	QPCR 效率	ΔCt	水浴温度
NSC1	80 nt	1.84	杂交前 Ct-杂交后 Ct	$(1.84)^{\Delta Ct}$
NSC2	74 nt	1.80	杂交前 Ct-杂交后 Ct	$(1.80)^{\Delta Ct}$
NSC3	75 nt	1.78	杂交前 Ct-杂交后 Ct	$(1.78)^{\Delta Ct}$
NSC4	71 nt	1.93	杂交前 Ct-杂交后 Ct	$(1.93)^{\Delta Ct}$
平均富集度	$=(E_{NSC1}+E_{NSC2}+E_{NSC3}+E_{NSC4})/4$			

判断文库是否合格，能否进行下一步试验：需要根据平均富集倍数值判断之后建库类型，在本实施例中平均富集度的值>60 进行下一步测序。

5：测序与数据分析

在一张芯片上进行杂交反应，样品在芯片上杂交的 64-72 小时中，目标序列与探针互补，从而被捕获下来。将洗脱后的样品于 Solexa 测序平台中进行双末端测序。通过数据分析测序数据的样品来源，并对样品的捕获效果进行计算。

使用 BWA 软件将所有泳道中的读段先比对到参考序列 NCBI build 37/hg19（获自 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>）的 DMD 基因外显子序列及外显子前后 200 bp 上去。比对的

入是过滤接头等污染后的 fq 文件，比对的输出是原始比对结果— SAM 文件（BWA 软件（Burrows Wheeler Aligner; <http://sourceforge.net/projects/bio-bwa/>）比对后产生的结果文件）。

使用 samtools 工具(<http://sourceforge.net/projects/samtools/>) 对原始结果需要进行一系列处理：

经过格式转换和压缩之后，将比对结果按染色体序列进行排序。其次，将同一个文库的泳道合并到一起，最后再将所有文库合并到一起。经过这一系列处理，得到了合格的能作为突变检测软件 SOAPsnp（soap.genomics.org.cn/soapsnp.html）的输入文件——BAM 格式文件，即进入突变检测软件的接口。

通过对落在每个外显子上的读段数和所有外显子上的读段数，计算出各个外显子深度以及平均深度，代入式①计算出 $\%exonN$ 。以余下 4 名女性非携带者为参考，将 $mean\%exonN(normal)^W$ S.D. $\%exonN(normal)$ 代入公式②计算出 Z-score。计算发现，该携带者在 10、11、15、23、26、29、46-5 1、70、71、和 73 号外显子 Z-score 分别为：3.80、3.23、4.33、3.72、6.16、5.09、7.04、9.08、6.81、10.10、26.95、8.51、4.36、3.65、和 3.24，均大于截止值 3.00。接着，进行第二步计算，得到的结果分别为 19.60、11.26、24.77、12.50、37.55、33.79、0.85、0.32、0.49、0.63、1.01、1.52、60.62、22.32、和 11.30，其中 0.85、0.32、0.49、0.63、1.01、1.52 所对应的外显子 46-5 1 均小于 3.0。因此，利用本发明的方法表明，该携带者在 46-5 1 号外显子有缺失现象。

如下，为了验证本发明的结果，通过实时荧光定量 PCR，检测分析该携带者 46-5 1 号外显子拷贝数。实验步骤如下：

设计好引物后，对 1 名 DMD 女性携带者和 4 名女性正常人的样本进行 qPCR 上机扩增。反应体系为：

预先配制母液

10 × Ex Taq Buffer (TaKaRa, Japan)	1.0 μl
MGSO ₄ (50 mM; New England BioLabs, Ipswich, MA, USA)	0.1 μl
Tween20 100 × (Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, MO, USA)	0.1 μl
DMSO (Sangon BiotechChina)	0.5 μl
H ₂ O	3.35 μl
Betaine (Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, MO, USA)	2.0 μl

取以上提前配制好的母液加以下成分

配制 2.0 ml 的反应体系：

dNTP (2.5 mM)	1.2 μl
Eva Green (20×; Biotium, Hayward, USA)	0.75 μl

ROX (50 μ M; TaKaRa, Japan)	0.3 μ l
上游引物 (10 μ M)	1.5 μ l
下游引物 (10 μ M)	1.5 μ l
H S Taq (TaKaRa, Japan)	0.25 μ l

实验上机条件为：

(1) 扩增曲线：95℃，10s；95℃，15s；59℃，15s，以上进行40个循环；

(2) 溶解曲线：72℃，30s；95℃，15s；60℃，60s；95℃，15s。

5 试验后将 QPCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳，通过对扩增条带的观测，发现 DMD 女性携带者在 46-51 号外显子有缺失，而 4 名女性正常人在 46-51 号外显子没有缺失。

因此，通过本发明的外显子计算得到的结果与实时荧光定量 PCR 的结果是一致的，说明本发明的方法是可行的。

权 利 要 求 书

1. 一种检测 DMD 基因外显子缺失和/或重复的方法，包括步骤：

1) 将从待测样品和正常对照样品提取基因组 DNA 分别打断为双链 DNA 片段，并在所述双链 DNA 片段的两端添加接头序列；

2) 以第一引物和第二引物扩增所述带有接头的双链 DNA 片段，获得第一扩增产物；

3) 将所述第一扩增产物变性后，用核酸芯片进行杂交捕获；

4) 以第三引物和第四引物扩增所捕获的核酸，获得第二扩增产物；

5) 对上述第二扩增产物进行测序，获得测序序列片段；

6) 将所述测序序列片段比对到参考 DMD 基因的外显子序列及外显子侧翼上；

7) 通过比较待测样品和正常对照样品比对结果确定所述待测样品 DMD 基因的外显子是否有重复和/或缺失，即如果比对到所述基因外显子参考序列上的所述待测样品测序序列显著多于/少于所述正常对照样品测序序列，表示所述基因的外显子是否有重复和/或缺失。

2. 根据权利要求 1 的方法，其中步骤 7) 中比较待测样品和正常对照样品比对结果的步骤如下：

第一步：

对于每个 DMD 基因外显子，将待测样品比对到该外显子上的测序序列数目相对于比对到全部外显子的测序序列数目标标准化，获得标准化的待测样品测序序列数目比值，

将对照样品比对到该外显子上的测序序列数目相对于比对到全部外显子的测序序列数目标标准化，获得标准化的对照样品测序序列数目比值；

第二步：

对所述标准化的待测样品测序序列数目比值和标准化的对照样品测序序列数目比值进行比较，如果它们在统计学上差异显著，则

当所述标准化的待测样品测序序列数目比值小于标准化的对照样品测序序列数目比值时，将所述标准化的待测样品测序序列数目比值乘以 2 后和标准化的对照样品测序序列数目比值进行比较，如果它们在统计学上差异显著，表示该外显子没有发生杂合缺失，

当所述标准化的待测样品测序序列数目比值大于标准化的对照样品测序序列数目比值时，将所述标准化的待测样品测序序列数目比值除以 2 后和标准化的对照样品测序序列数目比值进行比较，如果它们在统计学上差异显著，表示该外显子没有发生杂合缺失。

3. 根据权利要求 1 或 2 的方法，其中在步骤 1) 中经打断后的所述双链 DNA 为 100-1000 bp，优选在 150-500 bp，更在 200-300 bp，最优选在 200-250 bp；优选所述双链 DNA 经打断后具有平末端，或者通过末端修复造成平末端；并且还优选在所述平末端双链 DNA 片段的 3'

端加"A"，所述 3'端加"A"的双链 DNA 片段与带有一个"T"的接头相连，成为两端都带有接头的双链的 DNA 片段混合物。

4. 根据权利要求 1-3 任一项的方法，其中所述接头序列长度是 20-150nt，优选是 50-100nt，优选所述双链的 DNA 片段两末端通过接头连接序列与接头序列连接，其中所述接头连接序列例如为 $\text{poly}(\text{N})_n$ ，其中，各个 N 分别独立地选自 A、T、G 或 C，n 为选自 1-20 的任一正整数，例如，所述的接头连接序列为 $\text{poly}(\text{A})_n$ ，其中，n 为 1-20 的正整数，较佳地 $n=1-2$ ，并且所述的接头连接互补区序列为 $\text{poly}(\text{N}')_m$ ，其中各 N' 分别独立地选自 A、T、G 或 C，m 为 1-20 的正整数例如选自 1-3 的任一正整数，并且 $\text{poly}(\text{N})_n$ 和 $\text{poly}(\text{N}')_m$ 为互补序列；优选所述的接头连接互补区的长度与接头连接序列的长度相同，即 $\text{poly}(\text{N})_n$ 和 $\text{poly}(\text{N}')_m$ 为完全互补序列。

5. 根据权利要求 1-4 任一项的方法，其中步骤 2) 中的所述第一引物和第二引物根据 DMD 基因的基因区序列和/或所述接头序列设计；所述的第一引物和第二引物具有对应于所述接头的引物结合区的接头结合区，以及位于接头结合区外侧的测序探针结合区；所述的第一引物和第二引物为长度 30-80 nt 的寡核苷酸，优选第一引物和第二引物长度为 55-65 nt；优选所述的第一引物和第二引物是不同的；例如第一引物是 SEQ ID NO. 1 并且/或者第二引物是 SEQ ID NO.2。

6. 根据权利要求 1-5 任一项的方法，其中步骤 3) 中的所述核酸芯片固定有 5-200,000 种对应于所述 DMD 基因的特异性探针，优选 50-150,000 种，更佳地 500-100,000 种，最佳地 5000-80,000 种；所述探针的序列对应于 DMD 基因的以下区域：外显子和/或外显子前后两端优选 50-500nt，更优选 100-300nt，最优选 200nt；并且/或者所述特异性探针的长度为 20-120 nt，较佳地 50-100 nt，更佳地 60-80 nt。

7. 根据权利要求 1-6 任一项的方法，其中方法步骤 3) 后包括步骤：用封闭分子封闭位于所述扩增产物两端的、对应于第一引物和第二引物的区域，从而获得两端被封闭的单链扩增产物的混合物，用所述的经封闭的单链扩增产物的混合物进行后续步骤 4)；优选其中所述的封闭分子封闭第一 PCR 扩增产物中对应于第一引物和第二引物的 70%-100% 区域，特别是 100% 区域；例如，所述封闭分子是 SEQ ID NO.3 或 SEQ ID NO.4。

8. 根据权利要求 1-7 任一项的方法，其中步骤 4) 中的所述第三引物和第四引物根据 DMD 基因的基因区序列和/或所述接头序列设计；所述第三引物和第四引物分别特异性对应于或结合于所述的第一引物和第二引物；所述的第三引物和第四引物分别特异性结合于所述的第一引物和第二引物的外侧，并且长度小于第一引物和第二引物；所述的第三引物和第四引物长度为 15-40 nt，较佳地为 20-25 nt；并且/或者所述的第三引物和第四引物是不同的；例如，第三引物是 SEQ ID NO.5 并且/或者第四引物是 SEQ ID NO.6。

9. 根据权利要求 1-8 任一项的方法，其中步骤 5) 中的测序采用第二代测序技术，例如 illumina solexa、Hiseq 2000、ABI SOLiD、Roche 454 测序平台或 Ion torrent；或者将所述的第二扩增产物的混合物与固相载体上固定的测序探针进行杂交，并进行固相桥式 PCR 扩增，形成测序簇；然后对所述测序簇用“边合成-边测序”法进行测序，从而得到样本中疾病相

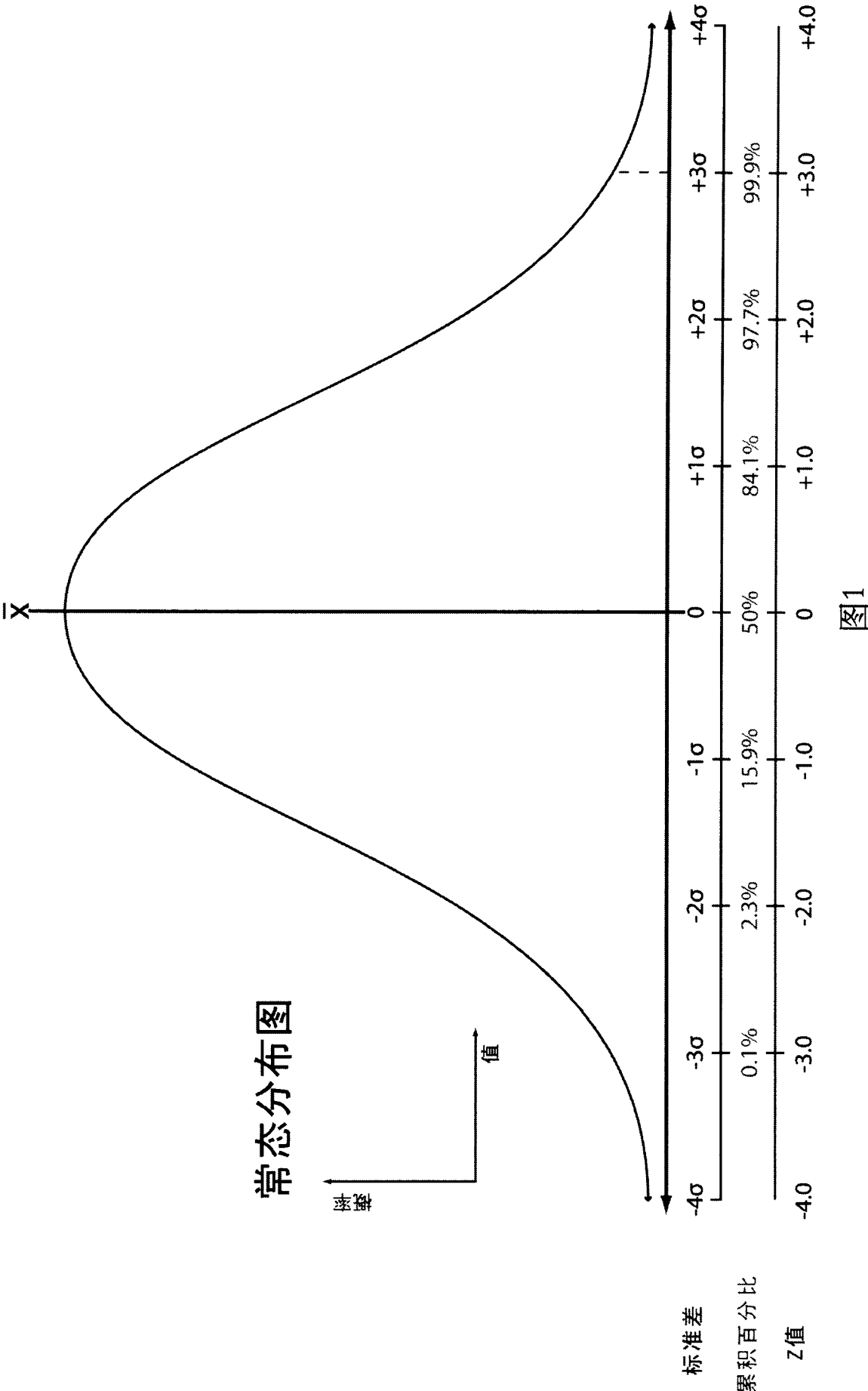
5 关核酸分子的核苷酸序列。

10. 本发明还提供了一种检测受试者杜氏肌营养不良症的方法，包括：

利用权利要求 1-9 任一项的方法检测来自所述受试者样本中的 DMD 基因突变；

如果检测到 DMD 基因突变，则该受试者患有杜氏肌营养不良症或易患杜氏肌营养不良症。

10



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/001390

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

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)

IPC: 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)

DWPI, CNABS, CPRSABS, CNKI, ISI web of knowledge, Google Scholar: ducherre muscular dystrophy, DMD, exon, deletion, repetition, genome, fragment, adaptor, adapter, primer, amplify, chip, array, sequencing, align

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 102533985 A (BGI SHENZHEN CO., LIMITED), 04 July 2012 (04.07.2012), see the whole document, particularly claims 1-9	1-9
PY		10
X	TEER, J.K. et al., Systematic comparison of three genomic enrichment methods for massively parallel DNA sequencing, GENOME RESEARCH, October 2010, vol. 20, no. 10, pages 1420-1431	1-9
Y		10
Y	YU, Yuanxun, DIG- labeled probe prepared by PCR for diagnosis of DMD gene deletion, CHINESE JOURNAL OF MEDICAL GENETICS, October 1995, vol. 12, no. 5, pages 298-299	10

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

* Special categories of cited documents:	"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
"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	"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
"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)	"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
"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	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 13 January 2013 (13.01.2013)	Date of mailing of the international search report 31 January 2013 (31.01.2013)
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 TIAN, Tian Telephone No.: (86-10) 62411042

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2012/001390

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 102533985 A	04.07.2012	None	

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2012/001390

A. 主题的分类

C12Q1/68 (2006.01) ;

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

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))

DWPI, CNABS, CPRSABS, CNKI, ISI web of knowledge, Google Scholar: 杜氏肌营养不良、外显子、缺失、重复、基因组、片段、接头、引物、扩增、芯片、阵列、测序、比对、DMD、exon、deletion, repetition, genome, fragment ; adaptor、adapter、primer、amplify、chip、array、sequencing、align »

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
PX	CN102533985A (深圳华大基因科技有限公司)04.7 月 2012 (04.07.2012)	1-9
PY	参见全文, 特别是权利要求 1-9。	10
X	Jamie K. Teer 等, Systematic comparison of three genomic enrichment	1-9
Y	methods for massively parallel DNA sequencing, Genome Research, 10 月 2010, 第 20 卷, 第 10 期, 第 1420-143 1 页。	10
Y	余元勋, 用 PCR 法制备地高辛标记探针诊断 DMD 基因缺失, 中华医学遗传学杂志, 10 月 1995, 第 12 卷第 5 期, 第 298-299 页。	10



其余文件在 C 栏的续页中列出。



因 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 3/4 之前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

14.1 月 2013 (13.01.2013)

国际检索报告邮寄日期

31.1 月 2013 (31.01.2013)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:

中华人民共和国国家知识产权局

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员

田甜

电话号码: (86-10) 62411042

国际检索报告

关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2012/001390

检索报告中引用的 专利文件	公布 日期	同族 专利	公布 日期
CN102533985A	04.07.2012	无	