

(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 2024/259564 A1

(51) 国际专利分类号:

C12Q 1/686 (2018.01) *C12N 9/22* (2006.01)
C12Q 1/6806 (2018.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/101079

(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: 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)。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)。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)。普珺(**PU, 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)。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:** METHOD FOR CONSTRUCTING TARGETED LIBRARY BY ONE-STEP PROCESS, AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种一步法构建靶向文库的方法及其应用

(57) **Abstract:** The present invention provides an oligonucleotide combination, comprising specific oligonucleotides and universal primers. A long-chain primer comprising a universal primer sequence and a sequence complementary to the specific oligonucleotides is generated by means of the specific oligonucleotides and the universal primers. The long-chain primer realizes enrichment of a target area and addition of a universal sequence on a product in a PCR process, so that one-step construction of a targeted library is realized.

(57) 摘要: 本发明提供一种寡核苷酸组合, 包含特异性寡核苷酸和通用引物, 通过特异性寡核苷酸和通用引物生成包含通用引物序列和与特异性寡核苷酸互补的序列的长链引物, 长链引物在 PCR 过程中实现目标区域的富集和产物上通用序列的添加, 实现一步法构建靶向文库。



WO 2024/259564 A1

一种一步法构建靶向文库的方法及其应用

技术领域

本发明属于文库构建技术领域，具体涉及一种一步法构建靶向文库的方法及其应用。

背景技术

随着测序技术的发展，对基因组候选区段的重测序需求日益增加，人们对序列的关注超过了少数的 SNP，候选区段的范围可能在 5kb~10M 之间。使用传统 sanger 法或全基因组测序价格昂贵，使用目标区域捕获测序很好地解决了这一难题。利用 PCR 技术或探针捕获技术选取特定基因或区域进行扩增，然后进行高通量测序，快速获得基因组信息的方法。相较于全基因组测序，它具有定向、高覆盖度和低成本等优点，因此，在肿瘤学、人类遗传学、微生物学、植物学等领域中有广泛的应用。目标区域捕获技术可大致分为两种：一种基于杂交的捕获测序技术，另外一种基于多重 PCR 的捕获技术。前者的实验流程繁琐，探针成本较高，限制了其在临床上的应用，后者实验操作简单，灵活性强，成本较低适应性更广。

多重 PCR 的靶向测序文库是一种通过特定 PCR 技术选取目标基因或区域进行扩增，并加上测序接头和样本标签序列的文库制备方法。目前主要的技术路线有两种：基于两步 PCR 的方法和基于 PCR 扩增和接头连接的方法。这两种方法都需要多步反应，操作相对复杂、时间较长，限制了其在临床检测中的应用。因此，需要开发更简单的建库技术，以扩大靶向测序技术在临床检测中的应用范围。

对于第一种基于两步 PCR 的技术路线，可以将第二步 PCR 需要添加的完整测序接头和样本标签序列整合到第一步 PCR 中特异性引物的 5'端，第一轮 PCR 完成后文库的 5'端就加上了对应的接头和样本标签序列。但相对于常规的两步 PCR 的方案，有两个弊端，1) 引物合成的长度非常长，引物准确性会下降，此外引物的成本会更高；2) 每一条特异性引物都需要对应的样本标签序列，有多少标签序列就需要对应多少套特异性引物，因此引物的总成本会急剧增加。

此外，基于多重 PCR 的靶向文库制备方式除了可以对 DNA 进行靶向扩增，还可以对 RNA 进行靶向文库制备。但相对于 DNA 靶向文库制备，RNA 靶向文库制备需要一步额外的逆转录过程。通常地，先采用 N6 引物对所有 RNA 进行逆转录得到一链 cDNA 产物，然后再通过特异性引物对 cDNA 进行扩增和富集，整体的操作是比较复杂的。

Thermo 公司的 Ampliseq 和 Paragon genomics 公司的 Clean plex 建库的方法是目前常用的建库方法，但是，其都包含多个步骤，建库操作繁琐，因此，需要开发更简单的建库方法。

发明内容

本发明第一方面的目的，在于提供寡核苷酸组合。

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 PCR 扩增方法。

本发明第四方面的目的，在于提供一种构建靶向文库的方法。

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，提供寡核苷酸组合，包含：特异性寡核苷酸和通用引物；

所述通用引物包含：第一通用引物和第二通用引物；

所述特异性寡核苷酸包含：上游特异性寡核苷酸和下游特异性寡核苷酸；其中，

所述上游特异性寡核苷酸从 5'端到 3'端依次包含：上游特异性序列和第一通用序列；

所述下游特异性寡核苷酸从 5'端到 3'端依次包含：下游特异性序列和第二通用序列；

1)所述第一通用引物的 3'端序列与所述上游特异性寡核苷酸的第一通用序列的部分序列或全部序列互

补,所述第二通用引物的3'端序列与所述下游特异性寡核苷酸的第二通用序列的部分序列或全部序列互补;或

2) 所述第二通用引物的3'端序列与所述上游特异性寡核苷酸的第一通用序列的部分序列或全部序列互补,所述第一通用引物的3'端序列与所述下游特异性寡核苷酸的第二通用序列的部分序列或全部序列互补;

所述上游特异性寡核苷酸的序列包含一个或多个可以被特异性切割剂切割的切割位点;

所述下游特异性寡核苷酸的序列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,所述酶促切割剂选自核糖核酸酶H、UDG中的至少一种;进一步选自核糖核酸酶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,所述上游特异性寡核苷酸和下游特异性寡核苷酸中所述的特异性切割剂可以相同或不同。

优选地,所述上游特异性寡核苷酸中的多个特异性切割剂可以相同或不同。

优选地,所述下游特异性寡核苷酸中的多个特异性切割剂可以相同或不同。

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)。

优选地,所述切割位点包含c1)。

优选地,所述上游特异性寡核苷酸和下游特异性寡核苷酸中所述的切割位点可以相同或不同。

优选地,所述上游特异性寡核苷酸中的多个切割位点可以相同或不同。

优选地,所述下游特异性寡核苷酸中的多个切割位点可以相同或不同。

优选地,所述第一通用引物包含功能核酸序列。

优选地,所述第一通用引物包含测序引物序列或测序引物互补序列。

优选地,所述第一通用引物包含一段或多段测序引物序列或测序引物互补序列;进一步优选地,所述第一通用引物包含两段或两段以上测序引物序列或测序引物互补序列。

优选地,所述第一通用引物还包含第一标签序列。

优选地,所述第一标签序列位于所述测序引物序列或测序引物互补序列的中间;进一步优选地,所述第一标签序列位于两段所述测序引物序列或测序引物互补序列的中间。

优选地,所述第二通用引物包含功能核酸序列。

优选地,所述第二通用引物包含测序引物序列或测序引物互补序列。

优选地,所述第二通用引物包含一段或多段测序引物序列或测序引物互补序列;进一步优选地,所述第二通用引物包含两段或两段以上测序引物序列或测序引物互补序列。

优选地,所述第二通用引物还包含第二标签序列。

优选地,所述第二标签序列位于所述测序引物序列或测序引物互补序列的中间;进一步优选地,所述第二标签序列位于两段所述测序引物序列或测序引物互补序列的中间。

优选地,所述第一标签序列、第二标签序列相同或不同。

优选地，所述第一通用序列、第二通用序列各自独立选自部分测序接头序列、全部测序接头序列、测序引物结合序列或任意固定序列（比如包含酶切位点）。

优选地，所述第一通用序列与所述第二通用序列相同或不同；进一步优选地，所述第一通用序列与所述第二通用序列不同。

优选地，所述上游特异性寡核苷酸的 3' 端进行阻断修饰；和/或

所述下游特异性寡核苷酸的 3' 端进行阻断修饰。

优选地，所述阻断修饰包含：磷酸化修饰、间臂修饰、氨基修饰中的至少一种；进一步优选地，所述阻断修饰包含：磷酸化修饰。

优选地，所述上游特异性寡核苷酸和所述下游特异性寡核苷酸的阻断修饰相同或不同。

优选地，所述特异性寡核苷酸中的上游特异性序列和下游特异性序列分别与待测目标区域的两个区段相同或互补。

优选地，所述第一通用引物的 5' 端含有磷酸基团；和/或

所述第二通用引物的 5' 端含有磷酸基团。

优选地，所述上游特异性寡核苷酸的序列包含多个可以被特异性切割剂切割的切割位点，切割位点数量大于等于 1/10 碱基，例如：可以是切割位点的个数大于等于 n 个；或者是 $n \sim N$ 个；或者是 3~9 个；其中， $n = N/10$ ， N 为上游特异性寡核苷酸的核苷酸个数， n 为整数。

优选地，所述下游特异性寡核苷酸的序列包含多个可以被特异性切割剂切割的切割位点，切割位点数量大于等于 1/10 碱基，例如：可以是切割位点的个数大于等于 n 个；或者是 $n \sim N$ 个；或者是 3~9 个；其中， $n = N/10$ ， N 为下游特异性寡核苷酸的核苷酸个数， n 为整数。

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，所述上游特异性寡核苷酸的上游特异性序列的核苷酸个数为 15~45。

优选地，所述上游特异性寡核苷酸的第一通用序列的核苷酸个数为 15~45。

优选地，所述上游特异性寡核苷酸的核苷酸个数为 30~90。

优选地，所述下游特异性寡核苷酸的下游特异性序列的核苷酸个数为 15~45。

优选地，所述下游特异性寡核苷酸的第二通用序列的核苷酸个数为 15~45。

优选地，所述下游特异性寡核苷酸的核苷酸个数为 30~90。

优选地，所述第一通用引物的核苷酸个数为 15~90。

优选地，所述第二通用引物的核苷酸个数为 15~90。

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特异性寡核苷酸中随机分布。

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特异性寡核苷酸中随机分布。

优选地，所述特异性寡核苷酸包含多对特异性寡核苷酸；进一步包含多组靶向不同的待测目标区域的多对特异性寡核苷酸。

优选地，所述通用引物包含多对通用引物。

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寡核苷酸组合。

优选地，所述试剂盒还包含：逆转录酶和 DNA 聚合酶中的至少一种；进一步包含逆转录酶和 DNA 聚合酶。

优选地，所述试剂盒还包含：本发明第一个方面中的特异性切割剂。

优选地，所述试剂盒还包含：逆转录引物。

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。

本发明的第三个方面，提供一种多重 PCR 扩增方法，包含采用本发明第一个方面的寡核苷酸组合的步骤。

优选地，所述多重 PCR 扩增方法包括如下步骤：利用本发明第一个方面的寡核苷酸组合对核酸进行多重 PCR 反应。

优选地，所述反应的步骤包括：

通用引物延伸反应，并切割互补链，生成 PCR 反应引物；

利用 PCR 反应引物进行扩增反应。

优选地，所述延伸反应和扩增反应在同一体系中进行。

优选地，所述核酸为 RNA 时，所述多重 PCR 反应前还包含：逆转录反应。

优选地，所述逆转录反应与所述多重 PCR 反应在同一体系或不在同一体系中进行；进一步优选地，所述逆转录反应与所述多重 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。

本发明的第四个方面，提供一种构建靶向文库的方法，包含本发明第三个方面的多重 PCR 扩增方法的步骤，得到测序文库。

优选地，得到测序文库前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。

本发明的有益效果是：

本发明提供了寡核苷酸组合，包含：特异性寡核苷酸和通用引物；其中，特异性寡核苷酸的 5'端到 3'端依次包含：特异性序列和通用序列，特异性寡核苷酸包含一个或多个可以被特异性切割剂切割的切割位点；通用引物的 3'端包含与特异性寡核苷酸的通用序列互补的序列；从而可以通过特异性寡核苷酸和通用引物（短链寡核苷酸）生成包含通用引物序列和与特异性寡核苷酸互补的序列的长链引物，长链引物在 PCR 过程中实现目标区域的富集和产物上通用引物序列（比如测序接头序列和样本标签序列）的添加，进而实现一步法构建靶向文库，具有操作简单，时间短，设计的引物/特异性寡核苷酸短，准确性高，成本低等优点；同时，特异性寡核苷酸和通用引物的 3'端序列是通用的，多样性较低，在 RNA 靶向文库制备的过程中 1) RT 反应中，特异性寡核苷酸和通用引物的 3'端序列多样性低，引物和模板结合的可能性较低，并且哪怕和模板结合的产生的非特异性产物，在后续 PCR 扩增过程中也不会积累；2) RT 过程中，特异性寡核苷酸和通用引物的 3'端序列多样性低，互相之间形成二聚体的可能性较小，产生二聚体的概率小；通过短链寡核苷酸（特异性寡核苷酸和通用引物）生成包含通用引物序列和与特异性寡核苷酸互补的序列的长链引物并兼容 RNA 逆转录过程，实现逆转录步骤、长链引物生成、PCR 目标区域的富集和通用引物序列（比如测序接头序列和样本标签序列）的添加；在一管中实现逆转录、扩增和文库制备的过程；产物可直接进行后续的测序、克隆等应用。

附图说明

图 1 是特异性寡核苷酸和通用引物反应结构示意图。

图 2 是实施例 1 的构建靶向文库的方法的流程图。

图 3 是实施例 2 的构建靶向文库的方法的流程图。

图 4 是实施例 2 的构建靶向文库的方法相比比例 2 的流程优势图。

具体实施方式

在本发明的描述中，术语“第一”、“第二”、“第三”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，提供寡核苷酸组合，包含：特异性寡核苷酸和通用引物；

所述通用引物包含：第一通用引物和第二通用引物；

所述特异性寡核苷酸包含：上游特异性寡核苷酸和下游特异性寡核苷酸；其中，

所述上游特异性寡核苷酸从5'端到3'端依次包含：上游特异性序列和第一通用序列；

所述下游特异性寡核苷酸从5'端到3'端依次包含：下游特异性序列和第二通用序列；

1)所述第一通用引物的3'端序列与所述上游特异性寡核苷酸的第一通用序列的部分序列或全部序列互补，所述第二通用引物的3'端序列与所述下游特异性寡核苷酸的第二通用序列的部分序列或全部序列互补；或

2) 所述第二通用引物的3'端序列与所述上游特异性寡核苷酸的第一通用序列的部分序列或全部序列互补，所述第一通用引物的3'端序列与所述下游特异性寡核苷酸的第二通用序列的部分序列或全部序列互补；

所述上游特异性寡核苷酸的序列包含一个或多个可以被特异性切割剂切割的切割位点；

所述下游特异性寡核苷酸的序列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，所述第一通用引物的3'端序列与所述上游特异性寡核苷酸的第一通用序列的部分序列或全部序列互补，所述第二通用引物的3'端序列与所述下游特异性寡核苷酸的第二通用序列的部分序列或全部序列互补。

优选地，所述第一通用引物的3'端序列与所述上游特异性寡核苷酸的第一通用序列的全部序列互补，所述第二通用引物的3'端序列与所述下游特异性寡核苷酸的第二通用序列的全部序列互补。

在构建靶向文库的过程中，一般有两种：基于两步PCR的方法和基于PCR扩增和接头连接的方法，其中，基于两步PCR的方法可以是：1) 先进行第一步PCR扩增目的基因，得到产物再进行第二步PCR添加测序接头序列和样本标签序列等通用引物序列（需要多步反应，操作相对复杂、时间较长）；或2) 将第二步PCR需要添加的测序接头序列和样本标签序列等通用引物序列引入第一步PCR的特异性引物的5'端（引物长，准确性下降，成本增加）；

而本发明通过设计特异性寡核苷酸和通用引物，其中，特异性寡核苷酸的5'端到3'端依次包含：特异性序列和通用序列，特异性寡核苷酸包含一个或多个可以被特异性切割剂切割的切割位点；通用引物的3'端包含与特异性寡核苷酸的通用序列互补的序列；从而使得特异性寡核苷酸与通用引物在逆转录酶和/或聚合酶的作用下形成含有通用引物序列和特异性寡核苷酸序列的双链DNA（图1，特异性寡核苷酸的3'端优选修饰有阻断基团时，无法延伸，因此，双链DNA为不完全互补的双链DNA，其中，一条链（在这里称为短链）为特异性寡核苷酸，另一条链（在这里称为长链）包含通用引物序列和与特异性寡核苷酸互补的序列），短链中的切割位点在特异性切割剂的作用下切割（特异性寡核苷酸的3'端未修饰阻断基团时，具有类似的效果），并且在后续PCR高温过程中与长链分离，长链可以和待测目标区域互补，在聚合酶的作用下对目标区域进行扩增，扩增得到含有通用引物序列和待测目标序列的产物，即靶向文库，从而实现一步反应完成目标区域的捕获和通用引物序列（比如测序接头序列和样本标签序列）的添加，即通过短链寡核苷酸（特异性寡核苷酸和通用引物）生成包含通用引物序列和待测目标序列的长链引物，实现目标区域的富集和通用引物序列（比如测序接头序列和样本标签序列）的添加，实现一步法构建靶向文库，具有操作简单，时间短，设计的引物/特异性寡核苷酸短，准确性高，成本低等优点。

同时，在RNA靶向文库制备RT-mPCR(Reverse transcript multiplex PCR)的过程中，RT反应和mPCR

反应是两个独立的反应，通常需要先经过随机引物进行逆转录，然后再加入多重 PCR 引物进行目标区域 PCR 扩增，步骤较为复杂；如果采用一步法进行 RT-mPCR，在反应的开始就需要加入特异性引物，其存在如下缺点：多条特异性引物的 3'端序列多样性较强，在低温的 RT 过程中 1) 会和模板产生非特异性结合，产生非特异性产物，并在后续的 PCR 过程中指数积累；2) 特异性引物序列多样性较高，易互补结合并在逆转录酶的作用下产生二聚体，在后续 PCR 过程中指数积累，导致反应终止；而本申请发明了一种特异性引物可以兼容逆转录反应而不产生非特异性和二聚体的方法，申请方法特异性寡核苷酸和通用引物的 3'端序列是通用的，多样性较低，在 RT 过程中 1) 特异性寡核苷酸和通用引物的 3'端是单一序列，多样性低，和模板互相结合的可能性较低，并且哪怕和模板结合产生的非特异性产物，在后续 PCR 扩增过程中也不会积累；2) 特异性寡核苷酸和通用引物的 3'端都是单一的序列，多样性低，互相之间形成二聚体的可能性较小，产生二聚体的概率小，因此在特异性短链寡核苷酸生成长链引物的过程可以兼容逆转录过程；首先，N6 逆转录 RNA 生成 cDNA，同时短链寡核苷酸（特异性寡核苷酸和通用引物）生成包含通用引物序列和待测目标序列的长链引物，然后在聚合酶的作用下对 cDNA 目标区域进行扩增，扩增得到含有通用引物序列和待测目标序列的产物，即靶向文库，实现逆转录步骤、长链引物生成和目标区域的富集和通用引物序列（比如测序接头序列和样本标签序列）的添加，实现一步反应完成 RT 和 mPCR 反应，即实现一步法对 RNA 构建靶向文库。

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；进一步包含核糖核酸酶（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。

优选地，所述酶促切割剂选自核糖核酸酶 H、UDG 中的至少一种；进一步选自核糖核酸酶 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，所述上游特异性寡核苷酸和下游特异性寡核苷酸中所述的特异性切割剂可以相同或不同。

优选地，所述上游特异性寡核苷酸中的多个特异性切割剂可以相同或不同。

优选地，所述下游特异性寡核苷酸中的多个特异性切割剂可以相同或不同。

优选地，所述切割位点包含 c1)~c2)中至少一种；进一步包含 c1)：

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）。

优选地，所述上游特异性寡核苷酸和下游特异性寡核苷酸中所述的切割位点可以相同或不同。

优选地，所述上游特异性寡核苷酸中的多个切割位点可以相同或不同。

优选地，所述下游特异性寡核苷酸中的多个切割位点可以相同或不同。

优选地，所述第一通用引物包含功能核酸序列。

优选地，所述第一通用引物的 5' 端包含功能核酸序列。

优选地，所述第一通用引物包含测序引物序列或测序引物互补序列。

优选地，所述第一通用引物的 5'端包含测序引物序列或测序引物互补序列。

优选地，所述第一通用引物包含一段或多段测序引物序列或测序引物互补序列；进一步优选地，所述第一通用引物包含两段或两段以上测序引物序列或测序引物互补序列。

优选地，所述第一通用引物的 5'端包含一段或多段测序引物序列或测序引物互补序列；进一步优选地，所述第一通用引物的 5'端包含两段或两段以上测序引物序列或测序引物互补序列。

优选地，所述第一通用引物还包含第一标签序列，用于区分不同样本，以便后续的多样本混合测序。例如可以是 barcode 序列或 index 序列。

优选地，所述第一通用引物的 5'端还包含第一标签序列，用于区分不同样本，以便后续的多样本混合测序。例如可以是 barcode 序列或 index 序列。

优选地，所述第一标签序列可以为唯一分子标签（UMI），用于统计样本中核酸分子的拷贝数。

优选地，所述第一标签序列的长度为 5~20bp。

优选地，所述第一标签序列位于所述测序引物序列或测序引物互补序列的中间；进一步优选地，所述第一标签序列位于两段所述测序引物序列或测序引物互补序列的中间。

优选地，所述第二通用引物包含功能核酸序列。

优选地，所述第二通用引物的 5'端包含功能核酸序列。

优选地，所述第二通用引物包含测序引物序列或测序引物互补序列。

优选地，所述第二通用引物的 5'端包含测序引物序列或测序引物互补序列。

优选地，所述第二通用引物包含一段或多段测序引物序列或测序引物互补序列；进一步优选地，所述第二通用引物包含两段或两段以上测序引物序列或测序引物互补序列。

优选地，所述第二通用引物的 5'端包含一段或多段测序引物序列或测序引物互补序列；进一步优选地，所述第二通用引物的 5'端包含两段或两段以上测序引物序列或测序引物互补序列。

优选地，所述第二通用引物还包含第二标签序列，用于区分不同样本，以便后续的多样本混合测序。例如可以是 barcode 序列或 index 序列。

优选地，所述第二通用引物的 5'端还包含第二标签序列，用于区分不同样本，以便后续的多样本混合测序。例如可以是 barcode 序列或 index 序列。

优选地，所述第二标签序列可以为唯一分子标签（UMI），用于统计样本中核酸分子的拷贝数。

优选地，所述第二标签序列的长度为 5~20bp。

优选地，所述第二标签序列位于所述测序引物序列或测序引物互补序列的中间；进一步优选地，所述第二标签序列位于两段所述测序引物序列或测序引物互补序列的中间。

优选地，所述第一标签序列、第二标签序列相同或不同。

优选地，所述第一标签序列、第二标签序列不同。

优选地，所述第一通用序列、第二通用序列各自独立选自部分测序接头序列、全部测序接头序列、测序引物结合序列或任意固定序列（比如包含酶切位点）。

优选地，所述测序接头序列可以是任何一种测序平台的任何一种测序接头。

优选地，所述第一通用序列与所述第二通用序列相同或不同；进一步优选地，所述第一通用序列与所述第二通用序列不同。

优选地，所述上游特异性寡核苷酸的 3'端进行阻断修饰；和/或

所述下游特异性寡核苷酸的 3'端进行阻断修饰。

进一步优选地，所述上游特异性寡核苷酸的 3'末端进行阻断修饰；和/或

所述下游特异性寡核苷酸的 3'末端进行阻断修饰。

优选地，所述阻断修饰包含：磷酸化修饰、间臂修饰、氨基修饰中的至少一种；进一步优选地，所述

阻断修饰包含：磷酸化修饰。

优选地，所述上游特异性寡核苷酸和所述下游特异性寡核苷酸的阻断修饰相同或不同。

优选地，所述特异性寡核苷酸中的上游特异性序列和下游特异性序列分别与待测目标区域的两个区段相同或互补。

优选地，所述特异性寡核苷酸中的特异性序列的设计遵循常规的引物设计原则，但是和常规的引物序列反向互补，比如：上游特异性序列与待测目标区域上游负链（即反义链、cDNA 第二链（构建 RNA 靶向文库时））序列相同或正链（即有义链、cDNA 第一链（构建 RNA 靶向文库时））序列互补，下游特异性序列与待测目标区域的下游正链（即有义链、cDNA 第一链（构建 RNA 靶向文库时））序列相同或负链（即反义链、cDNA 第二链（构建 RNA 靶向文库时））序列互补。

优选地，所述上游特异性寡核苷酸的上游特异性序列与待测目标区域的上游负链序列相同或正链序列互补。

优选地，所述下游特异性寡核苷酸的下游特异性序列与待测目标区域的下游正链序列相同或负链序列互补。

优选地，所述第一通用引物的 5'端含有磷酸基团，通过第一通用引物可以使得扩增的产物的 5'端带有磷酸基团，从而避免专门进行磷酸化的过高成本；和/或

所述第二通用引物的 5'端含有磷酸基团，通过第二通用引物可以使得扩增的产物的 5'端带有磷酸基团，从而避免专门进行磷酸化的过高成本。

优选地，所述第二通用引物的 5'端含有磷酸基团。

优选地，所述特异性寡核苷酸、通用引物为 DNA 片段或其类似物。

优选地，所述上游特异性寡核苷酸的序列包含多个可以被特异性切割剂切割的切割位点，切割位点数量大于等于 1/10 碱基，例如：可以是切割位点的个数大于等于 n 个；或者是 $n \sim N$ 个；或者是 3~9 个；其中， $n = N/10$ ， N 为上游特异性寡核苷酸的核苷酸个数。

优选地，所述下游特异性寡核苷酸的序列包含多个可以被特异性切割剂切割的切割位点，切割位点数量大于等于 1/10 碱基，例如：可以是切割位点的个数大于等于 n 个；或者是 $n \sim N$ 个；或者是 3~9 个；其中， $n = N/10$ ， N 为下游特异性寡核苷酸的核苷酸个数。

优选地，所述上游特异性寡核苷酸的上游特异性序列的核苷酸个数为 15~45。

优选地，所述上游特异性寡核苷酸的第一通用序列的核苷酸个数为 15~45。

优选地，所述上游特异性寡核苷酸的核苷酸个数为 30~90。

优选地，所述下游特异性寡核苷酸的下游特异性序列的核苷酸个数为 15~45。

优选地，所述下游特异性寡核苷酸的第二通用序列的核苷酸个数为 15~45。

优选地，所述下游特异性寡核苷酸的核苷酸个数为 30~90。

优选地，所述第一通用引物的核苷酸个数为 15~90。

优选地，所述第二通用引物的核苷酸个数为 15~90。

优选地，所述特异性寡核苷酸包含多对特异性寡核苷酸，可结合至待测目标区域的不同位置；进一步包含多组靶向不同的待测目标区域的多对特异性寡核苷酸。

优选地，所述多对为两对以上。

优选地，所述多组为两组以上。

优选地，所述通用引物包含多对通用引物。

优选地，所述第一通用引物包含一条或多条第一通用引物；进一步包含多条第一通用引物。

优选地，所述第二通用引物包含一条或多条第二通用引物；进一步包含一条第二通用引物。

优选地，检测 EGFR 基因的寡核苷酸组合，包含：特异性寡核苷酸和通用引物；

所述特异性寡核苷酸包含：上游特异性寡核苷酸和下游特异性寡核苷酸；

所述通用引物包含：第一通用引物和第二通用引物；

所述上游特异性寡核苷酸的序列如 SEQ ID NO.1~SEQ ID NO.8 所示，所述下游特异性寡核苷酸的序列如 SEQ ID NO.9~SEQ ID NO.16 所示；

序列如 SEQ ID NO.1~SEQ ID NO.8 所示的上游特异性寡核苷酸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.9~SEQ ID NO.16 所示的下游特异性寡核苷酸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；

所述第一通用引物的序列如 SEQ ID NO.53 所示，所述第二通用引物的序列如 SEQ ID NO.54 所示。

优选地，序列如 SEQ ID NO.1~16 所示的特异性寡核苷酸的 3' 端进行阻断修饰。

优选地，检测 SARS-COV-2 基因的寡核苷酸组合，包含：特异性寡核苷酸和通用引物；

所述特异性寡核苷酸包含：上游特异性寡核苷酸和下游特异性寡核苷酸；

所述通用引物包含：第一通用引物和第二通用引物；

所述上游特异性寡核苷酸的序列如 SEQ ID NO.17、19、21、23、25 所示，所述下游特异性寡核苷酸的序列如 SEQ ID NO.18、20、22、24、26 所示；

序列如 SEQ ID NO.17、19、21、23、25 所示的上游特异性寡核苷酸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.18、20、22、24、26 所示的下游特异性寡核苷酸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；

所述第一通用引物的序列如 SEQ ID NO.53 所示，所述第二通用引物的序列如 SEQ ID NO.54 所示。

优选地，序列如 SEQ ID NO.17~26 所示的特异性寡核苷酸的 3' 端进行阻断修饰。

对于上述检测 EGFR 基因的寡核苷酸组合和/或检测 SARS-COV-2 基因的寡核苷酸组合：

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；进一步包含核糖核酸酶（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。

优选地，所述酶促切割剂选自核糖核酸酶 H、UDG 中的至少一种；进一步选自核糖核酸酶 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，所述上游特异性寡核苷酸和下游特异性寡核苷酸中所述的特异性切割剂可以相同或不同。

优选地，所述上游特异性寡核苷酸中的多个特异性切割剂可以相同或不同。

优选地，所述下游特异性寡核苷酸中的多个特异性切割剂可以相同或不同。

优选地，所述切割位点包含 c1)~c2)中至少一种；进一步包含 c1)：

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）。

优选地，所述上游特异性寡核苷酸和下游特异性寡核苷酸中所述的切割位点可以相同或不同。

优选地，所述上游特异性寡核苷酸中的多个切割位点可以相同或不同。

优选地，所述下游特异性寡核苷酸中的多个切割位点可以相同或不同。

优选地，序列如 SEQ ID NO.1~16 所示的特异性寡核苷酸的切割位点的位置如表 1 及附注所示。

优选地，序列如 SEQ ID NO.17~26 所示的特异性寡核苷酸的切割位点的位置如表 4 及附注所示。

优选地，所述阻断修饰包含：磷酸化修饰、间臂修饰、氨基修饰中的至少一种；进一步优选地，所述阻断修饰包含：磷酸化修饰。

优选地，所述第二通用引物的 5'端含有磷酸基团，通过第二通用引物可以使得扩增的产物的 5'端带有磷酸基团，从而避免专门进行磷酸化的过高成本。

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寡核苷酸组合。

优选地，所述试剂盒还包含：用于所述通用引物延伸的酶。

优选地，所述用于所述通用引物延伸的酶包含逆转录酶和 DNA 聚合酶中的至少一种；进一步包含逆转录酶和 DNA 聚合酶：其用于通用引物（第一通用引物和第二通用引物）以特异性寡核苷酸（上游特异性寡核苷酸和下游特异性寡核苷酸）为模板延伸形成双链寡核苷酸（优选为不完全互补的双链寡核苷酸）。

优选地，所述试剂盒还包含：特异性切割剂（优选为本发明第一个方面中的特异性切割剂），其用于切割通用引物（第一通用引物和第二通用引物）以特异性寡核苷酸（上游特异性寡核苷酸和下游特异性寡核苷酸）为模板延伸形成的双链寡核苷酸（优选为不完全互补的双链寡核苷酸）（例如 DNA 双链）中的特异性寡核苷酸（上游特异性寡核苷酸和下游特异性寡核苷酸）。

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、 Mg^{2+} 、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；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：所述用于所述通用引物延伸的酶包含 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，所述试剂盒还包含：逆转录反应混合液，其用于构建 RNA 的靶向文库时的逆转录反应（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 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 和逆转录引物；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：所述用于所述通用引物延伸的酶包含逆转录酶时，所述逆转录反应混合液可以不包含逆转录酶；所述用于所述通用引物延伸的酶或所述 PCR 反应混合液包含 DNA 聚合酶时，所述逆转录反应混合液可以不包含 DNA 聚合酶；所述 PCR 反应混合液包含 dNTPs 时，所述逆转录反应混合液可以不包含 dNTPs。

优选地，所述 DNA 聚合酶为耐高温 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。

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 PCR 扩增方法，包含采用本发明第一个方面的寡核苷酸组合的步骤。

优选地，所述多重 PCR 扩增方法包括如下步骤：利用本发明第一个方面的寡核苷酸组合对核酸进行多重 PCR 反应。

优选地，所述反应的步骤包括：

通用引物延伸反应，并切割互补链，生成 PCR 反应引物；

利用 PCR 反应引物进行扩增反应。

优选地，所述多重 PCR 反应的体系包含：用于所述通用引物延伸的酶（优选为本发明第二个方面中的用于所述通用引物延伸的酶）、特异性切割剂（优选为本发明第二个方面中的特异性切割剂）；特异性寡核苷酸与通用引物在用于所述通用引物延伸的酶（例如：逆转录酶和/或聚合酶）的作用下形成含有通用引物序列和特异性寡核苷酸序列的双链 DNA（特异性寡核苷酸的 3'端优选修饰有阻断基团，无法延伸，因此，双链 DNA 为不完全互补的双链 DNA，其中，一条链（在这里称为短链）为特异性寡核苷酸，另一条链（在这里称为长链）包含通用引物序列和与特异性寡核苷酸互补的序列），短链中的切割位点在特异性切割剂的作用下切割（特异性寡核苷酸的 3'端未修饰阻断基团时，具有类似的效果），并且在后续 PCR 高温过程中与长链分离，长链可以和待测目标区域互补，在聚合酶的作用下对目标区域进行扩增，扩增得到含有通用引物序列（比如测序接头序列和样本标签序列）和待测目标序列的产物。

优选地，所述延伸反应和扩增反应在同一体系中进行。

优选地，所述同一体系具体为不进行洗脱和/或纯化处理。

优选地，所述多重 PCR 反应的体系中所述特异性切割剂的浓度小于用于所述通用引物延伸的酶的浓度，从而使延伸反应先于切割反应。

优选地，所述多重 PCR 反应的体系还包含：PCR 反应混合液（优选为本发明第二个方面中的 PCR 反应液）。

优选地，所述核酸来自以下任意一种或多种生物样本：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，所述核酸通过所述生物样本发生裂解反应得到。

优选地，所述裂解反应在所述多重 PCR 反应之前。

优选地，所述裂解反应和所述多重 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 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 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 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。

优选地，所述核酸为 RNA 时，所述裂解反应后和所述多重 PCR 反应前还包含逆转录反应，即将 RNA 逆转录为 cDNA。

优选地，所述逆转录反应与所述多重 PCR 反应在同一体系或不在同一体系中进行；进一步优选地，所述逆转录反应与所述多重 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多重 PCR 反应。

本申请设计的特异性寡核苷酸和通用引物的 3'端序列是通用的，多样性较低，在逆转录反应过程中 1) 特异性寡核苷酸和通用引物的 3'端是单一序列，多样性低，和模板互相结合的可能性较低，并且哪怕和模板结合的产生的非特异性产物，在后续 PCR 扩增过程中也不会积累；2) 特异性寡核苷酸和通用引物的 3'端都是单一的序列，多样性低，互相之间形成二聚体的可能性较小，产生二聚体的概率小，因此在特异性短链寡核苷酸生长链引物的过程可以兼容逆转录过程；首先，N6 逆转录 RNA 生成 cDNA，同时短链寡核苷酸（特异性寡核苷酸和通用引物）生成包含通用引物序列和待测目标序列的长链引物，然后在聚合酶的作用下对 cDNA 目标区域进行扩增，扩增得到含有通用引物序列和待测目标序列的产物，兼容逆转录反应和 PCR 反应。

优选地，所述核酸为 RNA 时，所述多重 PCR 反应的体系还包含：逆转录反应混合液（优选为本发明第二个方面中的逆转录反应混合液）。

本发明的第六个方面，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 PCR 扩增方法的步骤，得到测序文库。

优选地，得到测序文库前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。

本发明的第七个方面，提供一种测序方法，包含：本发明第六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六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。

本发明第八个方面，提供一种获得目标区域基因信息的方法，包含：本发明第七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、突变信息中的至少一种；

所述测序的方法为本发明第七个方面的测序方法。

优选地，所述信息包含突变信息时，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突变信息。

一种获得 EGFR 基因信息的方法，包括如下步骤：测序，获得测序数据；获得 EGFR 基因信息；所述信息包含序列信息、突变信息中的至少一种；

所述测序的方法为本发明第七个方面的测序方法；

所述寡核苷酸组合为本发明第一个方面中的检测 EGFR 基因的寡核苷酸组合。

优选地，所述信息包含突变信息时，所述获得 EGFR 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，获得 EGFR 基因的突变信息。

本发明第九个方面，提供本发明第一个方面的寡核苷酸组合、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 c1)~c8) 任一项中的应用；

- c1)构建靶向文库；
- c2)制备用于构建靶向文库的产品；
- c3)测序；
- c4)制备用于测序的产品；
- c5)获得目标区域基因信息；
- c6)制备用于获得目标区域基因信息的产品；
- c7)多重 PCR 扩增；
- c8)制备用于多重 PCR 扩增的产品。

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。

实施例 1 EGFR 基因肿瘤热点基因的文库制备方法

EGFR 基因肿瘤热点基因的文库制备方法，示意图如图 2 所示，包括如下步骤：

(1) 设计 EGFR 基因肿瘤热点基因捕获 panel 以及通用标签引物，该 panel 包含 8 对特异性寡核苷酸 (EGFR_1F~EGFR_8F, EGFR_1R~EGFR_8R)，扩增子大小为 100~200bp，特异性寡核苷酸的序列如表 1 所示；通用标签引物包含通用标签引物 F 和通用标签引物 R，通用标签引物 F 的核苷酸序列为：TGTGAGCCAAGGAGTTATCGGACCTAATTGCTTCCTAAGACCGCTTGGCCTCCGACTT (SEQ ID NO.53，其中，加粗部分 (SEQ ID NO.55) 为本实施例的通用标签引物 F 的标签序列，标签序列可以是随机的，也可以是提前设定的，比如表 2 中序列如 SEQ ID NO.56~62 所示的标签序列)；通用标签引物 F 的下划线部分和上游特异性寡核苷酸 3'端序列 (通用序列) 互补；通用标签引物 R 的核苷酸序列为：Phos-GAACGACATGGCTACGATCCGACTT (SEQ ID NO.54)，Phos 为磷酸化修饰，下划线部分和下游特异性寡核苷酸 3'端序列 (通用序列) 互补。

(2) PCR 反应

在 PCR 管中按照表 3 所示反应体系配置 mPCR (multiplex PCR) 体系，进行 mPCR 反应，反应程序如下：94℃，2min，60℃，5min；94℃ 30s，58℃ 2min，72℃ 30s，27cycles；72℃ 5min；12℃ ∞，反应完后用 1.5X AMPure (贝克曼公司) 磁珠进行纯化，最后将纯化产物溶于 22μL 洗脱缓冲液，得到文库。

表 1 特异性寡核苷酸

名称	序列 (5'-3')
EGFR_1F	ACATCCATCTGGTACGTGGTGAAGTCGGAGGCCAAGCG (SEQ ID NO.1) -phos
EGFR_2F	GTGGAGAAAAATGTTTCATGCATGTCTAAGTCGGAGGCCAAGCG (SEQ ID NO.2) -phos
EGFR_3F	TGGGTGTAAGAGGCTCCACAAAGTCGGAGGCCAAGCG (SEQ ID NO.3) -phos
EGFR_4F	TGACAGAGAGAGAAGGAAGACGTAAGTCGGAGGCCAAGCG (SEQ ID NO.4) -phos
EGFR_5F	GTCAGTGTGGCTTCGCATGAAGTCGGAGGCCAAGCG (SEQ ID NO.5) -phos
EGFR_6F	TCTTTGTGTTCCCGGACATAGTCAAGTCGGAGGCCAAGCG (SEQ ID NO.6) -phos

EGFR_7F	ATCTGTGATCTTGACATGCTGCG AAGTCGGAGGCCAAGCG (SEQ ID NO.7) - phos
EGFR_8F	ACATCCATCTGGTACGTGGTGA AAGTCGGAGGCCAAGCG (SEQ ID NO.8) -phos
EGFR_1R	TATCCCATCTTGGAGAGTCTTTGGGA AAGTCGGATCGTAGCCATGT (SEQ ID NO.9) -phos
EGFR_2R	GAAAACAACACCCTGGTCTGGA AAGTCGGATCGTAGCCATGT (SEQ ID NO.10) -phos
EGFR_3R	GTATAAGGTAAGGTCCCTGGCAC AAGTCGGATCGTAGCCATGT (SEQ ID NO.11) -phos
EGFR_4R	TCCATGGCTCTGAACCTCAG AAGTCGGATCGTAGCCATGT (SEQ ID NO.12) - phos
EGFR_5R	TGCCTCCTGGACTATGTCC AAGTCGGATCGTAGCCATGT (SEQ ID NO.13) - phos
EGFR_6R	TAGCAAGAGTTTGCCATGGGGA AAGTCGGATCGTAGCCATGT (SEQ ID NO.14) -phos
EGFR_7R	CACTAGCTGTATTGTTTAACACATGCA AAGTCGGATCGTAGCCATGT (SEQ ID NO.15) -phos
EGFR_8R	TATCCCATCTTGGAGAGTCTTTGGGA AAGTCGGATCGTAGCCATGT (SEQ ID NO.16) -phos

注：上述特异性寡核苷酸按照每条特异性寡核苷酸20μM浓度进行混合，得到总浓度为20μM的特异性寡核苷酸池；上述特异性寡核苷酸的3'端采用磷酸（phos）封闭，防止3'端延伸，下划线碱基为核糖核苷酸（切割位点），可以被Rnase HII识别并水解；上游特异性寡核苷酸（EGFR_1F~EGFR_8F）的5'到3'端依次为：特异性序列和通用序列（加粗部分），加粗部分为与通用标签引物F的3'端互补的序列；下游特异性寡核苷酸（EGFR_1R~EGFR_8R）的5'到3'端依次为：特异性序列和通用序列（加粗部分），加粗部分为与通用标签引物R的3'端互补的序列。

表2 通用标签引物F可选的标签序列

Barcode1 ID	SEQ	Barcode1 ID	SEQ
01	ATCGGACCTA (SEQ ID NO.55)	05	CGGATACGAA (SEQ ID NO.59)
02	GATTCCGTCC (SEQ ID NO.56)	06	GCTCGTTACC (SEQ ID NO.60)
03	CGGCAGTAAG (SEQ ID NO.57)	07	TTATACGTTG (SEQ ID NO.61)
04	TCAATTAGGT (SEQ ID NO.58)	08	AACGCGACGT (SEQ ID NO.62)

表3 mPCR反应体系

gDNA（10ng NA12878 gDNA 或 FFPE 标准品 HD200 DNA (Horizon 公司)或水（阴性对照）	18μL
5X HawkZ05 Fast DNA Polymerase Buffer	5μL

表 1 所示特异性寡核苷酸池 (20μM)	1.0μL
HawkZ05 Fast DNA Polymerase (40U/μl)	0.5μL
dNTP(25mM each)	0.5μL
Rnase HII	1.0μL
通用标签引物 F (10μM)	1.0μL
通用标签引物 R (10μM)	1.0μL
蒸馏水	22μL
总体积	50 μL

注：HawkZ05 Fast DNA Polymerase 来自罗氏公司，货号 07731264103。Rnase HII 酶来自 NEB 公司，货号 M0288S。

实施例 2 新冠 SARS-COV-2 基因的文库制备方法

新冠 SARS-COV-2 基因的文库制备方法，示意图如图 3 所示，包括如下步骤：

(1) 设计新冠 SARS-COV-2 基因捕获 panel 以及通用标签引物，该 panel 包含 5 对特异性寡核苷酸 (N1-F、N1-R、N2-F、N2-R、N3-F、N3-R、Orflab-F、Orflab-R、RDRP-F、RDRP-R)，特异性寡核苷酸的序列如表 4 所示；通用标签引物包含通用标签引物 F 和通用标签引物 R，通用标签引物 F 的核苷酸序列为：TGTGAGCCAAGGAGTT**ATCGGACCTA**ATTGTCTTCCTAAGACCGCTTGGCCTCCGACTT (其中，加粗部分 (SEQ ID NO.55) 为本实施例的通用标签引物 F 的标签序列，标签序列可以是随机的，也可以是提前设定的，比如表 2 中序列如 SEQ ID NO.56~62 所示的标签序列)；通用标签引物 F 的下划线部分和上游特异性寡核苷酸 3'端序列 (通用序列) 互补；通用标签引物 R 的核苷酸序列为：Phos-GAACGACATGGCTACGATCCGACTT，Phos 为磷酸化修饰，下划线部分和下游特异性寡核苷酸 3'端序列 (通用序列) 互补。

(2) PCR 反应

在 PCR 管中按照表 5 所示反应体系配置 RT-mPCR(Reverse transcript multiplex PCR)体系，进行 RT-mPCR 反应，反应程序如下：25℃ 10min；45℃ 15min；94℃ 5min；94℃ 30s，58℃ 2min，72℃ 30 s，40cycles；72℃ 5min；12℃ ∞，反应完后用 1.5X AMPure (贝克曼公司) 磁珠进行纯化，最后将纯化产物溶于 22μL 洗脱缓冲液，得到文库。

表 4 特异性寡核苷酸

名称	引物序列
N1-F	ATTT CGCT GATTTTGGGGTCA AGT TCGGAGG CCAAGCG (SEQ ID NO.17) - Phos
N1-R	CAGATTCA ACTGGCAGT AACCAGAA AGT TCG GATCGT AGCCATGT (SEQ ID NO.18) -Phos
N2-F	TTTGCGG CCAATG TTTGT AAAAGT TCG GAGG CCAAGCG (SEQ ID NO.19) - Phos
N2-R	TTCTTC GGAATG TCG CGAAGT TCG GATCGT AGCCATGT (SEQ ID NO.20) - Phos
N3-F	TTTTGGTGT ATTCAAGGCT CCCA AGT TCGGAGG CCAAGCG (SEQ ID NO.21) -Phos

N3-R	CAATGCTGCAATCGTGCTACAAAGT <u>CGGATCGTAGCCATGT</u> (SEQ ID NO.22) -Phos
Orflab-F	TTAAGTGTA ⁺ AAAACCCACAGGGAAGT <u>CGGAGGCCAAGCG</u> (SEQ ID NO.23) -Phos
Orflab-R	TCAGCTGATGCACAATCGTAAGT <u>CGGATCGTAGCCATGT</u> (SEQ ID NO.24) -Phos
RDRP-F	CCGCCACACATGACCATRTCAAAGT <u>CGGAGGCCAAGCG</u> (SEQ ID NO.25) -Phos
RDRP-R	TATGCTAAATAGTGTSTTTAACATYTAAGT <u>CGGATCGTAGCCATGT</u> (SEQ ID NO.26) -Phos

注：上述特异性寡核苷酸按照每条特异性寡核苷酸10μM浓度进行混合，得到总浓度为10μM的特异性寡核苷酸池；上述特异性寡核苷酸的3'端采用磷酸（phos）封闭，防止3'端延伸，下划线碱基为核糖核苷酸（切割位点），可以被Rnase HII识别并水解；上游特异性寡核苷酸（N1-F、N2-F、N3-F、Orflab-F、RDRP-F）的5'到3'端依次为：特异性序列和通用序列（加粗部分），加粗部分为与通用标签引物F的3'端互补的序列；下游特异性寡核苷酸（N1-R、N2-R、N3-R、Orflab-R、RDRP-R）的5'到3'端依次为：特异性序列和通用序列（加粗部分），加粗部分为与通用标签引物R的3'端互补的序列。

表5 RT-mPCR反应体系

RNA（4000 拷贝新冠标准品（Twist））	5μL
2×One-step Mix	15μL
One-step enzyme Mix（包含逆转录酶和耐高温 DNA 聚合酶）	1.0μL
N6 primer（100μM）	2.0μL
T4 DNA Polymerase (3U/μL)	1.0μL
Rnase HII	1.0μL
RNA-inhibitor	1.0μL
表 4 所示特异性寡核苷酸池（10μM）	2.0μL
通用标签引物 F（10μM）	1.0μL
通用标签引物 R（10μM）	1.0μL
总体积	30 μL

注：逆转录体系（2×One-step Mix、One-step enzyme Mix）来自诺唯赞公司，HiScript II One Step RT-PCR Kit，货号P611-01。Rnase HII 酶来自NEB公司，货号M0288S，RNA inhibitor 来自NEB公司，货号M0314S，T4 DNA Polymerase 来自NEB公司，货号M0203S。

对比例 1 EGFR 基因肿瘤热点基因的文库制备方法

EGFR 基因肿瘤热点基因的文库制备方法，包括如下步骤：

- （1）设计 EGFR 基因肿瘤热点基因捕获 panel，该 panel 包含 8 对引物（EGFR_1F~EGFR_8F，EGFR_1R~EGFR_8R），扩增子大小为 100~200bp，引物的序列如表 6 所示。
 - （2）PCR 反应
- 在 PCR 管中按照表 7 所示反应体系配置 mPCR（multiplex PCR）体系，进行 mPCR 反应，反应程序如

下: 94℃ 5min; 94℃ 30s, 58℃ 2min, 72℃ 30s, 27cycles; 72℃ 5min; 12℃ ∞, 反应完后用 1.5X AMPure (贝克曼公司) 磁珠进行纯化, 最后将纯化产物溶于 22μL 洗脱缓冲液, 得到文库。

表 6 引物

名称	序列 (5'-3')
EGFR_1F	TGTGAGCCAAGGAGTTGATCGGACCTATTGTCTTCCTAAGAC CGCTTGGCCTCCGACTTCACCACGTACCAGATGGATGT (SEQ ID NO.27)
EGFR_2F	TGTGAGCCAAGGAGTTGATCGGACCTATTGTCTTCCTAAGAC CGCTTGGCCTCCGACTTAGACATGCATGAACATTTTCTCCAC (SEQ ID NO.28)
EGFR_3F	TGTGAGCCAAGGAGTTGATCGGACCTATTGTCTTCCTAAGAC CGCTTGGCCTCCGACTTTGTGGAGCCTCTTACACCCA (SEQ ID NO.29)
EGFR_4F	TGTGAGCCAAGGAGTTGATCGGACCTATTGTCTTCCTAAGAC CGCTTGGCCTCCGACTTACGTCTTCCTTCTCTCTGTCA (SEQ ID NO.30)
EGFR_5F	TGTGAGCCAAGGAGTTGATCGGACCTATTGTCTTCCTAAGAC CGCTTGGCCTCCGACTTCATGCGAAGCCACACTGAC (SEQ ID NO.31)
EGFR_6F	TGTGAGCCAAGGAGTTGATCGGACCTATTGTCTTCCTAAGAC CGCTTGGCCTCCGACTTGACTATGTCCGGGAACACAAAGA (SEQ ID NO.32)
EGFR_7F	TGTGAGCCAAGGAGTTGATCGGACCTATTGTCTTCCTAAGAC CGCTTGGCCTCCGACTTCGCAGCATGTCAAGATCACAGAT (SEQ ID NO.33)
EGFR_8F	TGTGAGCCAAGGAGTTGATCGGACCTATTGTCTTCCTAAGAC CGCTTGGCCTCCGACTTCACCACGTACCAGATGGATGT (SEQ ID NO.34)
EGFR_1R	phos- GAACGACATGGCTACGATCCGACTTCCCAAAGACTCTCCAAG ATGGGATA (SEQ ID NO.35)
EGFR_2R	phos- GAACGACATGGCTACGATCCGACTTCCAGACCAGGGTGTTG TTTTC (SEQ ID NO.36)
EGFR_3R	phos- GAACGACATGGCTACGATCCGACTTGTGCCAGGGACCTTACCT TATAC (SEQ ID NO.37)
EGFR_4R	phos- GAACGACATGGCTACGATCCGACTTCTGAGGTTGAGAGCCAT GGA (SEQ ID NO.38)
EGFR_5R	phos-

	GAACGACATGGCTACGATCCGACTTCGGACATAGTCCAGGAG GCA (SEQ ID NO.39)
	phos-
EGFR_6R	GAACGACATGGCTACGATCCGACTTCCCCATGGCAA ACTCTTG CTA (SEQ ID NO.40)
	phos-
EGFR_7R	GAACGACATGGCTACGATCCGACTTGCATGTGT TAAACAATAC AGCTAGTG (SEQ ID NO.41)
	phos-
EGFR_8R	GAACGACATGGCTACGATCCGACTTCCCAA AGACTCTCCAAG ATGGGATA (SEQ ID NO.42)

注：上述引物按照每条引物 20μM 浓度进行混合，得到总浓度为 20μM 的引物池；下游引物的 5'端进行磷酸化修饰；上游引物（EGFR_1F~EGFR_8F）的 5' 到 3' 端依次为：通用序列（加粗部分）和特异性序列，加粗部分与实施例 1 中的通用标签引物 F 序列相同；下游引物（EGFR_1R~EGFR_8R）的 5' 到 3' 端依次为：通用序列（加粗部分）和特异性序列，加粗部分与实施例 1 中的通用标签引物 R 的序列相同，即上述引物与实施例 1 中的特异性寡核苷酸与通用标签引物逆转录反应得到的产物的序列相同。

表 7 mPCR 体系

gDNA (10ng NA12878 gDNA 或 FFPE 标准品 HD200 DNA (Horizon 公司) 或水 (阴性对照))	18μL
2×KAPA2G Fast ReadyMix	25μL
表 6 所示引物池 (20μM)	1.0μL
蒸馏水	6μL
总体积	50 μL

对比例 2 新冠 SARS-COV-2 基因的文库制备方法

新冠 SARS-COV-2 基因的文库制备方法，包括如下步骤：

(1) 设计新冠 SARS-COV-2 基因捕获 panel 以及通用标签引物，该 panel 包含 5 对特异性寡核苷酸（N1-F、N1-R、N2-F、N2-R、N3-F、N3-R、Orflab-F、Orflab-R、RDRP-F、RDRP-R），特异性寡核苷酸的序列如表 8 所示；通用标签引物包含通用标签引物 F 和通用标签引物 R，通用标签引物 F 的核苷酸序列为：TGTGAGCCAAGGAGTT**ATCGGACCTA**TTGTCTTCCTAAGACCGCTTGGCCTCCGACTT（其中，加粗部分（SEQ ID NO.55）为本对比例的通用标签引物 F 的标签序列，标签序列可以是随机的，也可以是提前设定的，比如表 2 中序列如 SEQ ID NO.56~62 所示的标签序列）；通用标签引物 F 的下划线部分和上游特异性寡核苷酸 5'端序列（通用序列）相同；通用标签引物 R 的核苷酸序列为：Phos-GAACGACATGGCTACGATCCGACTT，Phos 为磷酸化修饰，下划线部分和下游特异性寡核苷酸 5'端序列（通用序列）相同。

(2) RT 反应

在 PCR 管中按照表 9 所示反应体系配置 RT 反应体系，进行 RT 反应，反应程序如下：25℃ 10min，42℃ 20min，85℃，10min，得到 RT 反应产物。

(3) 第一轮 PCR

在 PCR 管中按照表 10 所示反应体系配置第一轮 PCR 反应体系，进行 PCR 反应，反应程序如下：94℃ 1min；94℃ 30s，58℃ 2min，72℃ 30 s，15cycles；72℃ 5min；12℃ ∞，反应完后用 1.5X AMPure（贝克曼公司）磁珠进行纯化，最后将纯化产物溶于 22μL 洗脱缓冲液，得到第一轮 PCR 产物。

(4) 第二轮 PCR

在 PCR 管中按照表 11 所示反应体系配置第二轮 PCR 反应体系，进行 PCR 反应，反应程序如下：94℃ 1min；94℃ 30s，58℃ 2min，72℃ 30 s，25cycles；72℃ 5min；12℃ ∞，反应完后用 1.0X AMPure（贝克曼公司）磁珠进行纯化，最后将纯化产物溶于 22μL 洗脱缓冲液，得到文库。

表 8 引物

名称	引物序列
N1-F	CGCTTGGCCTCCGACTT GACCCCAAATCAGCGAAAT (SEQ ID NO.43)
N1-R	ACATGGCTACGATCCGACTTTCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG (SEQ ID NO.44)
N2-F	CGCTTGGCCTCCGACTT ATTACAAACATTGGCCGCAAA (SEQ ID NO.45)
N2-R	ACATGGCTACGATCCGACTT CGCGACATTCCGAAGAA (SEQ ID NO.46)
N3-F	CGCTTGGCCTCCGACTT GGGAGCCTTGAATACACCAAAA (SEQ ID NO.47)
N3-R	ACATGGCTACGATCCGACTTTGTAGCACGATTGCAGCATTG (SEQ ID NO.48)
Orflab-F	CGCTTGGCCTCCGACTT CCCTGTGGGTTTTACACTTAA (SEQ ID NO.49)
Orflab-R	ACATGGCTACGATCCGACTT ACGATTGTGCATCAGCTGA (SEQ ID NO.50)
RDRP-F	CGCTTGGCCTCCGACTTTGARATGGTCATGTGTGGCGG (SEQ ID NO.51)
RDRP-R	ACATGGCTACGATCCGACTT ARATGTTAAASACACTATTAGCATA (SEQ ID NO.52)

注：上述引物按照每引物10μM浓度进行混合，得到总浓度为10μM的引物池；上游引物（N1-F、N2-F、N3-F、Orflab-F、RDRP-F）的5’到3’端依次为：通用序列（加粗部分）和特异性序列，加粗部分为与通用标签引物F的3’端相同的序列；下游特异性寡核苷酸（N1-R、N2-R、N3-R、Orflab-R、RDRP-R）的5’到3’端依次为：通用序列（加粗部分）和特异性序列，加粗部分为与通用标签引物R的3’端相同的序列。

表9 RT反应体系

RNA（4000 拷贝新冠标准品（Twist））	6 μL
5x 逆转录缓冲液	4μL
N6 引物（100μM）	2.0μL
M-MLV	1.0μL
RNA-inhibitor	1.0μL

蒸馏水	6μL
总体积	20 μL

注：逆转录体系来自诺唯赞公司，M-MLV (H-) Reverse Transcriptase，货号R021-01。

表 10 第一轮 PCR 反应体系

RT 反应产物	20μL
2 X KAPA2G Fast ReadyMix	25μL
表 7 所示引物池（10μM）	5.0μL
总体积	50 μL

表 11 第二轮 PCR 反应体系

第一轮 PCR 产物	20μL
2 X KAPA2G Fast ReadyMix	25μL
通用标签引物 F（10μM）	2.5μL
通用标签引物 R（10μM）	2.5μL
总体积	50 μL

效果实施例 1 EGFR 基因肿瘤热点基因的高通量测序方法

下述效果实施例是基于华大基因的测序仪 MGISEQ-2000 平台；使用的试剂均来源于该测序仪配套使用的建库试剂盒以及双端测序试剂盒(以下简称 PE100 试剂盒)，下述效果实施例中采用的是 PE100 的测序读长；过程中用到的测序仪、试剂操作等过程参照该平台的使用方法，最后进行数据分析，包括数据利用率、唯一比对比例、目标区域数据比例等性能（分析方法参考文献：Campbell, Nathan R., Stephanie A. Harmon, and Shawn R. Narum. "Genotyping - in - Thousands by sequencing (GT - seq): A cost effective SNP genotyping method based on custom amplicon sequencing." *Molecular ecology resources* 15.4 (2015): 855-867.），具体如下：

- 1) 文库制备：实施例 1 或对比例 1 的文库制备方法；
- 2) 文库质检：得到的产物进行定量和条带大小质检；
- 3) 上机测序：得到的文库在华大智造 MGISEQ-2000 平台上进行上机测序，上机类型 PE100；
- 4) 数据分析：得到的下机数据采用 BWA 软件比对到人参考基因组 (hg19)，使用 samtools 对比对率、特异性、均一性进行统计，最后采用 GATK 软件进行突变分析。

实施例 1、对比例 1 得到的文库的测序数据统计如表 12 所示、实施例 1 的突变检测统计数据如表 13 所示：实施例 1、对比例 1 得到的文库的测序数据中的数据利用率、唯一比对比例、目标区域数据比例相当；实施例 1、对比例 1 的突变频率的检测值与理论值相当；即采用本发明的方法（实施例 1）可以达到对照方法（对比例 1）的性能，与对照方法相同，本发明方法只需要一步 PCR 即可完成文库的制备，但是本发明方法无需提前合成包含完整测序接头和样本标签序列的长链引物，克服了以下弊端：1) 引物准确性下降；2) 引物成本增加；本发明方法可以实现长链引物合成，并且可以在一步完成目标区域的富集和文库的制备（图 4）。

表 12 测序数据统计

样本-实施例	原始数据	可用数据	数据利用率	唯一比对数据	唯一比对比例	目标区域数据	目标区域数据比例
NA-实施例 1	459342	456127	99.3%	455670	99.9%	454303	99.7%
NA-对比例 1	586761	581480	99.1%	580899	99.9%	579156	99.7%
HD-实施例 1	451251	448092	99.3%	447644	99.9%	446301	99.7%
HD-对比例 1	643327	639467	99.4%	638828	99.9%	636911	99.7%

表 13 突变检测统计

标准品信息			阴性对照检测结果		标准品检测结果	
基因	突变	理论突变频率	实施例 1	对比例 1	实施例 1	对比例 1
EGFR	L858R	3.00%	0.1%	0.0%	3.3%	3.1%
EGFR	G719S	24.50%	0.0%	0.0%	23.6%	20.7%
EGFR	ΔE746 - A750	2.00%	0.1%	0.1%	2.2%	2.1%

效果实施例 2 新冠 SARS-COV-2 基因的高通量测序方法

下述效果实施例是基于华大基因的测序仪 MGISEQ-2000 平台；使用的试剂均来源于该测序仪配套使用的建库试剂盒以及双端测序试剂盒(以下简称 PE100 试剂盒)，下述效果实施例中采用的是 PE100 的测序读长；过程中用到的测序仪、试剂操作等过程参照该平台的使用方法，最后进行数据分析，包括数据利用率、唯一比对比例、目标区域数据比例等性能（分析方法参考文献：Campbell, Nathan R., Stephanie A. Harmon, and Shawn R. Narum. "Genotyping - in - Thousands by sequencing (GT - seq): A cost effective SNP genotyping method based on custom amplicon sequencing." *Molecular ecology resources* 15.4 (2015): 855-867.），具体如下：

- 1) 文库制备：实施例 2 或对比例 2 的文库制备方法；
- 2) 文库质检：得到的产物进行定量和条带大小质检；
- 3) 上机测序：得到的文库在华大智造 MGISEQ-2000 平台上进行上机测序，上机类型 PE100；
- 4) 数据分析：得到的下机数据采用 BWA 软件比对到 wuhan-01 参考毒株，使用 samtools 进行统计。

实施例 2、对比例 2 得到的文库的测序数据统计如表 14 所示：实施例 2、对比例 2 得到的文库的测序数据中的数据利用率、唯一比对比例、目标区域数据比例相当；即采用本发明的方法（实施例 2）可以达到对照方法（对比例 2）的性能，数据质量相当；但是本发明方法只需要一步 PCR 即可完成 RNA 靶向文库的制备，可以实现长链引物合成，并且可以兼容 RT 体系，可以在一步反应完成逆转录、目标区域的富集和文库的制备（图 4）。

表 14 测序数据统计

样本-实施例	原始数据	可用数据	数据利用率	比对率（唯一比对比例）	上靶率（目标区域数据比例）
--------	------	------	-------	-------------	---------------

新冠标准品 (Twist)- 实施例 2	132,241	131,221	99.2%	99.3%	99.3%
新冠标准品 (Twist) - 对比例 2	145,561	144,321	99.1%	99.1%	99.2%

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. 寡核苷酸组合, 包含: 特异性寡核苷酸和通用引物;
所述通用引物包含: 第一通用引物和第二通用引物;
所述特异性寡核苷酸包含: 上游特异性寡核苷酸和下游特异性寡核苷酸; 其中,
所述上游特异性寡核苷酸从 5'端到 3'端依次包含: 上游特异性序列和第一通用序列;
所述下游特异性寡核苷酸从 5'端到 3'端依次包含: 下游特异性序列和第二通用序列;
1)所述第一通用引物的 3'端序列与所述上游特异性寡核苷酸的第一通用序列的部分序列或全部序列互补, 所述第二通用引物的 3'端序列与所述下游特异性寡核苷酸的第二通用序列的部分序列或全部序列互补; 或
2) 所述第二通用引物的 3'端序列与所述上游特异性寡核苷酸的第一通用序列的部分序列或全部序列互补, 所述第一通用引物的 3'端序列与所述下游特异性寡核苷酸的第二通用序列的部分序列或全部序列互补;
所述上游特异性寡核苷酸的序列包含一个或多个可以被特异性切割剂切割的切割位点;
所述下游特异性寡核苷酸的序列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 所述的寡核苷酸组合, 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-亚乙烯基腺嘌呤 DNA 糖基化酶))中的至少一种;
优选地, 所述上游特异性寡核苷酸和下游特异性寡核苷酸中所述的特异性切割剂可以相同或不同;
优选地, 所述上游特异性寡核苷酸中的多个特异性切割剂可以相同或不同;
优选地, 所述下游特异性寡核苷酸中的多个特异性切割剂可以相同或不同。
3. 根据权利要求 2 所述的寡核苷酸组合, 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(rNTP, 例如: rATP、rGTP、tCTP、rUTP);
c2)尿嘧啶脱氧核糖核苷酸(dUTP);
优选地, 所述上游特异性寡核苷酸和下游特异性寡核苷酸中所述的切割位点可以相同或不同;
优选地, 所述上游特异性寡核苷酸中的多个切割位点可以相同或不同;
优选地, 所述下游特异性寡核苷酸中的多个切割位点可以相同或不同。
4. 根据权利要求 3 所述的寡核苷酸组合, 其特征在于:
所述酶促切割剂选自核糖核酸酶 H、UDG 中的至少一种;
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 所述的寡核苷酸组合, 其特征在于:
所述上游特异性寡核苷酸的序列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 3~9 个; 其中, $n=N/10$, N 为上游特异性寡核苷酸的核苷酸个数; 和/或
所述下游特异性寡核苷酸的序列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 3~9 个; 其中, $n=N/10$, N 为下游特异性寡核苷酸的核苷酸个数;

- 优选地，所述上游特异性寡核苷酸的上游特异性序列的核苷酸个数为 15~45；
- 优选地，所述上游特异性寡核苷酸的第一通用序列的核苷酸个数为 15~45；
- 优选地，所述上游特异性寡核苷酸的核苷酸个数为 30~90；
- 优选地，所述下游特异性寡核苷酸的下游特异性序列的核苷酸个数为 15~45；
- 优选地，所述下游特异性寡核苷酸的第二通用序列的核苷酸个数为 15~45；
- 优选地，所述下游特异性寡核苷酸的核苷酸个数为 30~90；
- 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特异性寡核苷酸中随机分布；
- 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特异性寡核苷酸中随机分布。
6. 根据权利要求 1 所述的寡核苷酸组合，其特征在于：
- 所述第一通用引物包含功能核酸序列；
- 优选地，所述第一通用引物包含测序引物序列或测序引物互补序列；
- 优选地，所述第一通用引物还包含第一标签序列。
7. 根据权利要求 1 所述的寡核苷酸组合，其特征在于：
- 所述第二通用引物包含功能核酸序列；
- 优选地，所述第二通用引物包含测序引物序列或测序引物互补序列；
- 优选地，所述第二通用引物还包含第二标签序列；
- 优选地，所述第一标签序列、第二标签序列相同或不同。
8. 根据权利要求 1 所述的寡核苷酸组合，其特征在于：
- 所述第一通用序列、第二通用序列各自独立选自部分测序接头序列、全部测序接头序列、测序引物结合序列、任意固定序列（比如包含酶切位点）；
- 优选地，所述第一通用序列与所述第二通用序列相同或不同。
9. 根据权利要求 1~8 任一项所述的寡核苷酸组合，其特征在于：
- 所述上游特异性寡核苷酸的 3' 端进行阻断修饰；和/或
- 所述下游特异性寡核苷酸的 3' 端进行阻断修饰；
- 优选地，所述阻断修饰包含：磷酸化修饰、间臂修饰、氨基修饰中的至少一种；
- 优选地，所述上游特异性寡核苷酸和所述下游特异性寡核苷酸的阻断修饰相同或不同；
- 优选地，所述特异性寡核苷酸中的上游特异性序列和下游特异性序列分别与待测目标区域的两个区段相同或互补；
- 优选地，所述第一通用引物的 5' 端含有磷酸基团；和/或
- 所述第二通用引物的 5' 端含有磷酸基团；
- 优选地，所述特异性寡核苷酸包含多对特异性寡核苷酸；进一步包含多组靶向不同的待测目标区域的多对特异性寡核苷酸；
- 优选地，所述通用引物包含多对通用引物。
10. 一种试剂盒，包含权利要求 1~9 任一项所述的寡核苷酸组合；
- 所述试剂盒还包含：逆转录酶和 DNA 聚合酶中的至少一种；
- 优选地，所述试剂盒还包含：权利要求 1~9 任一项中的特异性切割剂；
- 优选地，所述试剂盒还包含：逆转录引物。
11. 根据权利要求 10 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；
优选地，所述核酸吸附物包含磁珠、吸附膜中的至少一种。
12. 一种多重 PCR 扩增方法，其特征在于：利用权利要求 1~9 任一项所述的寡核苷酸组合对核酸进行多重 PCR 反应；所述反应的步骤包括：
通用引物延伸反应，并切割互补链，生成 PCR 反应引物；
利用 PCR 反应引物进行扩增反应；
优选地，所述延伸反应和扩增反应在同一体系中进行。
13. 根据权利要求 12 所述的多重 PCR 扩增方法，其特征在于：
所述核酸为 RNA 时，所述多重 PCR 反应前还包含：逆转录反应；
优选地，所述逆转录反应与所述多重 PCR 反应在同一体系或不在同一体系中进行；
优选地，所述同一体系具体为在同一反应体系中进行。
14. 一种构建靶向文库的方法，包含权利要求 12~13 任一项所述的多重 PCR 扩增方法的步骤，得到测序文库。
15. 根据权利要求 14 所述的方法，其特征在于：
得到测序文库前还可以包括环化反应；
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。

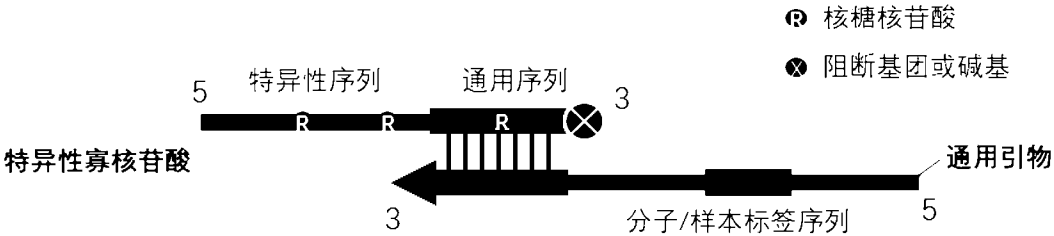


图 1

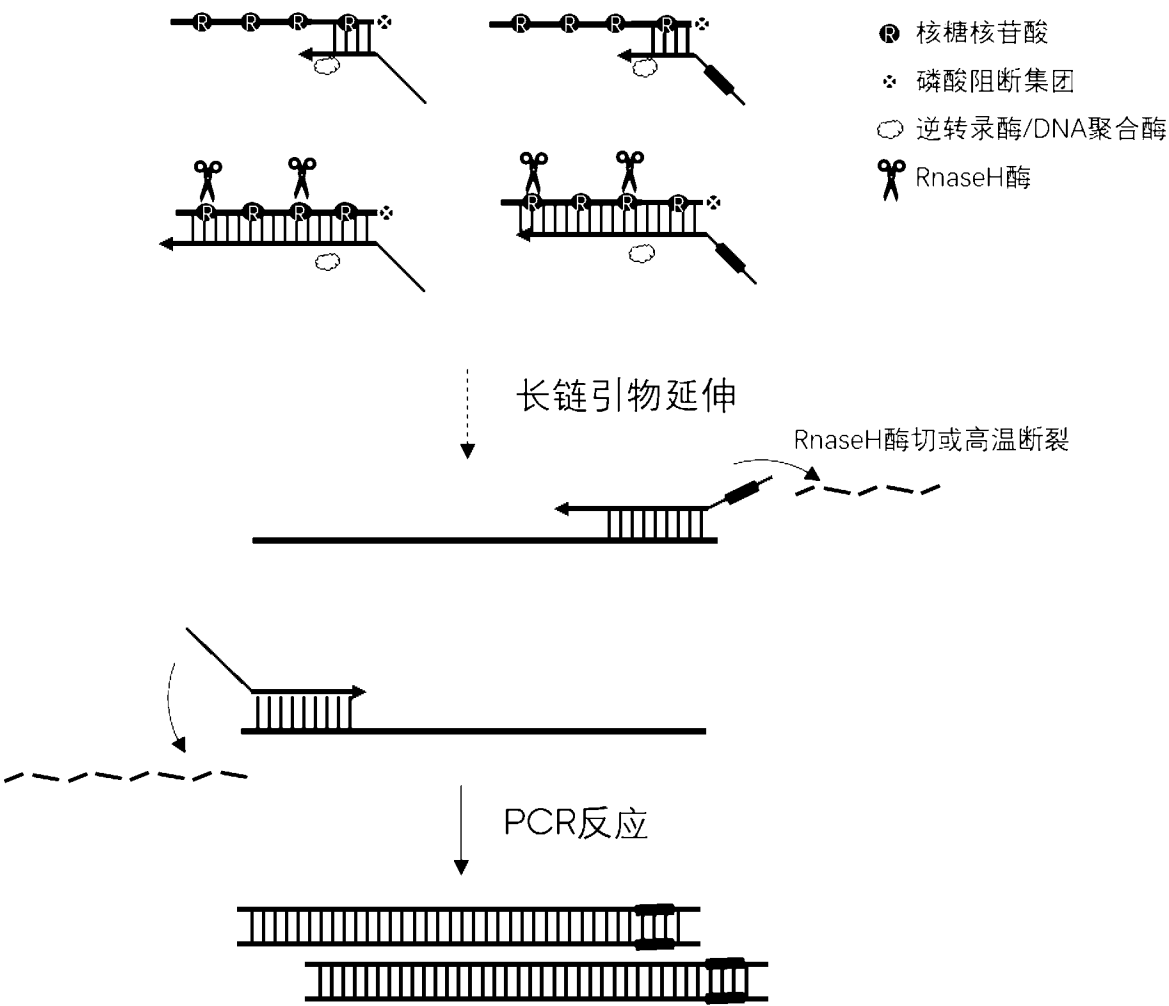


图 2

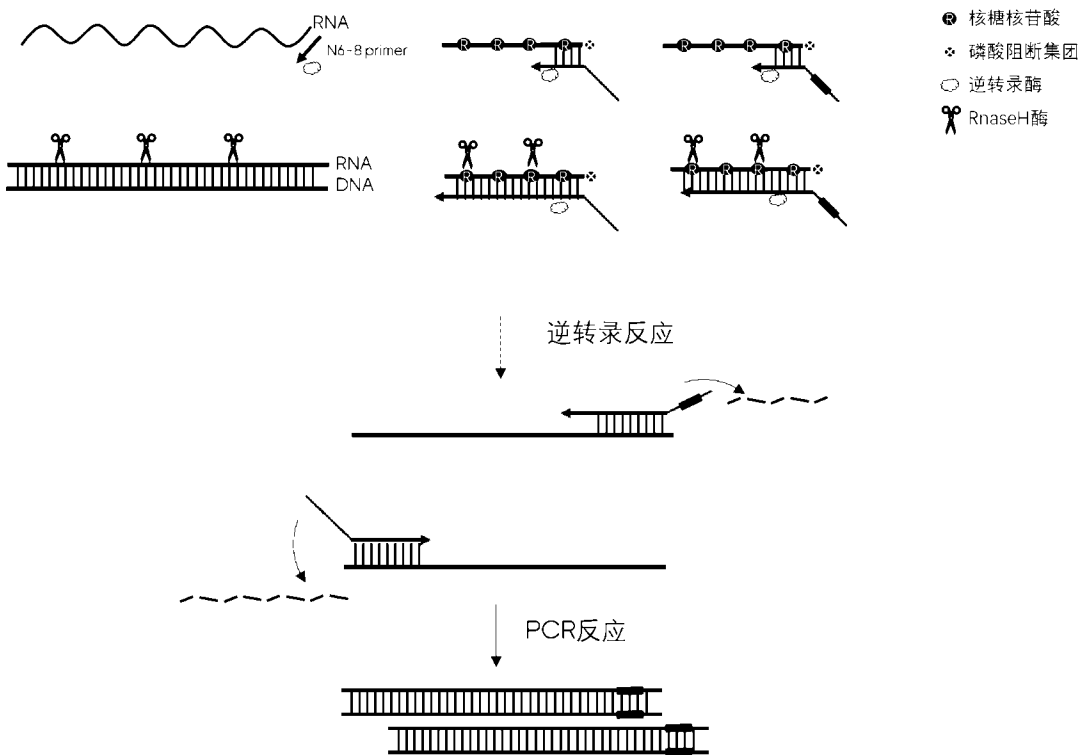


图 3

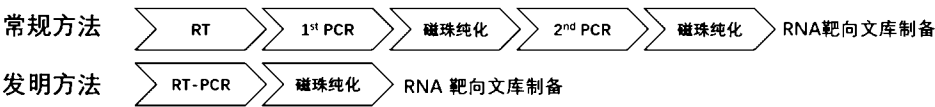


图 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/101079

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/686(2018.01)i; C12Q1/6806(2018.01)i; C12N9/22(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, 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, ENTXT, CJFD, CNKI, Web of Science, Elsevier Science, PubMed, 百度学术搜索, BAIDU SCHOLAR SEARCH: PCR, 多重, 引物, 特异性, 寡核苷酸, 通用序列, 通用引物, 互补, 切割, 切割位点, 测序, 文库, multiplex, primer, specific, oligonucleotide, universal sequence, universal primer, complement, cleavage, cleavable site, sequencing, library

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 107406891 A (SALISBURY NHS FOUNDATION TRUST) 28 November 2017 (2017-11-28) see claims 1-26, and description, paragraphs 1, 9, 23 and 55	1, 2, 6-15
Y	CN 107406891 A (SALISBURY NHS FOUNDATION TRUST) 28 November 2017 (2017-11-28) see claims 1-26, and description, paragraphs 1, 9, 23 and 55	3-5
Y	US 2018057868 A1 (INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES, INC.) 01 March 2018 (2018-03-01) see abstract, description, paragraph 8, and claims 1-3	3-5
A	US 2021087607 A1 (CHROMACODE, INC.) 25 March 2021 (2021-03-25) see description, paragraph 42	1-15
A	CN 113811618 A (MGI TECH CO., LTD.) 17 December 2021 (2021-12-17) see abstract	1-15

☒ 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

14 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/CN2023/101079**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2021180121 A1 (SWIFT BIOSCIENCES, INC.) 17 June 2021 (2021-06-17) see claim 1	1-15
A	WO 2020165180 A1 (BIOCARTIS N. V.) 20 August 2020 (2020-08-20) see claim 1	1-15
A	WO 2020258084 A1 (MGI TECH CO., LTD.) 30 December 2020 (2020-12-30) see claims 1-2	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/101079

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/CN2023/101079

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	107406891	A	28 November 2017	CA	3017443	A1	22 September 2016
				HK	1244036	A1	27 July 2018
				WO	2016146968	A1	22 September 2016
				GB	201504464	D0	29 April 2015
				GB	2536446	A	21 September 2016
				GB	2536446	B	03 June 2020
				AU	2016231995	A1	12 October 2017
				AU	2016231995	B2	15 July 2021
				US	2018073053	A1	15 March 2018
				US	11499182	B2	15 November 2022
				EP	3271475	A1	24 January 2018
				JP	2018507706	A	22 March 2018
				JP	6940412	B2	29 September 2021
US	2018057868	A1	01 March 2018	WO	2018044831	A1	08 March 2018
				US	10858699	B2	08 December 2020
US	2021087607	A1	25 March 2021	EP	4083229	A1	02 November 2022
				US	2019112636	A1	18 April 2019
				EP	3697931	A1	26 August 2020
				EP	3697931	A4	13 October 2021
				WO	2019079204	A1	25 April 2019
				CA	3077390	A1	25 April 2019
CN	113811618	A	17 December 2021	None			
US	2021180121	A1	17 June 2021	WO	2020041702	A1	27 February 2020
				EP	3841219	A1	30 June 2021
				EP	3841219	A4	04 May 2022
WO	2020165180	A1	20 August 2020	EP	3924512	A1	22 December 2021
				EP	3924512	B1	12 July 2023
				US	2022195510	A1	23 June 2022
WO	2020258084	A1	30 December 2020	KR	20220011725	A	28 January 2022
				JP	2022537284	A	25 August 2022
				JP	7281565	B2	25 May 2023
				WO	2020258084	A9	04 February 2021
				CA	3140403	A1	30 December 2020
				EP	3992303	A1	04 May 2022
				EP	3992303	A4	15 March 2023
				AU	2019453690	A1	06 January 2022
				US	2022235414	A1	28 July 2022

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2023/101079
A. 主题的分类 C12Q1/686(2018.01)i; C12Q1/6806(2018.01)i; C12N9/22(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, 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, ENTXT, CJFD, CNKI, Web of Science, Elsevier Science, PubMed, 百度学术搜索: PCR, 多重, 引物, 特异性, 寡核苷酸, 通用序列, 通用引物, 互补, 切割, 切割位点, 测序, 文库, multiplex, primer, specific, oligonucleotide, universal sequence, universal primer, complement, cleavage, cleavable site, sequencing, library		
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 107406891 A (索尔兹伯里NHS信托基金会) 2017年11月28日 (2017 - 11 - 28) 参见权利要求1-26, 说明书第1、9、23和55段	1, 2, 6-15
Y	CN 107406891 A (索尔兹伯里NHS信托基金会) 2017年11月28日 (2017 - 11 - 28) 参见权利要求1-26, 说明书第1、9、23和55段	3-5
Y	US 2018057868 A1 (INTEGRATED DNA TECH 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	3-5
A	US 2021087607 A1 (CHROMACODE INC) 2021年3月25日 (2021 - 03 - 25) 参见说明书第42段	1-15
A	CN 113811618 A (深圳华大智造科技股份有限公司) 2021年12月17日 (2021 - 12 - 17) 参见说明书摘要	1-15
A	US 2021180121 A1 (SWIFT BIOSCIENCES INC) 2021年6月17日 (2021 - 06 - 17) 参见权利要求1	1-15
☒ 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14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

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
A	WO 2020165180 A1 (BIOCARTIS NV) 2020年8月20日 (2020 - 08 - 20) 参见权利要求1	1-15
A	WO 2020258084 A1 (MGI TECH CO LTD) 2020年12月30日 (2020 - 12 - 30) 参见权利要求1-2	1-15

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/CN2023/101079

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	107406891	A	2017年11月28日	CA	3017443	A1	2016年9月22日
				HK	1244036	A1	2018年7月27日
				WO	2016146968	A1	2016年9月22日
				GB	201504464	D0	2015年4月29日
				GB	2536446	A	2016年9月21日
				GB	2536446	B	2020年6月3日
				AU	2016231995	A1	2017年10月12日
				AU	2016231995	B2	2021年7月15日
				US	2018073053	A1	2018年3月15日
				US	11499182	B2	2022年11月15日
				EP	3271475	A1	2018年1月24日
				JP	2018507706	A	2018年3月22日
				JP	6940412	B2	2021年9月29日
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	2021087607	A1	2021年3月25日	EP	4083229	A1	2022年11月2日
				US	2019112636	A1	2019年4月18日
				EP	3697931	A1	2020年8月26日
				EP	3697931	A4	2021年10月13日
				WO	2019079204	A1	2019年4月25日
				CA	3077390	A1	2019年4月25日
CN	113811618	A	2021年12月17日	无			
US	2021180121	A1	2021年6月17日	WO	2020041702	A1	2020年2月27日
				EP	3841219	A1	2021年6月30日
				EP	3841219	A4	2022年5月4日
WO	2020165180	A1	2020年8月20日	EP	3924512	A1	2021年12月22日
				EP	3924512	B1	2023年7月12日
				US	2022195510	A1	2022年6月23日
WO	2020258084	A1	2020年12月30日	KR	20220011725	A	2022年1月28日
				JP	2022537284	A	2022年8月25日
				JP	7281565	B2	2023年5月25日
				WO	2020258084	A9	2021年2月4日
				CA	3140403	A1	2020年12月30日
				EP	3992303	A1	2022年5月4日
				EP	3992303	A4	2023年3月15日
				AU	2019453690	A1	2022年1月6日
				US	2022235414	A1	2022年7月28日