

(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
2020 年 6 月 25 日 (25.06.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/124472 A1

(51) 国际专利分类号:
C12Q 1/686 (2018.01) *C40B 50/06* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/122275

(22) 国际申请日: 2018 年 12 月 20 日 (20.12.2018)

(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)。 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)。 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)。 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)。 蒋慧 (JIANG, Hui); 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: 深圳鼎合诚知识产权代理有限公司 (DHC IP ATTORNEYS); 中国广东省深圳市福田区金田路与福华路交汇处现代商务大厦 2201, Guangdong 518048 (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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

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

(54) Title: PCR PRIMER, PCR AMPLIFICATION METHOD AND USE THEREOF

(54) 发明名称: PCR 引物及 PCR 扩增方法和用途

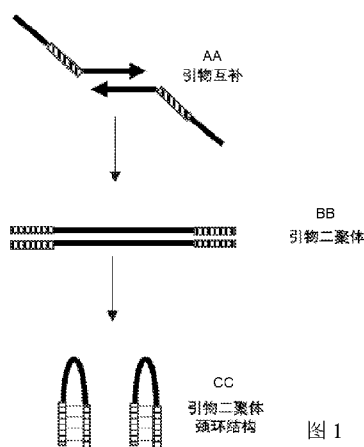


图 1

(57) Abstract: Disclosed is a PCR primer, a PCR amplification method and a use thereof. A forward primer and a reverse primer of the primer comprise an identical fixed sequence, and the forward primer and the reverse primer each comprise a specific primer sequence that is different from the other. The primer of the present invention employs the fixed sequence to cause primer dimer to inhibit cervical-loop structures formed by itself, such that the cervical-loop structures can be used as a template for subsequent PCR amplification, greatly reducing the primer dimer during the PCR process.

(57) 摘要: 一种 PCR 引物及 PCR 扩增方法和用途, 引物中正向引物和反向引物都包括一段相同的固定序列, 并且正向引物和反向引物各自包括一段彼此不同的特异性引物序列。本发明的引物通过固定序列使引物二聚体的自身形成颈环结构抑制其作为模板进行后续的 PCR 扩增, 大大降低了 PCR 过程中的引物二聚体。

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))。

PCR 引物及 PCR 扩增方法和用途

技术领域

本发明涉及 PCR 扩增技术领域，具体涉及一种 PCR 引物及 PCR 扩增方法和用途。

背景技术

后基因组时代，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。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。两者通过多重探针或者引物对感兴趣的基因区域一次性捕获，结合高通量测序技术，多样本同时测序，得到目标区域的序列信息。相对于全基因组测序，目标捕获测序技术在大样本量筛查的同时极大地降低成本。但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，适用于孟德尔遗传性疾病的筛查和诊断、GWAS 候选区段重测序、QTL 定位区段重测序、精准医疗研究与应用。

高通量 SNP 检测服务结合多重 PCR 和高通量测序技术，对需要检测的位点设计特异性引物，在单管内进行多重 PCR 扩增，不同的样本以不同的标签（barcode）引物区分。混合样本后，在测序平台上，对扩增子进行测序，测序结果使用生物信息学方法，区分不同样本，最终获得每个位点的 SNP 信息。本方法适用于不同目的遗传学研究，例如疾病基因组研究、肿瘤基因组研究、疾病与基因的关联研究、临床分子诊断等，在植物基因组研究中，可用于 QTL 定位及分子育种，非常适合大规模样本的 SNP 分析。虽然其实验操作简单、单个检测成本很低，但其在实验前期需要对多对引物进行反复测试优化，费时费力。特别是在超高重的 PCR 中，引物序列的复杂性使得引物很容易形成引物二聚体。引物二聚体的形成会急剧消耗 PCR 反应体系中的原料，导致 PCR 很快达到平台期；形成的引物二聚体在后续的测序中也会被测序，形成无效数据，影响数据的利用效率。最严重的是那些容易形成引物二聚体的引物，会严重影响该引物对应的目标扩增区域的扩增效率，导致该目标测序深度低，最终影响整个扩增体系的均一性。可以毫不夸张地说，引物二聚体决定了多重 PCR 靶向捕获测序好坏。

Paragon 公司的 Clean Plex 二聚体消除技术，采用特定的酶消除多重 PCR 过程中的引物二聚体。该方法本身无法减少引物二聚体，其方法是在引物二聚体产生之后采用酶的方式进行消化。首先该方法采用事后去除引物二聚体的方式，其多重 PCR 过程中产生的引物二聚体是会极大地影响 PCR 扩增的效率和均一性，其次该方法需额外采用一步消化步骤，操作比较繁琐。

发明内容

本发明提供一种 PCR 引物及 PCR 扩增方法和用途，通过引物二聚体的自身颈环结构抑制其作为模板进行后续的 PCR 扩增，大大降低了多重 PCR 过程中的引物二聚体。

根据第一方面，一种实施例中提供一种 PCR 的引物对，该引物对中正向引物和反向引物都包括一段相同的固定序列，并且正向引物和反向引物各自包括一段彼此不同的特异性引物序列。

在优选实施例中，上述固定序列位于所述特异性引物序列的 5'端。

在优选实施例中，上述正向引物和反向引物还各自包括一段接头序列。

在优选实施例中，上述每条引物从 5'端至 3'端依次包括：上述接头序列、上述固定序列和上述特异性引物序列；或上述固定序列、上述接头序列和上述特异性引物序列。

在优选实施例中，上述固定序列的长度是 15-40nt，更优选 18-26nt。

在优选实施例中，上述固定序列的 Tm 值为 55-65℃。

根据第二方面，一种实施例中提供一种用于多重 PCR 的引物组合，该引物组合包括多对引物，上述多对引物中至少部分引物对的正向引物和反向引物都包括一段相同的固定序列，并且不同的引物各自包括一段彼此不同的特异性引物序列。

在优选实施例中，上述多对引物全部都包括一段相同的固定序列。

在优选实施例中，上述固定序列位于上述特异性引物序列的 5'端。

在优选实施例中，上述引物还各自包括一段接头序列。

在优选实施例中，所有成对引物中的正向引物的上述接头序列相同，且所有成对引物中的反向引物的上述接头序列相同。

在优选实施例中，每条上述引物从 5'端至 3'端依次包括：上述接头序列、上述固定序列和上述特异性引物序列；或上述固定序列、上述接头序列和上述特异性引物序列。

在优选实施例中，上述固定序列的长度是 15-40nt。

在优选实施例中，上述固定序列的长度是 18-26nt。

在优选实施例中，上述固定序列的 Tm 值为 55-65℃。

在优选实施例中，上述固定序列的 Tm 值为 60℃。

在优选实施例中，上述引物组合包括 SEQ ID NO: 1-34 所示的序列。

根据第三方面，一种实施例中提供一种 PCR 扩增方法，该方法包括使用第一方面的引物对或第二方面的引物组合进行 PCR 扩增。

在优选实施例中，上述方法还包括使用通用引物对上述 PCR 扩增的产物进一步扩增。

根据第四方面，一种实施例中提供一种第一方面的引物对或第二方面的引物组合在通过 PCR 扩增进行目标区域捕获中的用途。

根据第五方面，一种实施例中提供一种降低 PCR 扩增中的引物二聚体的方法，该方法包括：使用第一方面的引物对或第二方面的引物组合进行 PCR 扩增，以使产生的引物二聚体在后续变性退火过程中每个引物二聚体中的上述固定序列彼此结合形成颈环结构，以阻止其进行后续的 PCR 反应。

根据第六方面，一种实施例中提供一种目标区域捕获方法，该方法包括：使用第一方面的引物对或第二方面的引物组合进行 PCR 扩增。

根据第七方面，一种实施例中提供一种文库构建方法，该方法包括：使用第一方面的引物对或第二方面的引物组合进行 PCR 扩增。

本发明的引物对或引物组合中的引物包括一段相同的固定序列，在 PCR 的过程中，如果引物之间产生二聚体，其二聚体产物会存在一段互补的序列，由于二聚体的长度一般很短，在后续的变性退火中该序列自身会迅速结合，形成颈环结构，会阻止其进行后续的 PCR 反应，而对于正常的特异性产物，虽然其结构也会存在一段互补的序列，但是这段互补的序列相距足够长，很难形成颈环结构，通过两种退火的差异来达到对引物二聚体的抑制。因此，使用

本发明的引物组合进行 PCR 扩增大大降低了 PCR 过程中的引物二聚体。

附图说明

- 图 1 为本发明实施例中引物二聚体抑制结构示意图；
- 图 2 为本发明实施例中二代测序文库制备引物二聚体抑制示意图；
- 图 3 为本发明实施例中测序文库特异性引物结构示意图；
- 图 4 为常规方法测序文库 Agilent 2100 检测结果图；
- 图 5 为本发明实施例中测序文库 Agilent 2100 检测结果图；
- 图 6 为本发明方法和常规方法过滤掉引物二聚体的比例。

具体实施方式

下面通过具体实施方式结合附图对本发明作进一步详细说明。在以下的实施方式中，很多细节描述是为了使得本发明能被更好的理解。然而，本领域技术人员可以毫不费力的认识到，其中部分特征在不同情况下是可以省略的，或者可以由其他材料、方法所替代。

另外，说明书中所描述的特点、操作或者特征可以以任意适当的方式结合形成各种实施方式。同时，方法描述中的各步骤或者动作也可以按照本领域技术人员所能显而易见的方式进行顺序调换或调整。因此，说明书和附图中的各种顺序只是为了清楚描述某一个实施例，并不意味着是必须的顺序，除非另有说明其中某个顺序是必须遵循的。

如图 1 所示，本发明实施例的用于普通 PCR（即一对引物进行的 PCR）的引物对、或用于多重 PCR 成对引物的正向引物和反向引物均包括一段固定序列（即相同的序列），在普通 PCR、或多重 PCR 的过程中，如果引物之间产生二聚体，其二聚体产物会存在一段互补的序列，由于二聚体的长度一般比较短，在后续的变性退火（即第二个扩增循环以后）过程中互补的序列自身会迅速结合，形成颈环结构，阻止其进行后续的 PCR 反应，而对于正常的特异性产物，虽然其结构也会存在一段互补的序列，但是这段互补的序列相距足够长，很难形成颈环结构，通过两种产物退火的差异达到对引物二聚体的抑制。

具体而言，如图 2 所示，正向引物和反向引物在 PCR 的第一个循环中通过引物互补和扩增作用形成引物二聚体，同时特异性引物结合目标区域扩增出正常的特异性产物。在 PCR 的第二个循环及其后续循环中，引物二聚体变性退火，由于两段互补的固定序列相距较近，形成引物二聚体颈环结构，抑制引物二聚体的进一步产生。

在本发明的一种实施例中提供一种 PCR 的引物对，引物对中正向引物和反向引物都包括一段相同的固定序列，并且正向引物和反向引物各自包括一段彼此不同的特异性引物序列。

本发明实施例中，固定序列和特异性引物序列可以按照合适的方式互连形成引物序列，例如可以直接连接也可以通过介于二者之间的若干碱基序列连接形成引物序列。在优选实施例中，固定序列位于特异性引物序列的 5' 端。

在其它实施例中，上述引物对的正向引物和反向引物还各自包括一段接头序列。每条引物从 5' 端至 3' 端依次包括：接头序列、固定序列和特异性引物序列；或固定序列、接头序列和特异性引物序列。在一些实施例中，上述引物对的正向引物和反向引物中固定序列的长度是 15-40nt，固定序列的 Tm 值优选为 55-65℃。

在本发明的一种实施例中提供一种用于多重 PCR 的引物组合，该引物组合包括多对引物，

多对引物中至少部分引物都包括一段相同的固定序列，并且不同的引物各自包括一段彼此不同的特异性引物序列。

本发明实施例的引物组合包括多对引物，每对引物包括正向引物和反向引物，用于扩增一个目的片段（目标区域），不同的引物对扩增不同的目的片段（目标区域），即所谓“多重 PCR”扩增。不同的引物各自包括一段彼此不同的特异性引物序列，该特异性引物序列能够特异性结合不同的目的片段（目标区域），实现特异性扩增。

需要说明的是，不同的引物对形成引物二聚体的倾向不同，有些易于形成引物二聚体，而有些不易形成引物二聚体。因此，多对引物中至少部分引物都包括一段相同的固定序列，所谓“部分引物”是指已与形成引物二聚体的引物。这些“部分引物”例如可以是 1 对、2 对、3 对、5 对、8 对、20 对或 100 对引物等。当然，在优选实施例中，多对引物全部都包括一段相同的固定序列，使得每对引物的引物二聚体都能通过形成二聚体颈环结构的方式抑制引物二聚体的进一步产生。

本发明实施例中，固定序列和特异性引物序列可以按照合适的方式互连形成引物序列，例如可以直接连接也可以通过介于二者之间的若干碱基序列连接形成引物序列。在优选实施例中，固定序列位于特异性引物序列的 5' 端。

在优选实施例中，每条引物还各自包括一段接头序列。该接头序列例如可以是适用于各种测序平台的测序接头序列。每对引物的正向引物和反向引物的接头序列可以相同或不同，优选不同。不同引物对之间的正向引物的接头序列可以相同或不同，优选相同。类似地，不同引物对之间的反向引物的接头序列可以相同或不同，优选相同。

在一个较为优选的实施例中，如图 3 所示，每条引物从 5' 端至 3' 端依次包括：接头序列、固定序列和特异性引物序列；或固定序列、接头序列和特异性引物序列。

一般而言，本发明实施例中，引物上的固定序列的长度可以没有特别限制。但是在本发明一个优选实施例中，固定序列的长度是 15-40nt（个碱基）， T_m 值优选为 55-65℃。在更优选的实施例中，固定序列的长度是 18-26nt，更优选 18nt， T_m 值为 60℃。在优选实施例中，固定序列的 T_m 值与引物的 T_m 值基本相同。GC 含量相对较高，序列长度尽量短。

在本发明一个优选实施例中，在一对或多对特异性引物的 5' 端均加上一段固定序列，该固定序列长 15-40nt， T_m 值为 55-65℃，优选地，固定序列长度为 18nt， T_m 值为 60℃。对于采用两步法的多重 PCR 构建目标测序文库的方法，优选加入 18nt 的固定序列，其第一轮的多重特异性引物结构如图 3 所示。

在优选实施例中，在多重 PCR 的所有特异性引物的 5' 端都加上一段固定序列，由于目标扩增子和引物二聚体的长度不一致，引物二聚体由于相距足够短，在 PCR 的过程中会形成颈环结构而不能进行后续的 PCR 反应，抑制了引物二聚体进一步产生。

本发明一种实施例中提供一种 PCR 扩增方法，该方法包括使用本发明的引物对或引物组合进行普通 PCR、或多重 PCR 扩增。

本发明的 PCR 扩增方法可以是或者可用于目标测序文库构建的方法，特别是采用两步法的多重 PCR 构建目标测序文库的方法，在第一步 PCR 扩增中，使用本发明的带有固定序列的特异性引物序列进行扩增，在第二步 PCR 扩增中，使用通用引物进行扩增。

在目标测序文库构建中，本发明的引物对或引物组合中的引物上固定序列和接头序列可以是一部分共用或重叠的序列，例如测序接头序列上的一部分序列作为固定序列或固定序列

的一部分。

本发明一种实施例中提供一种本发明的引物对或引物组合在通过PCR扩增进行目标区域捕获中的用途。该种用途特别是目标区域捕获文库构建的用途。

本发明的引物能够降低PCR扩增中的引物二聚体，因此本发明一种实施例中提供一种降低PCR扩增中的引物二聚体的方法，包括：使用本发明的引物对或引物组合进行PCR扩增，以使产生的引物二聚体在后续变性退火过程中每个引物二聚体中的上述固定序列彼此结合形成颈环结构，以阻止其进行后续的PCR反应。

本发明一种实施例中提供一种目标区域捕获方法，该方法包括：使用本发明的引物对或引物组合进行PCR扩增。本发明中，目标区域可以是任何感兴趣的核酸序列区域，典型但非限定性的例子是任何物种来源的基因组DNA上的目标基因。使用本发明的引物对或引物组合进行PCR扩增得到的产物即是所捕获的目标区域，在一些应用场景下，这些捕获的目标区域还可以进一步扩增。

本发明一种实施例中提供一种文库构建方法，该方法包括：使用本发明的引物对或引物组合进行PCR扩增。本发明中，文库可以是任何合适的用途的核酸文库，包括但不限于测序文库。使用本发明的引物对或引物组合进行PCR扩增得到的产物可以作为最终的文库，例如在本发明的引物组合包含一段测序接头序列的情况下，PCR扩增产物会带上一段测序接头序列，这种扩增产物可上机测序。然而，在一些应用场景下，这些PCR扩增产物还可能进一步进行其他操作，例如通用扩增、环化等步骤，以得到适合上机测序的测序文库。

以下通过实施例详细说明本发明的技术方案，应当理解，实施例仅是示例性的，不能理解为对本发明保护范围的限制。

实施例 1

引物设计：针对ATM基因肿瘤相关的热点区域设计17对引物。对于常规方法，按照常规的引物设计：一对特异性引物的5'端加上不同的测序接头序列；对于本发明的方法，按照优化的引物设计：在一对特异性引物的5'端加上一段固定序列，然后再加上一段不同的测序接头序列，形成两个肿瘤相关基因热点突变检测“面板”（panel），即后面的特异性引物池。

实验流程：用上述“面板”对炎黄gDNA标准品（10-20ng）进行文库制备，每个重复4次，文库制备完成后进行高通量测序，得到的测序数据进行对比，主要比较引物二聚体。

1、第一轮PCR，采用QIAGEN Multiplex PCR Kit（货号 Cat No./ID: 206143），进行PCR。在200μL PCR管子配置如下表1所示的反应体系：

表 1

组分	用量
炎黄gDNA	20 μL
2× PCR反应酶	25 μL
特异性引物池	5 μL
总量	50 μL

其中，本发明方法中使用的特异性引物池由表2所示的引物10μM等摩尔混合得到，其中下划线序列表示固定序列，固定序列前面的序列表示接头序列、固定序列（接头相同序列可作为固定序列的一部分）后面的序列表示特异性引物序列。

表2 发明方法的引物

引物	序列
ATM-01F	ACATGGCTACGAT <u>CCGACTTCTTCCGATCT</u> ATGATCTGCTAGTGAATGAGATAAGTCATA (SEQ ID NO: 1)
ATM-02F	ACATGGCTACGAT <u>CCGACTTCTTCCGATCT</u> TCCTCAGTTTGTCACTAAAATCTCTTC (SEQ ID NO: 2)
ATM-03F	ACATGGCTACGAT <u>CCGACTTCTTCCGATCT</u> ACAGGAGAATATGGAAATCTGGTGACT (SEQ ID NO: 3)
ATM-04F	ACATGGCTACGAT <u>CCGACTTCTTCCGATCT</u> TGCTATTCTCAGATGACTCTGTGTTTTT (SEQ ID NO: 4)
ATM-05F	ACATGGCTACGAT <u>CCGACTTCTTCCGATCT</u> GTTTGTTTCTTTTTTCTCCAGTTGGTTACAT (SEQ ID NO: 5)
ATM-06F	ACATGGCTACGAT <u>CCGACTTCTTCCGATCT</u> GTGTTTGACTCTAGATGCTGTGAGAA (SEQ ID NO: 6)
ATM-07F	ACATGGCTACGAT <u>CCGACTTCTTCCGATCT</u> CACCTCACTGAAACCTTTGTGTTTT (SEQ ID NO: 7)
ATM-08F	ACATGGCTACGAT <u>CCGACTTCTTCCGATCT</u> GCTCATACAGCAGGCCATAGA (SEQ ID NO: 8)
ATM-09F	ACATGGCTACGAT <u>CCGACTTCTTCCGATCT</u> TCACCTTCAGAAGTCACAGAATGATTTT (SEQ ID NO: 9)
ATM-10F	ACATGGCTACGAT <u>CCGACTTCTTCCGATCT</u> AGTATTCTTTACATGGCTTTTGGTCTTCT (SEQ ID NO: 10)
ATM-11F	ACATGGCTACGAT <u>CCGACTTCTTCCGATCT</u> AAAAAGCCATTTGACCGTGGAG (SEQ ID NO: 11)
ATM-12F	ACATGGCTACGAT <u>CCGACTTCTTCCGATCT</u> ACAGACTGCTTTCCAAAGATTCTTGTA (SEQ ID NO: 12)
ATM-13F	ACATGGCTACGAT <u>CCGACTTCTTCCGATCT</u> CTATATGTAGAGGCTGTTGGAAGCTG (SEQ ID NO: 13)
ATM-14F	ACATGGCTACGAT <u>CCGACTTCTTCCGATCT</u> ACTGGTGTACTTGATAGGCATTTGAAT (SEQ ID NO: 14)
ATM-15F	ACATGGCTACGAT <u>CCGACTTCTTCCGATCT</u> TAATTTTCAACTGCTTTACATAAGAAGCGT (SEQ ID NO: 15)
ATM-16F	ACATGGCTACGAT <u>CCGACTTCTTCCGATCT</u> TGGCTTTAATAATTGAAGAATTCACATTTTG (SEQ ID NO: 16)
ATM-17F	ACATGGCTACGAT <u>CCGACTTCTTCCGATCT</u> CTGCATAGATTTCTGCATAGAGTAAAGC (SEQ ID NO: 17)
ATM-01R	CCGCTTGGCCT <u>CCGACTTCTTCCGATCT</u> ACAGGAAATTTCTAAATGTGACATGACCT (SEQ ID NO: 18)
ATM-02R	CCGCTTGGCCT <u>CCGACTTCTTCCGATCT</u> TCAAGAGTTAATTGCAAATTACCTTAATTTCCA (SEQ ID NO: 19)

ATM-03R	<u>CCGCTTGGCCTCCGACTTCTTCCGATCT</u> TCACCTTAACAAGCTGTCTCCTCT (SEQ ID NO: 20)
ATM-04R	<u>CCGCTTGGCCTCCGACTTCTTCCGATCT</u> TTCCGTGTTTCTCTGCAGTAATGT (SEQ ID NO: 21)
ATM-05R	<u>CCGCTTGGCCTCCGACTTCTTCCGATCT</u> TCTTGGTAGGCAAACAACATTCCA (SEQ ID NO: 22)
ATM-06R	<u>CCGCTTGGCCTCCGACTTCTTCCGATCT</u> TGAGATACACAGTCTACCTGGTAAGAAAA (SEQ ID NO: 23)
ATM-07R	<u>CCGCTTGGCCTCCGACTTCTTCCGATCT</u> AATTCATTGTCCACCAACACTGA (SEQ ID NO: 24)
ATM-08R	<u>CCGCTTGGCCTCCGACTTCTTCCGATCT</u> GTATGTTGGCAGGTAAAAATAAAGGCT (SEQ ID NO: 25)
ATM-09R	<u>CCGCTTGGCCTCCGACTTCTTCCGATCT</u> TTGAGATGAAAGGATTCCACTGAAAGTT (SEQ ID NO: 26)
ATM-10R	<u>CCGCTTGGCCTCCGACTTCTTCCGATCT</u> CATTCTGGCACGCTTTGGAAA (SEQ ID NO: 27)
ATM-11R	<u>CCGCTTGGCCTCCGACTTCTTCCGATCT</u> CAGGTTGTTTGCATCACTAACA (SEQ ID NO: 28)
ATM-12R	<u>CCGCTTGGCCTCCGACTTCTTCCGATCT</u> GCCATACCTGTTTTCCCAATAAGTTTT (SEQ ID NO: 29)
ATM-13R	<u>CCGCTTGGCCTCCGACTTCTTCCGATCT</u> TCAGCATTATGAAGGTCCACTGAAG (SEQ ID NO: 30)
ATM-14R	<u>CCGCTTGGCCTCCGACTTCTTCCGATCT</u> TGTAGATAGGCCAGCATTGGATCT (SEQ ID NO: 31)
ATM-15R	<u>CCGCTTGGCCTCCGACTTCTTCCGATCT</u> AGCGTTTACGATCCTCTTTCAGTG (SEQ ID NO: 32)
ATM-16R	<u>CCGCTTGGCCTCCGACTTCTTCCGATCT</u> TCACATTTTGTGCCTCCACTGT (SEQ ID NO: 33)
ATM-17R	<u>CCGCTTGGCCTCCGACTTCTTCCGATCT</u> TGTAAGTGAGCAGCACAAGACT (SEQ ID NO: 34)

常规方法中使用的特异性引物池由表3所示的引物10 μ M等摩尔混合得到，序列包括接头序列和特异性引物序列两部分，无固定序列。

表3 常规方法的引物

引物	序列
ATM-01F	ACATGGCTACGATCCGACTT ATGATCTGCTAGTGAATGAGATAAGTCATA (SEQ ID NO: 35)
ATM-02F	ACATGGCTACGATCCGACTT TCCTCAGTTTGTCACTAAAATCTCTTC (SEQ ID NO: 36)
ATM-03F	ACATGGCTACGATCCGACTT ACAGGAGAATATGGAAATCTGGTGACT (SEQ ID NO: 37)

ATM-04F	ACATGGCTACGATCCGACTT TGCTATTCTCAGATGACTCTGTGTTTTT (SEQ ID NO: 38)
ATM-05F	ACATGGCTACGATCCGACTT GTTTGTTTCTTTTTTCTCCAGTTGGTTACAT (SEQ ID NO: 39)
ATM-06F	ACATGGCTACGATCCGACTT GTGTTTGACTCTAGATGCTGTGAGAA (SEQ ID NO: 40)
ATM-07F	ACATGGCTACGATCCGACTT CACCTCACTGAAACCTTTGTGTTTT (SEQ ID NO: 41)
ATM-08F	ACATGGCTACGATCCGACTT GCTCATACAGCAGGCCATAGA (SEQ ID NO: 42)
ATM-09F	ACATGGCTACGATCCGACTT TCACCTTCAGAAGTCACAGAATGATTTT (SEQ ID NO: 43)
ATM-10F	ACATGGCTACGATCCGACTT AGTATTCTTTACATGGCTTTTGGTCTTCT (SEQ ID NO: 44)
ATM-11F	ACATGGCTACGATCCGACTT AAAAAGCCATTTGACCGTGGAG (SEQ ID NO: 45)
ATM-12F	ACATGGCTACGATCCGACTT ACAGACTGCTTTCCAAAGATTCTTGTA (SEQ ID NO: 46)
ATM-13F	ACATGGCTACGATCCGACTT CTATATGTAGAGGCTGTTGGAAGCTG (SEQ ID NO: 47)
ATM-14F	ACATGGCTACGATCCGACTT ACTGGTGTACTTGATAGGCATTTGAAT (SEQ ID NO: 48)
ATM-15F	ACATGGCTACGATCCGACTT TAATTTTCAACTGCTTTACATAAGAAGCGT (SEQ ID NO: 49)
ATM-16F	ACATGGCTACGATCCGACTT TGGCTTTAATAATTGAAGAATTCACATTTTG (SEQ ID NO: 50)
ATM-17F	ACATGGCTACGATCCGACTT CTGCATAGATTTCTGCATAGAGTAAAGC (SEQ ID NO: 51)
ATM-01R	CCGCTTGGCCTCCGACTT ACAGGAAATTTCTAAATGTGACATGACCT (SEQ ID NO: 52)
ATM-02R	CCGCTTGGCCTCCGACTT TCAAGAGTTAATTGCAAATTACCTTAATTTCCA (SEQ ID NO: 53)
ATM-03R	CCGCTTGGCCTCCGACTT TCACCTTAACAAGCTGTCTCCTCT (SEQ ID NO: 54)
ATM-04R	CCGCTTGGCCTCCGACTT TTCCGTGTTTCTCTGCAGTAATGT (SEQ ID NO: 55)
ATM-05R	CCGCTTGGCCTCCGACTT TCTTGGTAGGCAAACAACATTCCA (SEQ ID NO: 56)
ATM-06R	CCGCTTGGCCTCCGACTT TGAGATACACAGTCTACCTGGTAAGAAAA (SEQ ID NO: 57)

ATM-07R	CCGCTTGGCCTCCGACTT AATTCACCTTGTCCACCAACACTGA (SEQ ID NO: 58)
ATM-08R	CCGCTTGGCCTCCGACTT GTATGTTGGCAGGTTAAAAATAAAGGCT (SEQ ID NO: 59)
ATM-09R	CCGCTTGGCCTCCGACTT TTGAGATGAAAGGATTCCACTGAAAGTT (SEQ ID NO: 60)
ATM-10R	CCGCTTGGCCTCCGACTT CATTCTGGCACGCTTTGGAAA (SEQ ID NO: 61)
ATM-11R	CCGCTTGGCCTCCGACTT CAGGTTTCGTTTGCATCACTAACA (SEQ ID NO: 62)
ATM-12R	CCGCTTGGCCTCCGACTT GCCATACCTGTTTTCCCAATAAGTTTT (SEQ ID NO: 63)
ATM-13R	CCGCTTGGCCTCCGACTT TCAGCATTATGAAGGTCCACTGAAG (SEQ ID NO: 64)
ATM-14R	CCGCTTGGCCTCCGACTT TGTAAGATAGGCCAGCATTGGATCT (SEQ ID NO: 65)
ATM-15R	CCGCTTGGCCTCCGACTT AGCGTTTACGATCCTCTTTCAGTG (SEQ ID NO: 66)
ATM-16R	CCGCTTGGCCTCCGACTT TCACATTTTGTGCCTCCACTGT (SEQ ID NO: 67)
ATM-17R	CCGCTTGGCCTCCGACTT TGTAAGGTGAGCAGCACAAGACT (SEQ ID NO: 68)

按照以下表4的程序进行第一轮PCR扩增：

表4

温度	时间	循环数
95℃	2min	1个循环
95℃	10s	15个循环
62℃	2min	
72℃	30s	
72℃	5min	1个循环

得到的PCR产物中加入20μL的磁珠（Beckman公司Agencourt AMPure XP磁珠，货号A63881）进行纯化，得到的产物溶解于20μL TE溶液中。

第二轮PCR，采用QIAGEN Multiplex PCR Kit（货号Cat No./ID：206143），进行PCR。在200μL PCR管子中配置如下表5所示的反应体系：

表5

组分	用量
上一步反应物	20 μL
2× PCR反应酶	25 μL
通用引物1	2.5 μL

通用引物2	2.5 μ L
总量	50 μ L

其中，通用引物1和通用引物2如下表6所示：

表6 通用引物序列

引物	序列
通用引物 1	/5Phos/GAACGACATGGCTACGATCCGACTT* (SEQ ID NO: 69)
通用引物 2	TGTGAGCCAAGGAGTTGNNNNNNNNNTT GTCTTCCTAAGACCGCTTGGCCTCCGACTT# (SEQ ID NO: 70)

*通用引物1，5'端磷酸化，用于后续BGISEQ-500文库环化。

#通用引物2，10bp N碱基为文库标签序列。

按照以下表7的程序进行第二轮PCR扩增：

表7

温度	时间	循环数
95℃	2min	1个循环
95℃	10s	15个循环
62℃	2min	
72℃	30s	
72℃	5min	1个循环

得到的PCR产物中加入20 μ L的磁珠（Beckman公司Agencourt AMPure XP磁珠，货号A63881）进行纯化，得到的产物溶解于20 μ L TE溶液中。

采用Agilent 2100对产物的大小进行检测，结果如图4和图5所示，采用Qubit 2.0对溶度进行文库质检。

2、上机测序

得到的所有产物进行标准化，进行等量混合，混合得到的文库进行平行测序，测序平台BGISEQ-500，测序类型PE100。

3、数据分析

分析步骤包括过滤接头引物序列、比对等基本的步骤。

结果：如表8和图6所示，本发明方法得到的引物二聚体的比例（0.9 $\pm$ 0.5%）明显少于常规方法得到的引物二聚体的比例（49 $\pm$ 1%）。常规方法中引物二聚体消耗体系中的引物，导致目标区域的扩增效率下降，进而影响该扩增区域的比例。

表8

编号	原始数据	过滤数据（条）	可用数据比例	引物二聚体比例	比对率
本发明方法 1	536548	2547	99.53%	0.47%	98.50%
本发明方法 2	678563	9657	98.58%	1.42%	98.70%
本发明方法 3	751622	13569	98.65%	1.81%	97.56%

本发明方法 4	854123	9587	98.88%	1.12%	98.36%
常规方法 1	789624	395284	49.94%	50.06%	97.60%
常规方法 2	598741	285698	52.28%	47.72%	98.50%
常规方法 3	654820	336520	48.61%	51.39%	96.67%
常规方法 4	552416	274156	50.37%	49.63%	96.59%

以上应用了具体个例对本发明进行阐述，只是用于帮助理解本发明，并不用以限制本发明。对于本发明所属技术领域的技术人员，依据本发明的思想，还可以做出若干简单推演、变形或替换。

权利要求书¹²

1. 一种 PCR 的引物对, 其特征在于, 所述引物对中正向引物和反向引物都包括一段相同的固定序列, 并且所述正向引物和反向引物各自包括一段彼此不同的特异性引物序列。
2. 根据权利要求 1 所述的引物对, 其特征在于, 所述固定序列位于所述特异性引物序列的 5'端。
3. 根据权利要求 1 所述的引物对, 其特征在于, 所述正向引物和反向引物还各自包括一段接头序列。
4. 根据权利要求 1 所述的引物对, 其特征在于, 每条所述引物从 5'端至 3'端依次包括: 所述接头序列、所述固定序列和所述特异性引物序列; 或所述固定序列、所述接头序列和所述特异性引物序列。
5. 根据权利要求 1 所述的引物对, 其特征在于, 所述固定序列的长度是 15-40nt。
6. 根据权利要求 5 所述的引物对, 其特征在于, 所述固定序列的长度是 18-26nt。
7. 根据权利要求 1 所述的引物对, 其特征在于, 所述固定序列的 T_m 值为 55-65℃。
8. 一种用于多重 PCR 的引物组合, 其特征在于, 所述引物组合包括多对引物, 所述多对引物中至少部分引物对的正向引物和反向引物都包括一段相同的固定序列, 并且不同的引物各自包括一段彼此不同的特异性引物序列。
9. 根据权利要求 8 所述的引物组合, 其特征在于, 所述多对引物全部都包括一段相同的固定序列。
10. 根据权利要求 8 所述的引物组合, 其特征在于, 所述固定序列位于所述特异性引物序列的 5'端。
11. 根据权利要求 8 所述的引物组合, 其特征在于, 所述引物还各自包括一段接头序列。
12. 根据权利要求 11 所述的引物组合, 其特征在于, 所有成对引物中的正向引物的所述接头序列相同, 且所有成对引物中的反向引物的所述接头序列相同。
13. 根据权利要求 12 所述的引物组合, 其特征在于, 每条所述引物从 5'端至 3'端依次包括: 所述接头序列、所述固定序列和所述特异性引物序列; 或所述固定序列、所述接头序列和所述特异性引物序列。
14. 根据权利要求 8 所述的引物组合, 其特征在于, 所述固定序列的长度是 15-40nt。
15. 根据权利要求 8 所述的引物组合, 其特征在于, 所述固定序列的 T_m 值为 55-65℃。
16. 根据权利要求 8 所述的引物组合, 其特征在于, 所述引物组合包括 SEQ ID NO: 1-34 所示的序列。
17. 一种 PCR 扩增方法, 其特征在于, 所述方法包括使用权利要求 1 至 7 中任一项所述的引物对或权利要求 8 至 16 任一项所述的引物组合进行 PCR 扩增。
18. 根据权利要求 17 所述的 PCR 扩增方法, 其特征在于, 所述方法还包括使用通用引物对所述 PCR 扩增的产物进一步扩增。
19. 权利要求 1 至 7 中任一项所述的引物对或权利要求 8 至 16 任一项所述的引物组合在通过 PCR 扩增进行目标区域捕获中的用途。
20. 一种降低 PCR 扩增中的引物二聚体的方法, 其特征在于, 所述方法包括: 使用权利要求 1 至 7 中任一项所述的引物对或权利要求 8 至 16 任一项所述的引物组合进行 PCR 扩增, 以使产生的引物二聚体在后续变性退火过程中每个引物二聚体中的所述固定序列彼此结合形成颈环结构, 以阻止其进行后续的 PCR 反应。

21. 一种目标区域捕获方法，其特征在于，所述方法包括：使用权利要求 1 至 7 中任一项所述的引物对或权利要求 8 至 16 任一项所述的引物组合进行 PCR 扩增。

22. 一种文库构建方法，其特征在于，所述方法包括：使用权利要求 1 至 7 中任一项所述的引物对或权利要求 8 至 16 任一项所述的引物组合进行 PCR 扩增。

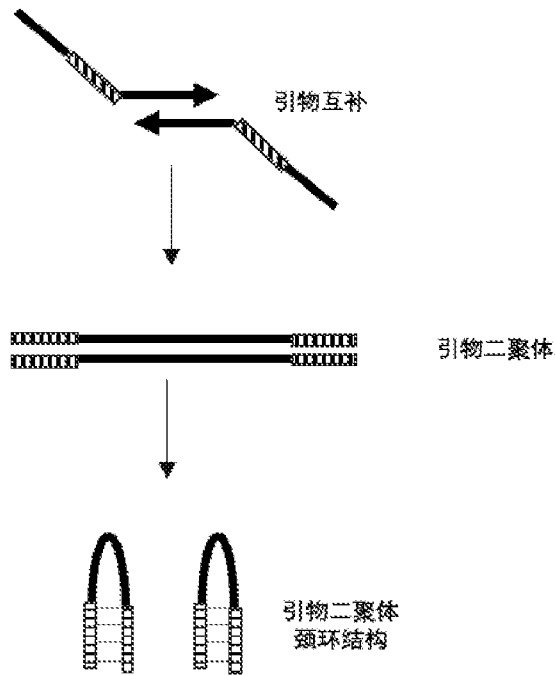


图 1

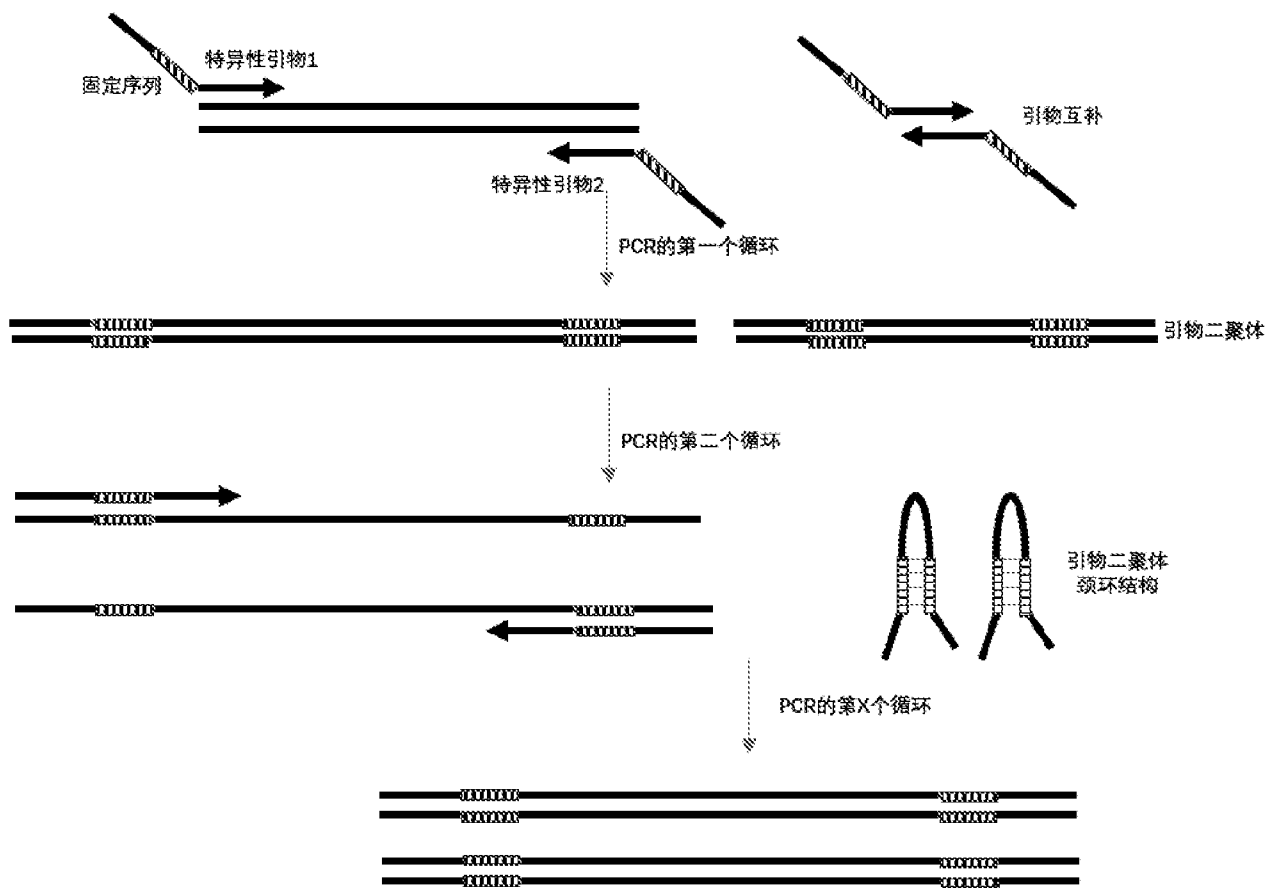


图 2



图 3

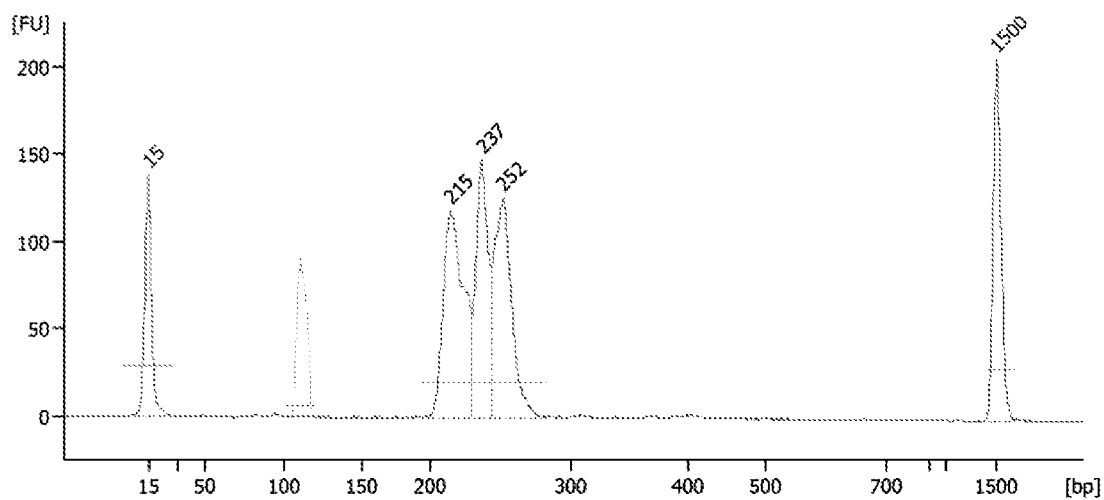


图 4

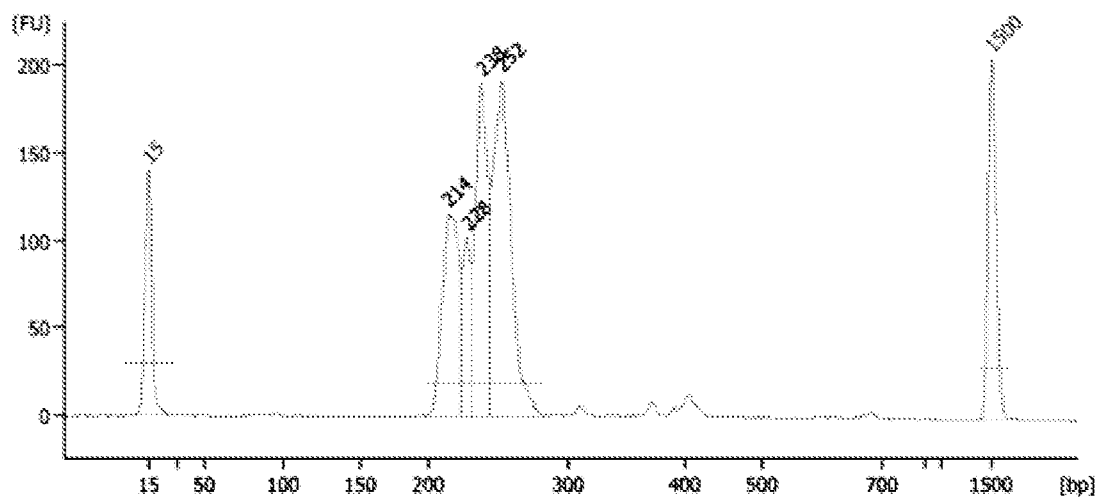


图 5

引物二聚体占总数据的比例

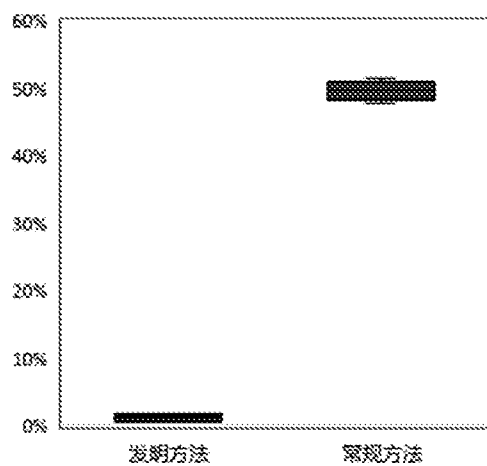


图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/122275

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/686(2018.01)i; C40B 50/06(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)

C12Q1 C40B50

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, CNTXT, CNKI, 万方, WANFANG, 百度学术, BAIDU SCHOLAR: 引物二聚体, 茎环, 锅柄, 颈环, 发夹, 接头, 多重pcr, 测序, 文库 VEN, WOTXT, USTXT, EPTXT, NCBI, google scholar: primer, dimer, panhandle, pan-handle, hairpin, atm gene, multiplex pcr

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BROWNIE, J. et al. "The Elimination of Primer-dimer Accumulation in PCR" <i>Nucleic Acids Research</i> , Vol. 25, No. (16), 31 December 1997 (1997-12-31), ISSN: 0305-1048, abstract, pages 3236 and 3238-3240, tables 1-2, and figures 1-6	1-22
X	CN 1597976 A (SICHUAN UNIVERSITY) 23 March 2005 (2005-03-23) description, page 2, pages 5-8 and embodiment 1, and figures 1-7	1-22
X	CN 105256048 A (XIAMEN GENEX BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 20 January 2016 (2016-01-20) description, paragraphs 0007-0013, and embodiment 2	1-22
A	CN 106282353 A (SHANGHAI BOWING APPLIED BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 04 January 2017 (2017-01-04) entire document	1-22
A	CN 107119331 A (CHONGQING CANCER INSTITUTE) 01 September 2017 (2017-09-01) entire document	1-22
A	CN 107447258 A (DALIAN MEDICAL UNIVERSITY) 08 December 2017 (2017-12-08) entire document	1-22



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

09 August 2019

Date of mailing of the international search report

05 September 2019

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

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/122275

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 106319639 A (BGI SHENZHEN CO., LIMITED) 11 January 2017 (2017-01-11) entire document	1-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/122275

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:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/122275

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)
CN	1597976	A	23 March 2005	CN	1289669 C	13 December 2006
CN	105256048	A	20 January 2016	None		
CN	106282353	A	04 January 2017	None		
CN	107119331	A	01 September 2017	None		
CN	107447258	A	08 December 2017	None		
CN	106319639	A	11 January 2017	CN	106319639 B	04 September 2018

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/122275

A. 主题的分类 C12Q 1/686(2018.01)i; C40B 50/06(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) C12Q1 C40B50 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, CNTXT, CNKI, 万方, 百度学术: 引物二聚体, 茎环, 锅柄, 颈环, 发夹, 接头, 多重pcr, 测序, 文库 VEN, WOTXT, USTXT, EPTXT, NCBI, google scholar: primer, dimer, panhandle, pan-handle, hairpin, atm ge- ne, multiplex pcr																										
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>Jannine Brownie 等. "The elimination of primer-dimer accumulation in PCR" Nucleic Acids Research, 第25卷, 第16期, 1997年 12月 31日 (1997 - 12 - 31), ISSN: 0305-1048, 摘要, 3236、3238-3240页, 表1-2, 图1-6</td> <td>1-22</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 1597976 A (四川大学) 2005年 3月 23日 (2005 - 03 - 23) 说明书第2、5-8页, 实施例1, 图1-7</td> <td>1-22</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 105256048 A (厦门基科生物科技有限公司) 2016年 1月 20日 (2016 - 01 - 20) 说明书0007-0013段, 实施例2</td> <td>1-22</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 106282353 A (上海翼和应用生物技术有限公司) 2017年 1月 4日 (2017 - 01 - 04) 全文</td> <td>1-22</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 107119331 A (重庆市肿瘤研究所) 2017年 9月 1日 (2017 - 09 - 01) 全文</td> <td>1-22</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 107447258 A (大连医科大学) 2017年 12月 8日 (2017 - 12 - 08) 全文</td> <td>1-22</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 106319639 A (深圳华大基因科技有限公司) 2017年 1月 11日 (2017 - 01 - 11) 全文</td> <td>1-22</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	Jannine Brownie 等. "The elimination of primer-dimer accumulation in PCR" Nucleic Acids Research, 第25卷, 第16期, 1997年 12月 31日 (1997 - 12 - 31), ISSN: 0305-1048, 摘要, 3236、3238-3240页, 表1-2, 图1-6	1-22	X	CN 1597976 A (四川大学) 2005年 3月 23日 (2005 - 03 - 23) 说明书第2、5-8页, 实施例1, 图1-7	1-22	X	CN 105256048 A (厦门基科生物科技有限公司) 2016年 1月 20日 (2016 - 01 - 20) 说明书0007-0013段, 实施例2	1-22	A	CN 106282353 A (上海翼和应用生物技术有限公司) 2017年 1月 4日 (2017 - 01 - 04) 全文	1-22	A	CN 107119331 A (重庆市肿瘤研究所) 2017年 9月 1日 (2017 - 09 - 01) 全文	1-22	A	CN 107447258 A (大连医科大学) 2017年 12月 8日 (2017 - 12 - 08) 全文	1-22	A	CN 106319639 A (深圳华大基因科技有限公司) 2017年 1月 11日 (2017 - 01 - 11) 全文	1-22
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																								
X	Jannine Brownie 等. "The elimination of primer-dimer accumulation in PCR" Nucleic Acids Research, 第25卷, 第16期, 1997年 12月 31日 (1997 - 12 - 31), ISSN: 0305-1048, 摘要, 3236、3238-3240页, 表1-2, 图1-6	1-22																								
X	CN 1597976 A (四川大学) 2005年 3月 23日 (2005 - 03 - 23) 说明书第2、5-8页, 实施例1, 图1-7	1-22																								
X	CN 105256048 A (厦门基科生物科技有限公司) 2016年 1月 20日 (2016 - 01 - 20) 说明书0007-0013段, 实施例2	1-22																								
A	CN 106282353 A (上海翼和应用生物技术有限公司) 2017年 1月 4日 (2017 - 01 - 04) 全文	1-22																								
A	CN 107119331 A (重庆市肿瘤研究所) 2017年 9月 1日 (2017 - 09 - 01) 全文	1-22																								
A	CN 107447258 A (大连医科大学) 2017年 12月 8日 (2017 - 12 - 08) 全文	1-22																								
A	CN 106319639 A (深圳华大基因科技有限公司) 2017年 1月 11日 (2017 - 01 - 11) 全文	1-22																								
☐ 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		国际检索报告邮寄日期																								
2019年 8月 9日		2019年 9月 5日																								
ISA/CN的名称和邮寄地址		受权官员																								
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		刘彦宁 电话号码 86-(20)-28950933																								

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:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/122275

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	1597976	A	2005年 3月 23日	CN 1289669 C	2006年 12月 13日
CN	105256048	A	2016年 1月 20日	无	
CN	106282353	A	2017年 1月 4日	无	
CN	107119331	A	2017年 9月 1日	无	
CN	107447258	A	2017年 12月 8日	无	
CN	106319639	A	2017年 1月 11日	CN 106319639 B	2018年 9月 4日