

(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
2018 年 12 月 27 日 (27.12.2018)



(10) 国际公布号
WO 2018/232597 A1

(51) 国际专利分类号:
C12Q 1/68 (2018.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2017/089198

(22) 国际申请日: 2017 年 6 月 20 日 (20.06.2017)

(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, Guangdong 518083 (CN)。 张薇婷 (ZHANG, Weiting); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 高雅 (GAO, Ya); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, 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, 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, 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, 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, Guangdong 518083 (CN)。 徐讯

(XU, Xun); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。

(74) 代理人: 北京清亦华知识产权代理事务所 (普通合伙) (TSINGYIHUA INTELLECTUAL PROPERTY LLC); 中国北京市海淀区清华园清华大学照澜院商业楼 301 室, Beijing 100084 (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: COMPOSITION USED FOR QUANTITATIVE PCR AMPLIFICATION AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 用于定量 PCR 扩增的组合物及其应用

(57) Abstract: Provided is a composition used for quantitative PCR amplification, comprising: a PCR primer pair and a specific probe. The PCR primer pair comprises a first primer and a second primer, wherein the first primer comprises a first specific sequence and a first random sequence, the first specific sequence is located at the 3' end of the first primer, and the first random sequence is located at the 5' end of the first primer; the second primer comprises a second specific sequence and a second random sequence, the second specific sequence is located at the 3' end of the second primer, and the second random sequence is located at the 5' end of the second primer; moreover, the first specific sequence and the second specific sequence are respectively an upstream primer and a downstream primer for a target sequence; the first random sequence and the second random sequence are inversely complementary; the sequence of the specific probe is complementary paired with the sequence between the upstream primer and the downstream primer for the target sequence.

(57) 摘要: 提供了用于定量 PCR 扩增的组合物, 其包括: 一对 PCR 引物对和一条特异性探针, 所述 PCR 引物对包括第一引物和第二引物, 其中, 所述第一引物包含第一特异性序列和第一随机序列, 所述第一特异性序列位于所述第一引物的 3' 端, 所述第一随机序列位于所述第一引物的 5' 端, 所述第二引物包含第二特异性序列和第二随机序列, 所述第二特异性序列位于所述第二引物的 3' 端, 所述第二随机序列位于所述第二引物的 5' 端, 并且, 所述第一特异性序列和所述第二特异性序列分别为针对靶序列的上游引物和下游引物, 所述第一随机序列和所述第二随机序列反向互补, 所述特异性探针的序列与所述靶序列的上游引物和下游引物之间的序列互补配对。

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))。

用于定量 PCR 扩增的组合物及其应用

5 优先权信息

无

技术领域

本发明涉及生物技术领域，具体而言，涉及定量 PCR 扩增，更具体地，涉及用于定量 PCR 扩增的组合物及其应用。

10 背景技术

实时荧光定量 PCR 是通过对 PCR 扩增反应中每一个循环产物荧光信号的实时检测从而实现对起始模板定量及定性的分析。在实时荧光定量 PCR 反应中，引入了一种荧光化学物质，随着 PCR 反应的进行，PCR 反应产物不断累计，荧光信号强度也等比例增加。每经过一个循环，收集一个荧光强度信号，这样就可以通过荧光强度变化监测产物量的变化，从而得到一条荧光扩增曲线图。

实时荧光定量 PCR 技术是 DNA 定量技术的一次飞跃。运用该项技术，可以对 DNA、RNA 样品进行定量和定性分析。

然而，目前的实时荧光定量 PCR 技术仍有待改进。

20 发明内容

本发明旨在至少解决现有技术中存在的技术问题之一。为此，本发明的一个目的在于提出一种扩增效率高、特异性好的实时荧光定量 PCR 技术及相应的 PCR 引物对和探针组合物。

首先，需要说明的是，本发明是基于发明人的下列发现和工作而完成的：

目前 qPCR 最常用的方法是依赖于 SYBR 的染料法和依赖于 Taqman 探针的探针法；前者利用荧光染料来指示扩增的增加，后者利用与靶序列特异杂交的探针来指示扩增产物的增加，其中，TaqMan 探针法是目前使用较多的技术。TaqMan 探针是一种寡核苷酸探针，它的荧光与目的序列的扩增相关。它设计为与目标序列上游引物和下游引物之间的序列配对。荧光基团连接在探针的 5' 末端，而淬灭剂则在 3' 末端。当完整的探针与目标序列配对时，荧光基团发射的荧光因与 3' 端的淬灭基团接近而被淬灭。但在进行延伸反应时，聚合酶的 5' 外切酶活性将探针进行酶切，使得荧光基团与淬灭基团分离。随着扩增循环数的增加，释放出来的荧光基团不断积累。因此荧光强度与扩增产物的数量呈正比关系。

该方法虽然特异性强，但需要设计特异性的探针，引物和探针需要进行优化，有些复杂的区域很难得到一个比较好的引物和探针组合。在多重检测中，探针法更难去优化一个较好的引物组合（引物对和特异性探针），并且在某些区域虽然荧光检测是特异的，但是实际上还是会经常遇到有非特异的 PCR 产物出现的情况，虽然这部分产物不会产生荧光，

但会影响 PCR 引物对的扩增效率和不同扩增区域的均一性，在一些相对定量中会产生较大的偏差。

因而，利用 TaqMan 探针法进行 qPCR 时，采用的 PCR 引物对及对应的探针的设计不容忽视，而其中的 PCR 引物对的设计尤为重要。

5 而针对其中的 PCR 引物对的设计，网上有许多提供免费在线引物设计服务的网址和软件，例如：NetPrimer（www.premierbiosoft.com）。常用的单机引物设计软件有很多不同的产品，各有其优点。RightprimerTM（Bio2Disk）具有超强校对功能，可将待扩增序列的可能引物在很短的时间内，通过查找 Genebank，而与背景 DNA 校对，从而找到特异性极佳之引物。OligoTM（Molecular Biology Insights, Inc.）适合于 MultiplexPCR
10 和 ConsensusPCR 的引物设计，并能给出适合的 PCR 条件。PrimerPremier（或者 Premierbiosoft），可以在核酸序列未知的情况下，通过蛋白质序列来设计引物，这一功能在仅知道部分蛋白质序列，而又想克隆新基因时特别有用。PrimerDesigner210
（Scientific and Educational Software）以其短小精悍，功能齐全而得到广泛的应用。

但在实际工作中，常规引物设计软件设计的好的引物不一定会产生好的结果，特别是那些高 GC 区域以及模板中有和其他目的区域相似的序列，最终导致引物扩增得到的
15 产物特异性不强，PCR 扩增效率不高，而去优化这些区域的引物又往往难以得到满意的结果。

发明人研究后认为，当前的 PCR 引物设计需要严格按照引物设计条件进行设计，PCR 特异性和扩增效率过多依赖于引物设计的好坏，在一些重复区域、高 GC 区域或是有高级结构的区域引物往往难以得到好的效果，设计引物和引物优化需要花费大量的精力和物力。
20 因而，发明人进行了一系列设计和实验探索，以期改善这一问题。并且，发明人意外地发现：在一对常规引物的 5'端加上一段互补的序列，形成的具有“5'端反向互补，3'端突出”的稳定的引物二聚体结构的引物对，能够有效改善上述问题。

进而，发明人发现，利用上述的具有“5'端反向互补，3'端突出”的稳定的引物二
25 聚体结构的引物对，以及对应的特异性探针进行 qPCR，特异性强、扩增效率高，用于 DNA 或 RNA 的定量分析、基因表达差异分析时，结果精确、可靠。进而，发明人提出了一种特殊 PCR 引物和 Taqman 探针相结合的 qPCR 技术，对目的区域设计一对特殊的引物和一条特异性探针，该技术就依赖于这对特殊设计的引物。该 qPCR 技术相对于常规的 qPCR 具有特异性强、扩增效率高等特点，并且在 qPCR 多重扩增中具有非常好的均一性，对多位点
30 qPCR 检测具有一定的优势。

因而，在本发明的第一方面，本发明提供了一种用于定量 PCR 扩增的组合物。根据本发明的实施例，该用于定量 PCR 扩增的组合物包括：一对 PCR 引物对和一条特异性探针，所述 PCR 引物对包括第一引物和第二引物，其中，所述第一引物包含第一特异性序列和第一随机序列，所述第一特异性序列位于所述第一引物的 3'端，所述第一随机序列位于所述
35 第一引物的 5'端，所述第二引物包含第二特异性序列和第二随机序列，所述第二特异性序列位于所述第二引物的 3'端，所述第二随机序列位于所述第二引物的 5'端，并且，所述第

一特异性序列和所述第二特异性序列分别为针对靶序列的上游引物和下游引物，所述第一随机序列和所述第二随机序列反向互补，所述特异性探针的 5'末端连接有荧光基团，3'末端连接有淬灭基团，且所述特异性探针的序列与所述靶序列的上游引物和下游引物之间的序列互补配对。发明人惊奇地发现，本发明的组合中，该 PCR 引物对能有效降低 PCR 扩增过程中的 GC 偏向性，提高扩增特异性。具体地，用常规引物在二代测序文库 PCR 富集过程会带来一定的 GC 偏向性，而本发明的 PCR 引物对（有时也称为“锁定引物”）能有效降低文库 PCR 富集过程中的 GC 偏向性。进而，利用包含该 PCR 引物对及对应的特异性探针的组合进行 qPCR 时，相对于常规的 qPCR，特异性更强、扩增效率更高，用于 DNA 或 RNA 的定量分析、基因表达差异分析时，结果更加精确、可靠。并且本发明的组合用于 qPCR 多重扩增时具有非常好的均一性，对多位点 qPCR 检测具有一定的优势。

在本发明的第二方面，本发明提供了一种定量 PCR 扩增试剂盒。根据本发明的实施例，该试剂盒包含前面所述的用于定量 PCR 扩增的组合。根据本发明的实施例，相对于常规的 qPCR，利用包含本发明的组合进行 qPCR 时，特异性更强、扩增效率更高，用于 DNA 或 RNA 的定量分析、基因表达差异分析时，结果更加精确、可靠。并且本发明的组合用于 qPCR 多重扩增时具有非常好的均一性，对多位点 qPCR 检测具有一定的优势。

在本发明的第三方面，本发明提供了一种定量 PCR 扩增方法。根据本发明的实施例，该方法利用前面所述的用于定量 PCR 扩增的组合或者定量 PCR 扩增试剂盒进行所述定量 PCR 扩增。由此，利用该方法能够有效实现模板的定量 PCR 扩增。并且该方法能够增加定量 PCR 扩增的特异性，有效降低非特异性产物的产生，并提高扩增效率，进而能够提高定量结果的准确度。

在本发明的第四方面，本发明提供了一种对待测 DNA 样品进行定量分析的方法。根据本发明的实施例，该方法包括：根据前面所述的定量 PCR 扩增方法，将待测 DNA 样品进行荧光定量 PCR 扩增，并基于采集的荧光信号实现定量分析。由此，PCR 扩增的特异性好，扩增效率高，定量分析结果准确可靠。

在本发明的第五方面，本发明提供了一种对多个待测 DNA 样品进行特定基因的基因表达差异分析的方法。根据本发明的实施例，所述多个待测 DNA 样品均包含所述特定基因的 cDNA 序列，所述方法包括：根据前面所述的定量 PCR 扩增方法，分别将所述多个待测 DNA 样品进行荧光定量 PCR 扩增，并基于采集的荧光信号实现定量分析；以及比较多个待测 DNA 样品的定量分析结果，以便确定多个待测 DNA 样品的特定基因的基因表达差异。由此，基因表达差异分析的结果准确可靠。

根据本发明的实施例，本发明的包含一对 PCR 引物对和一条特异性探针的用于定量 PCR 扩增的组合物及其应用具有下列优点的至少之一：

1、本发明的 PCR 引物对的设计策略，简化了引物设计流程、优化了实验步骤，引物对的组成由 3'端的特异性序列和 5'端的随机序列（互补序列）组成，正反向引物通过互补序列形成一个稳定的二聚体结构，不需要满足常规引物严格的条件，大大简化了设计流程。该 PCR 引物对 5'端不需要特殊的优化就能达到一个很好的扩增效果，引物设计时间短。在

常规引物设计过程中需要避免引物 5'端和 5'端的互补、引物自身形成回文结构等，以保证引物之间不能形成二聚体结构和发生自身延伸进行 PCR。但本发明的 PCR 引物对的设计不需要考虑这些问题，因为锁定引物自身的结构就是 5'端互补稳定的二聚体且此时的二聚体的 3'端还能正常的和特异性序列进行互补发生延伸，而常规引物如果 5'端形成二聚体结构，3'端就没有足够的序列和特异性互补序列进行结合。并且，本发明的锁定引物 2 条引物之间形成 5'端互补序列的势能远远大于自身回文结构，所以就算 3'端和 5'端有互补的序列也会优先形成 5'端二聚体结构。

2、利用本发明的引物对进行 PCR 扩增能够增加 PCR 扩增的特异性，有效降低非特异性产物的产生；其从 PCR 的第二个循环开始，引物 5'端碱基（随机序列）和新生成的模板的 5'端的碱基反向互补结合，引物的 3'端特异性序列和新生成的模板 3'端的碱基反向互补结合，也即引物和模板结合识别位点为 2 个（如附图 2），由此，显著增加了引物和模板的结合能力，以及扩增的特异性。而引物和模板的结合率提高，扩增效率也得到了有效的提高。

3、利用本发明的 PCR 引物对进行 PCR 扩增，能够有效降低测序文库（尤其是二代测序文库）扩增中不同模板的 GC 偏向性，因为 PCR 扩增只有在模板变性后引物结合上去才能发生有效的扩增。GC 偏好性的产生，是因为在一些高 GC 区域，PCR 过程中模板复性很快，模板在引物还没有结合上去就复性了，导致这些区域不能进行有效扩增。而本发明的锁定引物和模板有 2 个结合位点，这样能够大大提高和模板的结合能力，进而能够有效结合那些高 GC 的模板，从而降低 GC 偏向性。

4、本发明的定量 PCR 扩增方法得到的产物为带缺口的类环状物（即该类环状物的 5'端和 3'端未连接），对于一些产物需要进行环化操作的实验来讲只需加入连接酶即可实现环化，不需要复杂的变性、淬火过程，能够有效简化实验流程。

5、本发明的定量 PCR 扩增方法，依赖于用于定量 PCR 扩增的组合物中的特殊设计的 PCR 引物对。相对于常规的 qPCR，利用本发明的组合物进行 qPCR 时，特异性更强、扩增效率更高，用于 DNA 或 RNA 的定量分析、基因表达差异分析时，结果更加精确、可靠；并且本发明的组合物用于 qPCR 多重扩增时具有非常好的均一性，对多位点 qPCR 检测具有一定的优势。

6、本发明的用于定量 PCR 扩增的组合物、定量 PCR 扩增试剂盒及定量 PCR 扩增方法，可广泛用于 DNA 或 RNA 的定量分析、基因表达差异分析、基因分型、病原体检测等领域。

本发明的附加方面和优点将在下面的描述中部分给出，部分将从下面的描述中变得明显，或通过本发明的实践了解到。

附图说明

本发明的上述和/或附加的方面和优点从结合下面附图对实施例的描述中将变得明显和容易理解，其中：

图 1 显示了根据本发明一个实施例，本发明的 PCR 引物对（即锁定引物）的结构示意图；

图 2 显示了根据本发明的实施例，本发明环状扩增中引物与新生成链的结合示意图；

图 3 显示了根据本发明的实施例，利用本发明的组合物进行定量 PCR 扩增的流程示意图；

图 4 显示了实施例 1 中，常规 SRY 引物 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳检测结果；

图 5 显示了实施例 1 中，PP 引物扩增荧光检测信号；

图 6 显示了实施例 1 中，常规引物扩增荧光检测信号；

图 7 显示了实施例 1 中，PP 引物 CT 值标准曲线图；

图 8 显示了实施例 1 中，常规引物 CT 值标准曲线图；

图 9 显示了实施例 2 中，各样本的 qPCR 荧光信号检测结果。

发明详细描述

下面详细描述本发明的实施例，所述实施例的示例在附图中示出。下面通过参考附图描述的实施例是示例性的，仅用于解释本发明，而不能理解为对本发明的限制。

需要说明的是，术语“第一”、“第二”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”的特征可以明示或者隐含地包括一个或者更多个该特征。进一步地，在本发明的描述中，除非另有说明，“多个”的含义是两个或两个以上。

用于定量 PCR 扩增的组合物

在本发明的第一方面，本发明提供了一种用于定量 PCR 扩增的组合物。根据本发明的实施例，该用于定量 PCR 扩增的组合物包括：一对 PCR 引物对和一条特异性探针，所述 PCR 引物对包括第一引物和第二引物，其中，所述第一引物包含第一特异性序列和第一随机序列，所述第一特异性序列位于所述第一引物的 3' 端，所述第一随机序列位于所述第一引物的 5' 端，所述第二引物包含第二特异性序列和第二随机序列，所述第二特异性序列位于所述第二引物的 3' 端，所述第二随机序列位于所述第二引物的 5' 端，并且，所述第一特异性序列和所述第二特异性序列分别为针对靶序列的上游引物和下游引物，所述第一随机序列和所述第二随机序列反向互补，所述特异性探针的 5' 末端连接有荧光基团，3' 末端连接有淬灭基团，且所述特异性探针的序列与所述靶序列的上游引物和下游引物之间的序列互补配对。发明人惊奇地发现，本发明的组合物中，该 PCR 引物对能有效降低 PCR 扩增过程中的 GC 偏向性，提高扩增特异性。具体地，用常规引物在二代测序文库 PCR 富集过程会带来一定的 GC 偏向性，而本发明的 PCR 引物对（有时也称为“锁定引物”）能有效降低文库 PCR 富集过程中的 GC 偏向性。进而，利用包含该 PCR 引物对及对应的特异性探针的组合物进行 qPCR 时，相对于常规的 qPCR，特异性更强、扩增效率更高，用于 DNA 或 RNA 的定量分析、基因表达差异分析时，结果更加精确、可靠。并且本发明的组合物用于 qPCR 多重扩增时具有非常好的均一性，对多位点 qPCR 检测具有一定的优势。

其中，需要说明的是，本发明的“第一随机序列”和“第二随机序列”可以是随机序列，也可以是固定序列，只要保证两者反向互补即可。

根据本发明的实施例，所述第一特异性序列和所述第二特异性序列的 TM 值为 55-65 摄氏度，所述第一引物和所述第二引物的 TM 值为 65-75 摄氏度。由此，能够使该 PCR 先进行第一轮低退火温度（55-65 摄氏度）的线状扩增，然后在后面的循环中采用高退火温度（65-72 摄氏度）——即进行第二轮环状扩增。由于在环状扩增过程中，该轮退火温度高，特异性序列不能够单独结合到特异性位点（特异性序列的 TM 值只有 55-65 摄氏度），只有当锁定引物的 5'端结合到模板的 5'端，同时该锁定引物的 3'端结合到模板的特异性位点，该 PCR 才能够进行有效的扩增，也即该轮扩增实际为双结合位点的环状扩增。

本发明的 PCR 引物对适用于针对任何形式的待测 DNA 样品进行 PCR 扩增和文库构建。其中，需要说明的是，在本发明中所述的“待测 DNA 样品”和常规的理解有些不同，常规理解不包含处理过的 DNA。但在本发明中，“待测 DNA 样品”可包括处理过的 DNA 以及未经处理的 DNA（在构建测序文库时，一般会针对样本的基因组 DNA 进行打断和加测序接头处理，以得到携带相应平台测序接头的 DNA 片段，再经过后续扩增等步骤后，得到的产物即可用于测序，该携带相应平台测序接头的 DNA 片段即为“处理过的 DNA 片段”，相应地，为经过上述处理的，即为“未经处理的 DNA”）。如果是针对未经处理的 DNA，利用本发明的 PCR 引物对扩增，即是针对特异目标片段进行扩增；若是针对处理过的 DNA，扩增的目标片段可以为整个基因组的 DNA 片段。

根据本发明的一些实施例，当待测 DNA 样品为处理过的、携带通用序列（例如测序接头）的 DNA 片段（这里的“通用序列”是用于与引物中特异序列配对的序列，包括测序平台接头序列，也即测序接头）时，相应地，所述第一特异性序列和所述第二特异性序列必须能够特异性识别携带通用序列的靶序列，换言之，实际上此时的靶序列实际为“通用序列+目标区域序列”；当待测 DNA 样品（也即 PCR 反应模板）为不携带通用序列的 DNA 片段时，相应地，所述第一特异性序列和所述第二特异性序列能够特异性识别该靶序列即可。并且，此时，如果需要构建测序文库，则可以在第一引物和第二引物的随机序列中或者特异性序列和随机序列之间设置测序接头序列（即通用序列），以便使 PCR 扩增产物上连接测序接头，进而能够有效用于测序平台。

根据本发明的另一些实施例，所述第一引物和所述第二引物的至少之一进一步包含标签序列，由此，可以同时多个样本进行 PCR 扩增，并基于所述标签序列对各个样本进行区分。其中，所述标签序列在第一引物和第二引物中的位置没有特别限制，只要能够使其发挥区分各样本的作用，且不影响 PCR 扩增进行即可。根据本发明的一些具体示例，所述标签序列可以位于特异性序列和随机序列之间，由此，可以在第一引物的第一特异性序列和第一随机序列之间设置一个标签序列，和/或，在第二引物的第二特异性序列和第二随机序列之间设置一个标签序列。根据本发明的另一个实施例，所述标签序列还可以被设置为包含于随机序列中，也即为随机序列的一部分。由此，同样能够使其发挥区分各样本的作用，且并不影响 PCR 扩增的进行。

根据本发明的实施例，所述第一随机序列和所述第二随机序列的长度为 16-30bp，所述第一特异性序列和所述第二特异性序列的长度为 16-30bp。

根据本发明的实施例，所述第一引物和所述第二引物的 5'末端和 3'末端的第 1-5 个碱基经过硫代修饰。由此，能够有效防止酶的外切。

5 根据本发明的一些实施例，硫代修饰的种类不受特别限制，只要能够防止第一引物和所述第二引物被酶外切（例如被具有 5'-3' 或 3'-5' 外切酶活性的降解）即可。根据本发明的一些具体示例，所述硫代修饰为选自硫代磷酸型修饰、甲基硫酸型修饰和肽核酸修饰的任意一种。

10 根据本发明的实施例，所述第一引物和所述第二引物的至少之一的 5'端经过磷酸化修饰。由此，经过两轮扩增得到的带有缺口的类环状物（即类环状物的 5'端和 3'端未连接），通过加入连接酶即可进行连接反应而形成完整的环状 DNA。也即，可以基于 qPCR 的产物制备环状 DNA 文库。

此外，需要说明的是，参照图 1 中本发明的 PCR 引物对的结构示意图可知，本发明的 PCR 引物对的设计策略是：在一对常规引物（包括正向引物、反向引物）的 5'端加上一段互补的序列，这段互补序列可以是一段随机序列也可以是一段固定序列，由此，即将 PCR 15 的一对引物设计成了 5'端反向互补，3'端突出的“锁定引物”（PadlockPrimer, PP），锁定引物的引物对之间形成了一个稳定的引物二聚体结构。整个引物对每条链的长度为 32-60bp，TM 值较高（第一引物和第二引物的 TM 值一般在 65-75 摄氏度），其中锁定引物的 5'端互补序列（即第一随机序列和第二随机序列）长度为 16-30bp，其序列可以是随机的也可以是固定的；3'端（即第一特异性序列和第二特异性序列）长度为 16-30bp，其和模板的靶序列互补，TM 值较低（一般为 55-65 摄氏度）。 20

另外，针对本发明的 PCR 引物对的应用问题，本发明的 PCR 引物对需要通过 2 个不同的扩增部分（即两轮扩增）来实现 PCR 扩增（参照图 3）：在第一个扩增部分，退火温度为 55-65℃，循环数为 1；在第二个扩增部分，退火温度为 65-72℃，循环数为 40-50。在第一个扩增部分中，PCR 引物对只能通过 3'端的特异性序列和模板结合，因此该循环的退火 25 温度低；在第二个扩增部分中，PCR 引物对先通过 5'端互补的序列（即第一随机序列和第二随机序列）和新生成的模板（即第一轮扩增的产物）结合，再通过 3'端的特异性序列（即第一特异性序列和第二特异性序列）和新生成的模板结合，也即引物和模板结合识别位点为 2 个，而 2 个锚定位点的结合大大提高了引物的退火温度，因此退火温度较高。

30 此外，需要说明的是，在第二个扩增部分中，引物 5'端和 3'端只有同时和新生成的模板结合时才能够进行有效的环状扩增，这样，2 个识别位点大大提高了该种 PCR 扩增的特异性，2 个结合位点大大提高了引物和模板的结合能力，提高了该 PCR 的扩增效率。由此，相对于传统 PCR 引物，采用本发明的 PCR 引物对进行 PCR 扩增，能够显著增加 PCR 扩增的特异性，有效降低非特异性产物的产生，并降低扩增过程中的 GC 偏向性。由此，在测序中尤其是二代测序文库中应用该种引物，可以有效降低文库富集扩增中全基因组范围内的 GC 偏向性。 35

并且,根据本发明的实施例,采用本发明的 PCR 引物对的 PCR 扩增可以应用于产物环化,得到的产物可以直接进行连接,得到环状 DNA。具体地,不需要进行额外的变性、淬火等步骤,产物只要加入连接反应体系即可成环,由此,能够大大简化成环的流程,进而简化环状 DNA 文库的制备流程。

5 根据本发明的实施例,所述特异性探针的序列长度为 18-30bp, T_M 值为 70-80 摄氏度。

应用

进而,在本发明的第二方面,本发明提供了一种定量 PCR 扩增试剂盒。根据本发明的实施例,该试剂盒包含前面所述的用于定量 PCR 扩增的组合物。根据本发明的实施例,相
10 对于常规的 qPCR,利用包含本发明的组合物进行 qPCR 时,特异性更强、扩增效率更高,用于 DNA 或 RNA 的定量分析、基因表达差异分析时,结果更加精确、可靠。并且本发明的组合物用于 qPCR 多重扩增时具有非常好的均一性,对多位点 qPCR 检测具有一定的优势。

进一步,本发明提出了组合物及包含它的试剂盒的应用。

在本发明的第三方面,本发明提供了一种定量 PCR 扩增方法。根据本发明的实施例,
15 该方法利用前面所述的用于定量 PCR 扩增的组合物或者定量 PCR 扩增试剂盒进行所述定量 PCR 扩增。由此,利用该方法能够有效实现模板的定量 PCR 扩增。并且该方法能够增加定量 PCR 扩增的特异性,有效降低非特异性产物的产生,并提高扩增效率,进而能够提高定量结果的准确度。

根据本发明的实施例,所述方法包括如下的两轮扩增:于 55-65 摄氏度的退火温度下,
20 在特异性探针存在时,使 PCR 引物对和模板进行第一轮线状扩增;以及于 65-72 摄氏度的退火温度下,对第一轮线状扩增的产物进行第二轮环状扩增。这样,从 PCR 的第二个循环(也即第二轮环状扩增)开始,第一引物和第二引物的 5'端碱基和新生成的模板 5'端的碱基反向互补结合,第一引物和第二引物的 3'端特异性碱基和新生成的模板 3'端的碱基反向互补结合,也即引物和模板结合识别位点为 2 个(如附图 2),从而能够增加 PCR 扩增的
25 特异性,并有效降低非特异性产物的产生。

根据本发明的实施例,所述方法的扩增反应程序如下:

步骤 1	98℃ 预热 2min
步骤 2	98℃ 变性 5s
步骤 3	55-65℃ 结合 30s
步骤 4	98℃ 变性 5s
步骤 5	65-72℃ 结合 30s
步骤 6	重复步骤 4-5: 40-50 个循环,并在步骤 5 进行荧光采集

由此,PCR 扩增过程中的 GC 偏向性低、扩增特异性高,扩增效果好。

在本发明的第四方面，本发明提供了一种对待测 DNA 样品进行定量分析的方法。根据本发明的实施例，该方法包括：根据前面所述的定量 PCR 扩增方法，将待测 DNA 样品进行荧光定量 PCR 扩增，并基于采集的荧光信号实现定量分析。由此，PCR 扩增的特异性好，扩增效率高，定量分析结果准确可靠。

5 在本发明的第五方面，本发明提供了一种对多个待测 DNA 样品进行特定基因的基因表达差异分析的方法。根据本发明的实施例，所述多个待测 DNA 样品均包含所述特定基因的 cDNA 序列，所述方法包括：根据前面所述的定量 PCR 扩增方法，分别将所述多个待测 DNA 样品进行荧光定量 PCR 扩增，并基于采集的荧光信号实现定量分析；以及比较多个待测 DNA 样品的定量分析结果，以便确定多个待测 DNA 样品的特定基因的基因表达差异。由此，基
10 因表达差异分析的结果准确可靠。

此外，本发明的定量 PCR 扩增方法得到的产物为带缺口的类环状物（即该类环状物的 5'端和 3'端未连接），对于一些产物需要进行环化操作的实验来讲只需加入连接酶即可实现环化，不需要复杂的变性、淬火过程，能够有效简化实验流程。

进而，在本发明的另一方面，本发明还提供了一种制备环状 DNA 文库的方法。根据本
15 发明的实施例，该方法包括以下步骤：

（1）根据前面所述的定量 PCR 扩增方法，将待测 DNA 样品进行定量 PCR 扩增，以便获得包含类环状物的扩增产物，其中，所述类环状物的 5'端和 3'端未连接，所述第一引物和所述第二引物的至少之一的 5'端经过磷酸化修饰，且所述第一引物和所述第二引物的 5'末端和 3'末端的第 1-5 个碱基经过硫代修饰；以及

20 （2）利用连接酶将所述扩增产物进行连接反应，以便使所述类环状物的 5'端和 3'端连接，形成环状 DNA，所有环状 DNA 构成所述环状 DNA 文库，

其中，当所述第一引物和所述第二引物的其中之一的 5'端经过磷酸化修饰时，所述环状 DNA 文库为单链环状 DNA 文库，当所述第一引物和所述第二引物的 5'端均经过磷酸化修饰时，所述环状 DNA 文库为双链环状 DNA 文库。

25 根据本发明的实施例，利用该方法能够有效制备单链或双链的环状 DNA 文库，并且，获得的单链或双链的环状 DNA 文库，文库质量好，用于 DNA 保存或文库测序时效果好。

根据本发明的实施例，进一步包括：（3）去除线性 DNA。由此，获得的文库质量好。

根据本发明的一些具体示例，利用线性消化反应去除线性 DNA。

根据本发明的实施例，在步骤（1）中，所述待测 DNA 样品两端添加有通用序列。如
30 前所述，本文所使用的表达方式“通用序列”是指用于与引物中特异序列配对的序列，包括测序平台接头序列，也即测序接头。由此，当待测 DNA 样品两端添加有通用序列例如测序接头时，获得的文库能够直接用于对应的测序平台进行上机测序。

下面将结合实施例对本发明的方案进行解释。本领域技术人员将会理解，下面的实施例仅用于说明本发明，而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件的，
35 按照本领域内的文献所描述的技术或条件（例如参考 J.萨姆布鲁克等著，黄培堂等译的《分

子克隆实验指南》，第三版，科学出版社）或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市购获得的常规产品，例如可以采购自 Illumina 公司。

实施例 1 PP-qPCR 扩增效率测试

1. qPCR 模板制备

- 5 取男性基因组 DNA 10ng(基因组来自美国 ATCC 公司,货号 Human genomic DNA (PC-3) (ATCC® CRL-1435D™)) 用常规 SRY 引物进行 PCR 扩增:

扩增体系如下:

10X 聚合酶反应缓冲液	2 ul
正向引物 SRY F (10 μ M)	0.5 ul
反向引物 SRY R (10 μ M)	0.5 ul
dNTP	0.5 ul
反应酶	0.2 ul
DNA 模板	0.2 ul
水	16.1 ul
总共	20ul

引物 SRY F、SRY R 序列见下表 4。

反应条件如下:

步骤 1	98°C 2min
步骤 2	98°C 10s
步骤 3	58°C 30s
步骤 4	72°C 30s
步骤 5	重复 3-4 步骤, 30 次
步骤 6	72°C 5min
步骤 7	16°C hold

10 2. 产物质检

得到的 PCR 产物经过 XP Beads 纯化(美国贝克曼公司 Agencourt AMPure XP, 货号: A63880), 纯化后进行琼脂糖电泳(见图 4), 质检合格的 PCR 产物, 备用

如图 4 所示, 条带 NTC 为阴性对照(水为模板), 条带 1、2 为男性 DNA 扩增得到的产物, 产物大小 79bp, 检测合格。

15 3. qPCR 扩增效率测试

取步骤 2 得到的产物在通风处分别稀释 10 倍、100 倍、1000 倍、10000 倍和 100000 倍 5 个梯度，待用，得到 DNA 分别为原模板浓度的 10%，1%，0.1%，0.01%，0.001%；

取上述得到的梯度模板分别用 PP 引物（引物 PP-SRY F 和 PP-SRY R，引物序列见下表 4，结构示意图如图 1）和常规引物（引物 SRY F 和 SRY R，序列见下表 4）进行 qPCR 反 5 应，每个梯度重复三个反应，两种引物及其探针序列如表 4。

用 takara 公司的 Premix Ex Taq™（货号 RR390A）试剂盒进行 qPCR 反应，反应体系如下：

锁定引物反应体系：

2X Premix Ex Taq MIX	10 μ l
正向引物 PP-SRY F（10 μ M）	0.5 μ l
反向引物 PP-SRY R（10 μ M）	0.5 μ l
探针 SRY Probe（10 μ M）	1 μ l
DNA 模板	1 μ l
水	7 μ l
总共	20 μ l

10 常规引物反应体系：

2X Premix Ex Taq MIX	10 μ l
正向引物 SRY F（10 μ M）	0.5 μ l
反向引物 SRY R（10 μ M）	0.5 μ l
探针 SRY Probe（10 μ M）	1 μ l
DNA 模板	1 μ l
水	7 μ l
总共	20 μ l

在 ABI 公司的 Stepone 上进行 qPCR 反应，反应条件如下：

锁定引物反应条件：

步骤 1	98°C 2min
步骤 2	98°C 5s
步骤 3	58°C 30s

步骤 4	98℃ 5s
步骤 5	68℃ 30s
步骤 6	重复步骤 4-5: 40 个循环, 在步骤 5 进行荧光采集

常规引物反应条件:

步骤 1	98℃ 2min
步骤 2	98℃ 5s
步骤 3	65℃ 30s
步骤 4	重复步骤 2-3: 40 个循环, 在步骤 5 进行荧光采集

其中, 利用本发明的 PP 引物进行 qPCR 扩增的流程如图 3 所示。

- 5 两种引物的检测结果见图 5-图 6。其中, 图 5 为 PP 引物扩增荧光检测信号, 图 6 为常规引物扩增荧光检测信号。

表 1 PP 引物 CT 值:

模板	1	2	3	CT SD	平均 CT
0	未检测到	未检测到	未检测到	未检测到	未检测到
0.001%	30.92	31.01	30.87	0.07	30.93
0.01%	27.49	27.42	27.45	0.04	27.45
0.1%	24.06	24.05	24.06	0.00	24.06
1%	20.64	20.76	20.73	0.06	20.71
10%	17.43	17.58	17.53	0.08	17.51

根据表 1 的统计数值绘制标准曲线, 结果见图 7。即图 7 显示了 PP 引物标准曲线。如图 7 所示, PP 引物扩增效率 $E=10^{-1/K}=1.9876$ 。

- 10 表 2 常规引物 CT 值:

模板	1	2	3	CT SD	平均 CT
0	未检测到	未检测到	未检测到	未检测到	未检测到
0.001%	32.73	32.99	32.88	0.13	32.87
0.01%	29.24	29.26	29.33	0.04	29.28
0.1%	25.82	25.87	25.86	0.03	25.85
1%	22.82	22.59	22.67	0.11	22.69
10%	19.34	19.34	19.51	0.10	19.40

根据表 2 的统计数值绘制标准曲线, 结果见图 8。即图 8 显示了常规引物标准曲线。如图 8 所示, 常规引物扩增效率 $E=10^{-1/K}=1.9872$ 。

结论：PP 引物在相同浓度模板检测中，荧光检测 CT 值比常规引物提前 2 个，扩增效率略高于常规引物。

实施例 2 PP-qPCR 对低孕周孕妇血浆游离 DNA 中胎儿特异性 Y 染色体的鉴定

1. 引物设计

在 Y 染色体上的特异性基因 SRY 和 DSY14 上设计两对锁定引物（即 PP 引物，引物结构示意图如图 1）及对应的探针，在常染色体上 GADPH 基因上设计一对锁定引物和探针作为实验和定量对照，各锁定引物及对应探针的序列见表 4。其中，Y 染色体上特异的探针标记的荧光基团和淬灭基团分别为 FAM 和 BHQ1，GADPH 基因上的探针标记的荧光基团和淬灭基团分别为 HEX 和 BHQ1，用这 3 对引物进行一个多重 qPCR 对血浆中胎儿特异性 Y 染色体进行鉴定。

2. qPCR 模板制备

挑选孕周分别为 6/8/10 周的孕妇血浆 600ul，不同孕周男女胎各一例，用 Qiagen 血浆游离 DNA 抽提试剂盒抽提（QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit, 货号 Cat No./ID: 55114），得到的血浆游离 DNA 溶于 25ul AE 中，用 PP 引物进行 qPCR 反应，其中本试验以水为对照。

其中，利用本发明的 PP 引物进行 qPCR 扩增的流程如图 3 所示。

具体地，用 Takara 公司的 Premix Ex Taq™（RR390A）试剂盒进行 qPCR 反应，反应体系如下：

2X Premix Ex Taq MIX	25 ul
正向引物混合物（10uM）	1 ul
反向引物混合物（10uM）	1 ul
探针混合物（10uM）	2 ul
cfDNA 模板	21 ul
总共	50ul

备注：正向引物混合物（10μM）：PP-SRY F、PP-DSY14 F 和 PP-GADPH F 混合物，各引物浓度分别为 10μM；

反向引物混合物（10μM）：PP-SRY R、PP-DSY14 R 和 PP-GADPH R 混合物，各引物浓度分别为 10μM；

探针混合物：SRY-Probe、DSY14-Probe 和 GADPH-Probe 混合物，各探针浓度分别为 μM）

在 ABI 公司的 Stepone 上进行 qPCR 反应，反应条件如下：

步骤 1	98℃ 2min
步骤 2	98℃ 5s
步骤 3	58℃ 30s
步骤 4	98℃ 5s
步骤 5	68℃ 30s
步骤 6	重复步骤 4-5, 50 个循环, 在步骤 5 进行荧光采集

荧光信号检测结果见图 9。

qPCR 检测得到的 CT 值如下表 3:

表 3

样本	FAM CT	HEX CT	样本	FAM CT	HEX CT
水	未检测到	未检测到	水	未检测到	未检测到
6 周男胎	35.63	26.23	6 周女胎	未检测到	26.35
8 周男胎	34.29	26.44	8 周女胎	未检测到	26.49
10 周男胎	32.84	26.12	10 周女胎	未检测到	26.77

5

结论: 6 个样本中均可以检测到 HEX 荧光, 且 CT 值相差不大, 说明 cfDNA 均抽提成功, 且总 cfDNA 的量相差不大; 水中没有检测到荧光; 其中, 三个男胎血浆样本均可检测到 FAM 荧光, 且随着孕周的增加 CT 值有下降, 三个女胎血浆样本均未检测到 FAM 荧光; 该方法可以通过低至 6 周的孕妇血浆游离 DNA 正确检测胎儿性别。

10

表 4 引物序列

引物标号	序列 (5'-3', SEQ ID NO:)
PP-SRY F	C-s-CCGCCCCTAGCCCGGGGCAATGTTACCCGATTGTC-s-C(1)
PP-SRY R	C-s-CCCGGGCTACGGGCGGGATCAACGCAGCCAGCTC-s-A(2)
SRY F	CCAATGTTACCCGATTGTCC(3)
SRY R	ATCAACGCAGCCAGCTCA(4)
SRY-Probe	FAM-GGCTGTAGCGGTCCCGTTGCTGC-BHQ1(5)
PP-DSY14 F	G-s-CCGCGCGTACGGCGGGGCTGAGGGCTCGCTGACCTA-s-C(6)
PP-DSY14 R	C-s-CCCGCCGTACGCGCGGCCACCCACGCCACAGAAAC-s-C(7)
DSY14-Probe	FAM-GGTGCCAGAGAGGCTGCGG-BHQ1(8)
PP-GADPH F	G-s-CCCGCGGTTGCCGGCCGTCGTCGCCACATAGGAAT-s-C(9)
PP-GADPH R	C-s-GGCCGGCAACCGCGGGCGTGCTCAGGGCTTCTTGTC-s-C(10)

GADPH-Probe	HEX-TGCCCACCATCACGCCCTG-BHQ1(11)
-------------	----------------------------------

备注：F：正向引物；R：反向引物

上表中各引物序列以下划线标注的部分为互补序列。

工业实用性

- 5 本发明的用于定量 PCR 扩增的组合物，能够有效地用于待测 DNA 样品的定量 PCR 扩增，并且相对于常规 qPCR，特异性更强、扩增效率更高，用于 DNA 或 RNA 的定量分析、基因表达差异分析时，结果更加精确、可靠。并且本发明的组合物用于 qPCR 多重扩增时具有非常好的均一性，对多位点 qPCR 检测具有一定的优势。

- 10 尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述，本领域技术人员将会理解。根据已经公开的所有教导，可以对那些细节进行各种修改和替换，这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

- 15 在本说明书的描述中，参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示意性实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中，对上述术语的示意性表述不一定指的是相同的实施例或示例。而且，描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任何的一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。

权利要求书

1、一种用于定量 PCR 扩增的组合物，其特征在于，包括：一对 PCR 引物对和一条特异性探针，

5 所述 PCR 引物对包括第一引物和第二引物，
其中，

所述第一引物包含第一特异性序列和第一随机序列，所述第一特异性序列位于所述第一引物的 3'端，所述第一随机序列位于所述第一引物的 5'端，

10 所述第二引物包含第二特异性序列和第二随机序列，所述第二特异性序列位于所述第二引物的 3'端，所述第二随机序列位于所述第二引物的 5'端，
并且，

所述第一特异性序列和所述第二特异性序列分别为针对靶序列的上游引物和下游引物，所述第一随机序列和所述第二随机序列反向互补，

15 所述特异性探针的 5'末端连接有荧光基团，3'末端连接有淬灭基团，且所述特异性探针的序列与所述靶序列的上游引物和下游引物之间的序列互补配对。

2、根据权利要求 1 所述的组合物，其特征在于，所述第一特异性序列和所述第二特异性序列的 TM 值为 55-65 摄氏度，所述第一引物和所述第二引物的 TM 值为 65-75 摄氏度。

3、根据权利要求 1 所述的组合物，其特征在于，所述第一随机序列和所述第二随机序列的长度为 16-30bp，所述第一特异性序列和所述第二特异性序列的长度为 16-30bp。

20 4、根据权利要求 1 所述的组合物，其特征在于，所述第一引物和所述第二引物的 5'末端和 3'末端的第 1-5 个碱基经过硫代修饰。

5、根据权利要求 4 所述的组合物，其特征在于，所述硫代修饰为选自硫代磷酸型修饰、甲基硫酸型修饰和肽核酸修饰的任意一种。

25 6、根据权利要求 1 所述的组合物，其特征在于，所述第一引物和所述第二引物的至少之一的 5'端经过磷酸化修饰。

7、根据权利要求 1 所述的组合物，其特征在于，所述特异性探针的序列长度为 18-30bp，TM 值为 70-80 摄氏度。

8、一种定量 PCR 扩增试剂盒，其特征在于，包含权利要求 1-7 任一项所述的用于定量 PCR 扩增的组合物。

30 9、一种定量 PCR 扩增方法，其特征在于，利用权利要求 1-7 任一项所述的用于定量 PCR 扩增的组合物或者权利要求 8 所述的定量 PCR 扩增试剂盒进行所述定量 PCR 扩增。

10、根据权利要求 9 所述的方法，其特征在于，所述方法包括如下的两轮扩增：

于 55-65 摄氏度的退火温度下，在特异性探针存在时，使 PCR 引物对和模板进行第一轮线状扩增；以及

35 于 65-72 摄氏度的退火温度下，对第一轮线状扩增的产物进行第二轮环状扩增。

11、根据权利要求 10 所述的方法，其特征在于，所述方法的扩增反应程序如下：

步骤 1	98℃ 预热 2min
步骤 2	98℃ 变性 5s
步骤 3	55-65℃ 结合 30s
步骤 4	98℃ 变性 5s
步骤 5	65-72℃ 结合 30s
步骤 6	重复步骤 4-5：40-50 个循环，并在步骤 5 进行荧光采集

12、一种对待测 DNA 样品进行定量分析的方法，其特征在于，包括：

根据权利要求 9-11 任一项所述的方法，将待测 DNA 样品进行荧光定量 PCR 扩增，并基于采集的荧光信号实现定量分析。

5 13、一种对多个待测 DNA 样品进行特定基因的基因表达差异分析的方法，其特征在于，所述多个待测 DNA 样品均包含所述特定基因的 cDNA 序列，所述方法包括：

根据权利要求 9-11 任一项所述的方法，分别将所述多个待测 DNA 样品进行荧光定量 PCR 扩增，并基于采集的荧光信号实现定量分析；以及

10 比较多个待测 DNA 样品的定量分析结果，以便确定多个待测 DNA 样品的特定基因的基因表达差异。



图 1

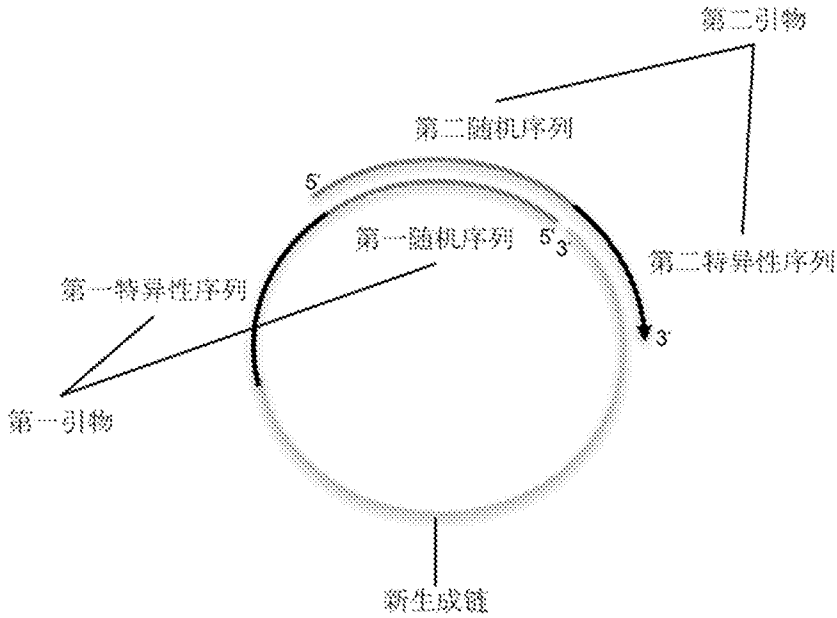


图 2

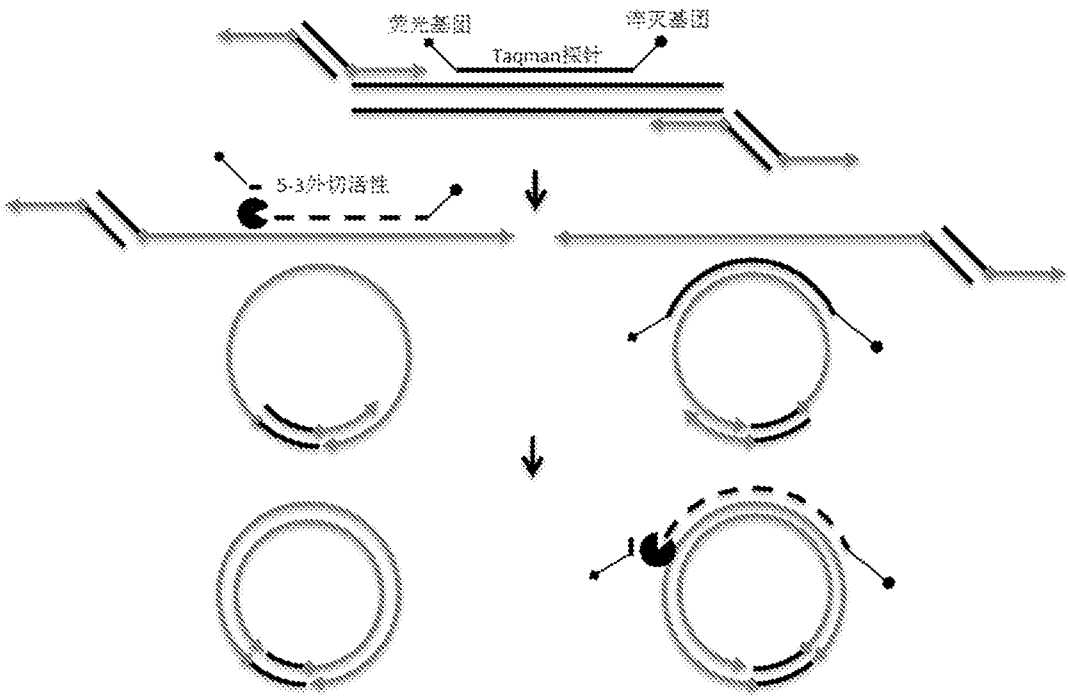


图 3

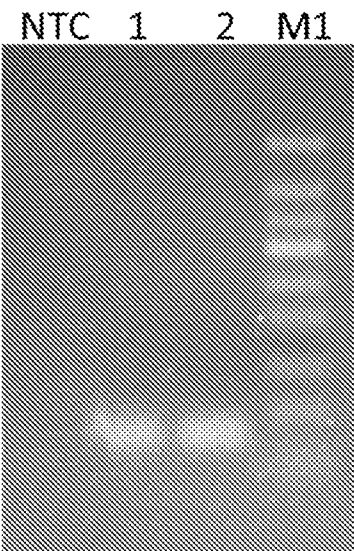


图 4

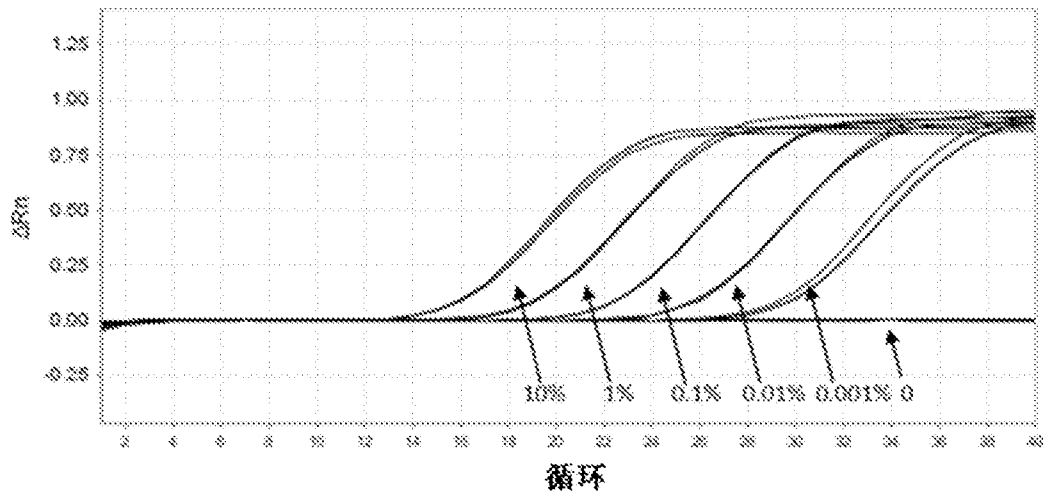


图 5

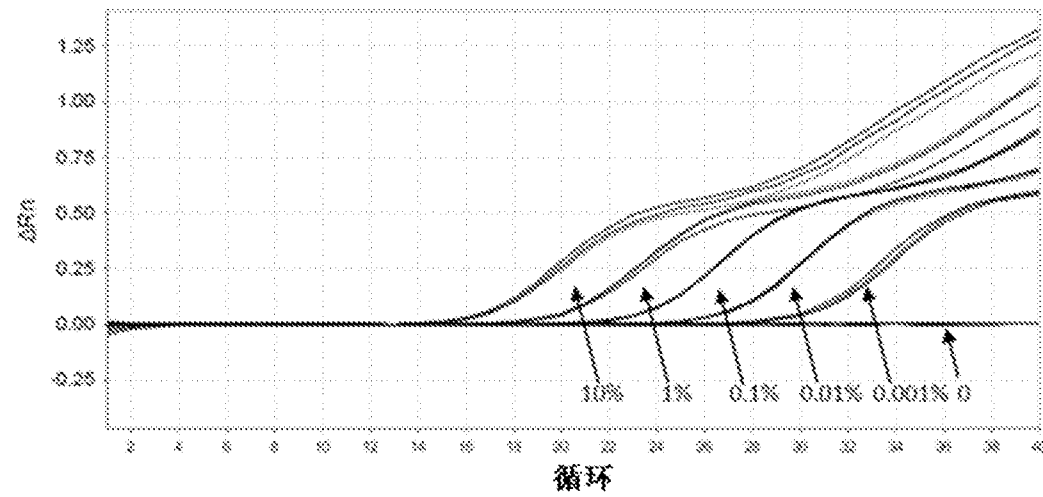


图 6

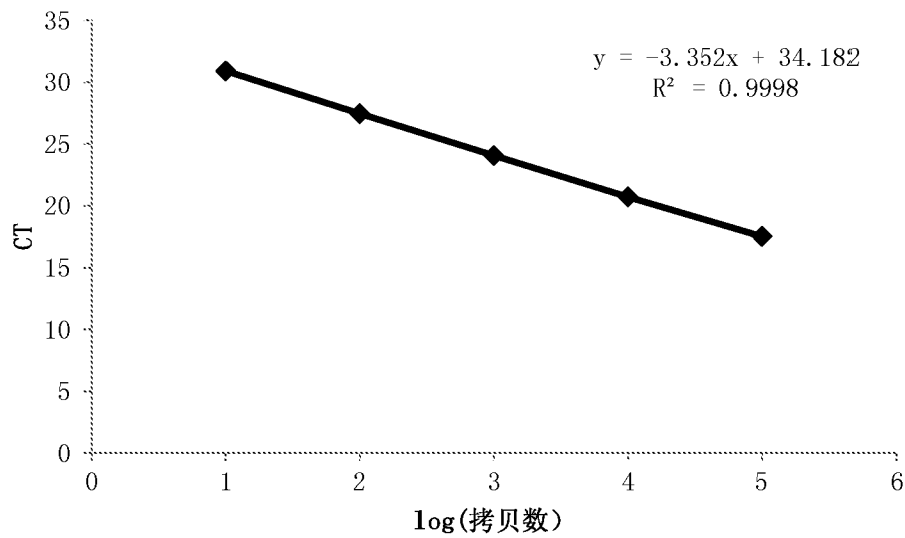


图 7

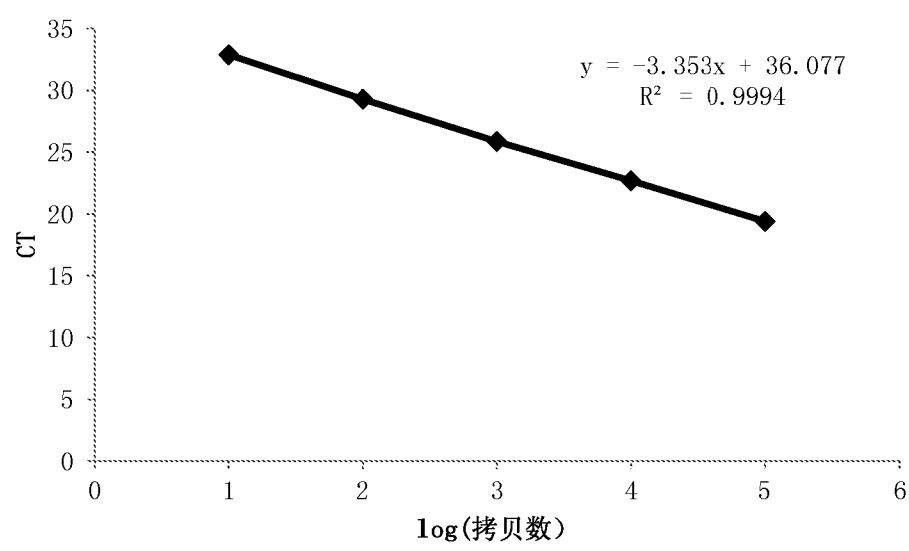


图 8

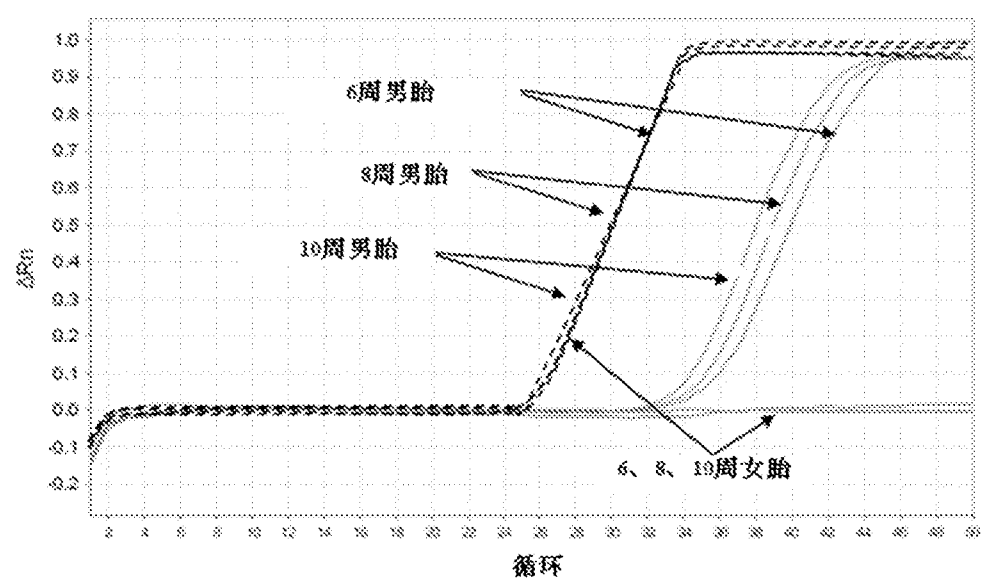


图 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/089198

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/68 (2018.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q; 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)

CNMED; CPRSABS; CNABS; DWPI; SIPOABS; CNTXT; WOTXT; EPTXT; JPTXT; CNKI; Pubmed; Google scholar: 第一, 第二, 上游, 下游, 引物, 单链寡核苷酸, 扩增, 互补, 特异, 随机, 区域, 序列, 探针, 实时定量, 荧光, 探针, 环状, 成环, GC 含量, GC 偏向, 分子标签, 条码, 标记, 测序, 文库, first, second, upstream, downstream, single-stranded oligonucleotide, primer, amplif+, complementary, specific, random, universal, common, variable, region, sequence, realtime, real-time, quantitative, fluorescen+, taqman, probe, loop, looping, GC-rich, marker, barcode, sequencing, library

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 101809170 A (3M INNOVATIVE PROPERTIES COMPANY), 18 August 2010 (18.08.2010), see entire document	1-13
A	ZONG, C. et al. "Genome-Wide Detection of Single Nucleotide and Copy Number Variations of a Single Human Cell.", Science., 338(6114), 21 December 2012 (21.12.2012), pages 1622-1626, see entire document	1-13

☐ 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	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 06 March 2018	Date of mailing of the international search report 20 March 2018
Name and mailing address of the ISA 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 LI, Kangqi Telephone No. (86-10) 62411034

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/089198

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101809170 A	18 August 2010	US 8652812 B2	18 February 2014
		WO 2009042851 A1	02 April 2009
		EP 2209909 B1	13 April 2011
		AT 505562 T	15 April 2011
		JP 5432154 B2	05 March 2014
		US 8313931 B2	20 November 2012
		US 2010203537 A1	12 August 2010
		US 2013171635 A1	04 July 2013
		CN 101809170 B	20 August 2014
		EP 2209909 A1	28 July 2010
		JP 2010539940 A	24 December 2010
		CA 2700532 A1	02 April 2009
		DE 602008006254 D1	26 May 2011

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/089198

A. 主题的分类

C12Q 1/68(2018.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12Q; 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))

CNMED; CPRSABS; CNABS; DWPI; SIPOABS; CNTXT; WOTXT; EPTXT; JPTXT; CNKI; Pubmed; Google scholar: 第一, 第二, 上游, 下游, 引物, 单链寡核苷酸, 扩增, 互补, 特异, 随机, 区域, 序列, 探针, 实时定量, 荧光, 探针, 环状, 成环, GC含量, GC偏向, 分子标签, 条码, 标记, 测序, 文库, first, second, upstream, downstream, single-stranded oligonucleotide, primer, amplif+, complementary, specific, random, universal, common, variable, region, sequence, realtime, real-time, quantitative, fluorescent+, taqman, probe, loop, looping, GC-rich, marker, barcode, 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
A	CN 101809170 A (3M创新有限公司) 2010年 8月 18日 (2010 - 08 - 18) 参见全文	1-13
A	ZONG C. 等. "Genome-Wide Detection of Single Nucleotide and Copy Number Variations of a Single Human Cell." Science., 第338卷, 第6114期, 2012年 12月 21日 (2012 - 12 - 21), 第1622 - 1626页 参见全文	1-13

☐ 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

2018年 3月 6日

国际检索报告邮寄日期

2018年 3月 20日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局 (ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10) 62019451

受权官员

李康琦

电话号码 (86-10) 62411034

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/089198

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	101809170	A	2010年 8月 18日	US	8652812	B2	2014年 2月 18日
				WO	2009042851	A1	2009年 4月 2日
				EP	2209909	B1	2011年 4月 13日
				AT	505562	T	2011年 4月 15日
				JP	5432154	B2	2014年 3月 5日
				US	8313931	B2	2012年 11月 20日
				US	2010203537	A1	2010年 8月 12日
				US	2013171635	A1	2013年 7月 4日
				CN	101809170	B	2014年 8月 20日
				EP	2209909	A1	2010年 7月 28日
				JP	2010539940	A	2010年 12月 24日
				CA	2700532	A1	2009年 4月 2日
				DE	602008006254	D1	2011年 5月 26日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)