

# (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  
2019年6月20日 (20.06.2019)



(10) 国际公布号  
**WO 2019/114049 A1**

(51) 国际专利分类号:  
*C12Q 1/689* (2018.01) *C12N 15/11* (2006.01)  
*C12Q 1/6869* (2018.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2017/120443

(22) 国际申请日: 2017年12月31日 (31.12.2017)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:  
201711317948.X 2017年12月12日 (12.12.2017) CN

(71) 申请人: 苏州普瑞森基因科技有限公司(SUZHOU PRECISION GENE CO. LTD) [CN/CN]; 中国江苏省苏州市苏州工业园区星湖街218号生物纳米园A5楼505单元, Jiangsu 215026 (CN)。

(72) 发明人: 朱永亮(ZHU, Yongliang); 中国江苏省苏州市苏州工业园区星湖街218号生物纳米园A5楼505单元, Jiangsu 215026 (CN)。 穆延召(MU,

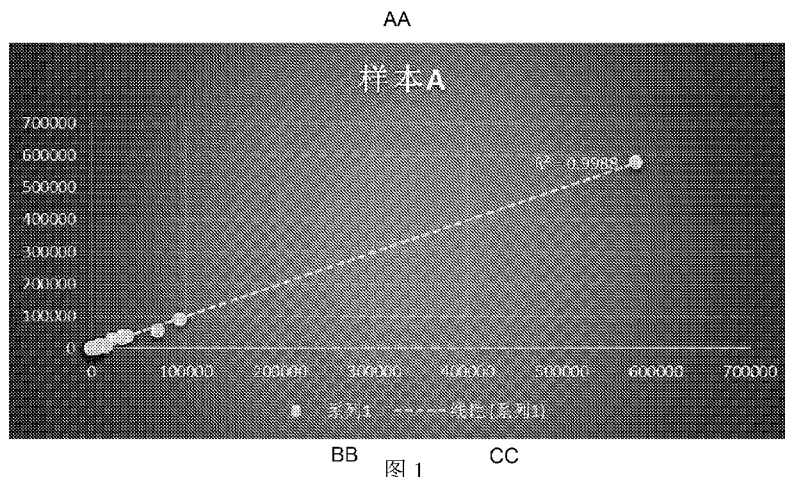
Yanzhao); 中国江苏省苏州市苏州工业园区星湖街218号生物纳米园A5楼505单元, Jiangsu 215026 (CN)。 周燕(ZHOU, Yan); 中国江苏省苏州市苏州工业园区星湖街218号生物纳米园A5楼505单元, Jiangsu 215026 (CN)。

(74) 代理人: 北京品源专利代理有限公司(BEYOND ATTORNEYS AT LAW); 中国北京市海淀区莲花池东路39号西金大厦6层, Beijing 100036 (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,

(54) Title: PRIMER COMPOSITION FOR ANALYZING INTESTINAL FLORA AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 一种用于分析肠道微生物的引物组合物及其应用



AA Sample A  
BB Series 1  
CC Linear (series 1)

(57) Abstract: The present invention provides a primer composition for analyzing intestinal flora, a detection kit composed thereof, and an application of the same. The present invention employs two-step amplification to obtain a sequencing library, and the primer composition comprises a random base.

(57) 摘要: 本发明提供了一种用于分析肠道微生物的引物组合物、其组成的检测试剂盒及其应用, 其中采用两步法扩增获得测序文库, 其中包含了随机碱基。



WO 2019/114049 A1

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)。

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))。

## 一种用于分析肠道微生物的引物组合物及其应用

### 技术领域

本申请属于分子生物学领域，涉及一种用于分析肠道微生物的引物组合物及其应用，具体涉及通过两轮 PCR 构建文库，分析分类肠道微生物的引物组合物，其组成的检测试剂盒及应用。

### 背景技术

动物胃肠道内庞大多样的微生物群落与动物的食性、机体的免疫功能、疾病与健康等有着密切联系，越来越引起重视并成为研究热点。然而采用传统方法破坏性的采集胃肠道样品对其进行研究受到很大制约，且对于野生保护动物并不可取，因此很多研究都以动物的粪便作为研究样品。

科学家们还发现，不同国家人群中的肠道微生物存在很多差异，差异最显著的是微生物的多样性程度。例如：印第安人和马拉维人的肠道微生物组比美国人的肠道微生物具有更大的多样性。有观点认为，微生物多样性程度越高，人体越健康。该研究还发现，尽管来自三种不同地域人群的肠道微生物组存在很多差异，但它们之间也存在惊人的相似性。如，三个不同国家的婴儿微生物组形成过程具有共同的模式，即婴儿需要 6-9 个月的时间来获得第一组 6-700 个细菌，然后再经过几年的时间才能获得成人的微生物组。该研究还发现了一个非常有趣的现象，即肠道微生物组的构成会随年龄增长而发生改变，而这一变化恰恰适应了不同年龄段人体的需求。

肠道微生物的研究大体经历了培养依赖的方法，非培养依赖的传统分子生物学方法，基于测序的高通量组学方法 3 个阶段。

通过比较 3 个阶段研究方法的特点与应用，人们可以发现培养依赖的方法

在鉴定菌种的同时即可获得相应菌株，方便后续研究，但培养法本身费时费力，肠道微生物以厌氧菌和兼性厌氧菌为主，培养起来更加困难，并且在培养的过程中菌种比例会发生改变，使得其应用存在瓶颈。非培养依赖的传统分子生物学方法可以不经培养直接从样品中提取肠道微生物基因组，利用分子生物学手段进行分离、鉴定和定量，使其结果可以比较准确的反应肠道微生物中高丰度菌种的组成和真实比例。

但是传统分子生物学方法存在着通量低的缺陷，靶向方法如实时定量 PCR 每次只能研究一种或一类肠道微生物，而非靶向方法如最常用的梯度变形凝胶电泳( Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE )受限于灵敏度，往往只能研究肠道中高丰度的微生物。肠道微生物群落组成复杂，每种细菌都与其他细菌形成复杂的相互关系网络，低丰度的菌种同样扮演者重要的角色，所以传统分子生物学研究结果往往具有片面性。

16SrDNA 因其序列在物种间的高度多样性，成为细菌分类学研究的“分子钟”，具 9 个可变区和 10 个保守区间隔排列的特征，可变区因细菌而异，且变异程度与细菌的系统发育密切相关。因此通过分析可变区的序列即可得到各细菌的分类学特征。

CN 105937053 A 公开了一种基于高通量基因测序建立粪便菌群基因文库的方法，该方法采用“巢式 PCR”的方法对以 16S rDNA 进行富集扩增，最大限度减少了宿主和食物残渣基因组污染，同时将 V3 和 V6 组合，进行特异扩增并进行大规模并行测序，获得菌群的靶标基因序列库。CN 107058490 A 公开了一种基于新一代高通量测序技术的肠道及口腔菌群多样性及差异性的分析方法，该方法利用 illumina MiSeq 测序系统进行测序，从而分析菌群的组成与功能。

但构建的文库覆盖率不够高，检测灵敏度较低。

基于上述问题，如何设计引物，能够尽可能全面覆盖所述样本的微生物，提高检测的特异性和灵敏度，就成为亟待解决的问题。

## 发明内容

针对现有技术的不足，本申请提供了一种分析肠道微生物的引物组合物及其应用，本申请引物组合物采用两步法扩增获得测序文库，其中包含了随机碱基，增加了文库序列的复杂度，降低了 phix 的比例，保证更多测序质量，提高了文库的覆盖度。

第一方面，本申请提供了一种用于分析肠道微生物的引物组合物，其包含：

第一组引物，所述第一组引物包含第一正向引物和第一反向引物，其中，所述第一正向引物从 5' 到 3' 端包括依次相连的四个部分：第一测序通用引物、2bp 的随机碱基序列、linker 序列和肠道微生物 16S rRNA V3-V4 区特异性正向引物；所述第一反向引物从 5' 到 3' 端包括依次相连的四个部分：第二测序通用引物、2bp 的随机碱基序列、linker 序列和肠道微生物 16S rRNA V3-V4 区特异性反向引物；

第二组引物，所述第二组引物包含第二正向引物和第二反向引物，其中，所述第二正向引物从 5' 到 3' 端包括依次相连的三个部分：P5 端接头序列、第一标签序列和第一测序通用引物的部分序列；所述第二反向引物从 5' 到 3' 端包括依次相连的三个部分：P7 端接头序列、第二标签序列和第二测序通用引物的部分序列。

本申请中，发明人发现，通过采用两步法扩增获得测序文库，所述第一组引物包含 V3-V4 位点特异性简并引物，提高了扩增片段覆盖率、检测特异性及

灵敏度，结合数据分析，可获得更丰富的微生物组信息，此外，所述第一组引物包含 2bp 的随机碱基，增加了文库序列的复杂度，降低了 phix 的比例，保证更多测序质量，第一组引物还包含 2bp 不与 16S 基因组序列同源的 Linker 序列，降低了 PCR 扩增偏好性；第二组引物包含双 index（标签）的设计，可以更大程度地混合更多的样本。

根据本申请，所述第一测序通用引物和所述第二测序通用引物独立地选自任意一种二代测序平台的测序通用引物，本申请采用 illumina 平台的测序通用引物。

根据本申请，所示 linker 序列的长度为 2-5bp，例如可以是 2bp、3 bp、4 bp 或 5 bp，优选为 2bp。

根据本申请，所述第一正向引物的核酸序列如 SEQ ID NO.1 所示，所述第一反向引物的核酸序列如 SEQ ID NO.2 所示，所述核酸序列如下：

第一正向引物（SEQ ID NO.1）：  
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNTGCCTACGGRRBGC  
ASCAGKVRVGAAT；

第一反向引物（SEQ ID NO.2）：  
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNNGGGGACTACNVGG  
GTWTCTAATCC；

其中，N 表示为 A\T\G\C 中的任意一个碱基。

根据本申请，所述 P5 端接头序列的核酸序列如 SEQ ID NO.3-12 所示，所述核酸序列如下：

	序列	接头名称
SEQ ID NO.3	CTCTCTAT	S502

SEQ ID NO.4	TATCCTCT	S503
SEQ ID NO.5	GTAAGGAG	S505
SEQ ID NO.6	ACTGCATA	S506
SEQ ID NO.7	AAGGAGTA	S507
SEQ ID NO.8	CTAAGCCT	S508
SEQ ID NO.9	CGTCTAAT	S510
SEQ ID NO.10	TCTCTCCG	S511
SEQ ID NO.11	TCGACTAG	S513
SEQ ID NO.12	TTCTAGCT	S515

根据本申请, 所述 P7 端接头序列的核酸序列如 SEQ ID NO.13-22 所示, 所述核酸序列如下:

	序列	接头名称
SEQ ID NO.13	TCGCCTTA	N701
SEQ ID NO.14	CTAGTACG	N702
SEQ ID NO.15	TTCTGCCT	N703
SEQ ID NO.16	GCTCAGGA	N704
SEQ ID NO.17	AGGAGTCC	N705
SEQ ID NO.18	CATGCCTA	N706
SEQ ID NO.19	GTAGAGAG	N707
SEQ ID NO.20	CAGCCTCG	N710
SEQ ID NO.21	TGCCTCTT	N711
SEQ ID NO.22	TCCTCTAC	N712

根据本申请, 所述第二正向引物的第一标签序列如 SEQ ID NO.23 所示, 所述核酸序列如下:

第一标签序列 ( SEQ ID NO.23 ) :  
AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC.

根据本申请, 所述第二正向引物的第一测序通用引物的部分序列如 SEQ ID

NO.24 所示，所述核酸序列如下：

第一测序通用引物的部分序列（SEQ ID NO.24）：TCGTCGGCAGCGTC.

根据本申请，所述第二反向引物的标签序列如 SEQ ID NO.25 所示，所述核酸序列如下：

第二标签序列（SEQ ID NO.25）：CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT.

根据本申请，所述第二反向引物的第二测序通用引物的部分序列如 SEQ ID NO.26 所示，所述核酸序列如下：

第二测序通用引物的部分序列（SEQ ID NO.26）：GTCTCGTGGGCTCGG.

本申请中，所述第二正向引物通过 SEQ ID NO.23 所示的第一标签序列+P5 接头+ SEQ ID NO.24 所示的第一测序通用引物的部分序列组合得到，例如可以是

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC-CTCTCTAT-TCGTCGGCAGCGTC; 所述第二反向引物通过 SEQ ID NO.25 所示的第二标签序列+P7 接头+ SEQ ID NO.26 所示的第二测序通用引物的部分序列组合得到，例如可以是 CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT-TCGCCTTA-GTCTCGTGGGCTCGG.

第二方面，本申请提供一种分析肠道微生物的试剂盒，其包括如第一方面所述的引物组合物。

第三方面，本申请提供一种肠道微生物的分析方法，采用如第一方面所述的引物组合物，包括如下步骤：

(1) 样本基因组 DNA 的提取；

(2) 扩增子文库的构建：进行两轮 PCR 扩增，第一轮 PCR 扩增采用第一组引物组，第二轮 PCR 扩增采用第二组引物组，构建高通量测序文库；

(3) 数据分析。

根据本申请，所述样本来源于粪便、土壤、尿液或口腔细胞中的任意一种或至少两种的组合，优选为来源于粪便。

根据本申请，步骤（1）所述样本基因组 DNA 的提取包括如下具体步骤：

（1'）将样本与裂解液混合后，重悬；

（2'）将步骤（1'）重悬后的样本加入去除剂混匀，离心；

（3'）将步骤（2'）离心后的样本加入结合液混匀，加入吸附柱中，离心，漂洗，加入 75% 的无水乙醇，离心；

（4'）将步骤（3'）离心后的样本加入洗脱液，离心得到所述基因组 DNA。

根据本申请，步骤（1'）所述裂解液包括 Tris-Cl 缓冲液、Tween-40、EDTA 和 SDS。

优选地，所述 Tris-Cl 缓冲液的摩尔浓度为 0.5-2M，例如可以是 0.5M、0.6 M、0.7 M、0.8 M、0.9 M、1 M、1.1 M、1.2 M、1.3 M、1.4 M、1.5 M、1.6 M、1.8 M 或 2 M，优选为 0.8-1.2M。

优选地，所述 Tween-40 的体积分数为 8-15%，例如可以是 8%、9%、10%、11%、12%、13%、14% 或 15%，优选为 10-13%。

优选地，所述 EDTA 的摩尔浓度为 0.1-1M，例如可以是 0.1 M、0.2 M、0.3 M、0.4 M、0.5 M、0.6 M、0.7 M、0.8 M、0.9 M 或 1 M，优选为 0.1-0.5M。

优选地，所述 SDS 的体积分数为 5-15%，例如可以是 5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14% 或 15%，优选为 8-12%。

根据本申请，步骤（2'）所述去除剂包括  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ 、CTAB 和 NaCl。

优选地，所述  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  的摩尔浓度为 0.5-2M，例如可以是 0.5 M、0.6 M、

0.7 M、0.8 M、0.9 M、1 M、1.2 M、1.3 M、1.5 M、1.6 M、1.7 M、1.8 M、1.9 M 或 2 M，优选为 0.8-1.2M。

优选地，所述 CTAB 的质量浓度为 200-300g/L，例如可以是 200 g/L、210 g/L、220 g/L、230 g/L、250 g/L、260 g/L、270 g/L、280 g/L、290 g/L 或 300 g/L，优选为 230-260 g/L。

优选地，所述 NaCl 的摩尔浓度为 0.8-2M，例如可以是 0.8 M、0.9 M、1 M、1.2 M、1.3 M、1.5 M、1.6 M、1.7 M、1.8 M、1.9 M 或 2 M，优选为 1.2-1.8M。

本申请中，发明人发现，所述 Tween-40 的添加提高了样本裂解效率，无需特定震荡破碎仪，普通涡旋仪即可操作，高效便捷，单个样品提取一般可在 45 min 内完成；所述  $Al_2(SO_4)_3$  的添加可有效吸附样本腐蚀质，所述 CTAB 对腐蚀质的吸附有一定能力，且在高盐浓度下，可有效去除样本中多糖类物质，通过这三个试剂的配合，提取得到的 DNA 纯度高，可直接用于后续分子实验。

根据本申请，步骤(2)所述第一轮 PCR 的条件为：93-96℃预变性 1-5min；93-96℃预变性 20-40s，50-55℃ 20-40s，70-75℃ 20-40s，共进行 25-35 个循环；70-75℃延伸 3-6min。

优选地，步骤(2)所述第一轮 PCR 的条件为：95℃预变性 3min；95℃预变性 30s，53℃ 30s，72℃ 30s，共进行 28 个循环；72℃延伸 5min。

根据本申请，步骤(2)所述第二轮 PCR 的条件为：93-96℃预变性 1-5min；93-96℃预变性 20-40s，54-58℃ 20-40s，70-75℃ 20-40s，共进行 6-12 个循环；70-75℃延伸 3-6min。

优选地，步骤(2)所述第二轮 PCR 的条件为：95℃预变性 3min；95℃预变性 30s，55.5℃延伸 30s，72℃ 30s，8 个循环；72℃ 5min，1 个循环。

根据本申请，步骤（1）之后还包括纯化的步骤，优选采用磁珠进行纯化。

根据本申请，所述磁珠与扩增产物的体积比为(0.4-0.7):1，例如可以是 0.4:1、0.5:1、0.6:1 或 0.7:1，优选为 0.5:1。

根据本申请，步骤（3）所述数据分析为采用 Illumina Miseq 测序仪进行测序分析。

根据本申请，所述测序分析具体包括如下步骤：通过 Illumina Miseq 测序仪测序得到按照标签区分的测序读长，利用读长的重叠关系组装得到高可变区 V3-V4 的全长序列，再对全长序列进行分类分析，得到所述微生物群体的分类。

根据本申请，所述全长序列进行分类分析具体包括计算全长序列差异度，根据序列差异度执行操作分类学单元 OTU 的分类，将全长序列分配到 OTU 中，再将每一个 OTU 分类中的全长序列比对到 16S rRNA 的 V6 数据库中，将比对结果根据众数原则对 OTU 进行物种注释。

第四方面，本申请提供一种如第一方面所述的引物组合物、如第二方面所述的试剂盒或如第三方面所述的分析方法用于分析分类肠道微生物。

第五方面，本申请提供一种如第三方面所述的分析方法用于免疫组学分析。

第六方面，本申请提供一种如第一方面所述的引物组合物、如第二方面所述的试剂盒或如第三方面所述的分析方法用于癌症的诊断。

优选地，所述癌症选自但不限于肠癌、腺癌或膀胱癌中的任意一种或至少两种的组合。

与现有技术相比，本申请具有如下有益效果：

（1）本申请中，通过采用两步法扩增获得测序文库，所述引物组合物可以更大程度地混合更多的样本，提高了扩增片段覆盖率、检测特异性及灵敏度，

结合数据分析，可获得更丰富的微生物组信息，增加了文库序列的复杂度，降低了 phix 的比例，保证更多测序质量，降低了 PCR 扩增偏好性；

(2) 本申请提供的数据处理分析方法，实现更多微生物物种在分类学属、种上的鉴别及多样性分析，并得到相关微生物群体的相对丰度值；

(3) 本申请方法对肠道微生物进行测序及数据分析，实现了更多物种在分类学属甚至种上的鉴别，即获得更多肠道微生物生物学信息，可为免疫组学研究以及临床用药上提供一定指导意义；

(4) 本申请方法可用于检测癌症，癌症的检出率可达 90%以上，尤其针对肠癌的检出率可达 93.65%，针对腺瘤的检出率可达 91.53%。

## 附图说明

图 1 为本申请实施例中样本 A 数据分析后相关性分析的结果图；

图 2 为本申请实施例中样本 B 数据分析后相关性分析的结果图；

图 3 为本申请实施例中样本 C 数据分析后相关性分析的结果图。

## 具体实施方式

下面结合附图和实施例对本申请作进一步的详细说明。可以理解的是，此处所描述的具体实施例仅仅用于解释本申请，而非对本申请的限定。另外还需要说明的是，为了便于描述，附图中仅示出了与本申请相关的部分而非全部结构。

### 实施例 1 检测试剂盒的制备

(1) 引物组合物的制备

所述第一正向引物的核酸序列如 SEQ ID NO.1 所示，所述第一反向引物的核酸序列如 SEQ ID NO.2 所示，所述核酸序列如下：

第一正向引物 ( SEQ ID NO.1 ) :  
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNNTGCCTACGGRRBGC  
ASCAGKVRVGAAT;

第一反向引物 ( SEQ ID NO.2 ) :  
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNNGGGGACTACNVGG  
GTWTCTAATCC;

其中, N 表示为 A\T\G\C 中的任意一个碱基。

所述 P5 端接头序列的核酸序列如 SEQ ID NO.3-12 所示, 所述核酸序列如下:

	序列	接头名称
SEQ ID NO.3	CTCTCTAT	S502
SEQ ID NO.4	TATCCTCT	S503
SEQ ID NO.5	GTAAGGAG	S505
SEQ ID NO.6	ACTGCATA	S506
SEQ ID NO.7	AAGGAGTA	S507
SEQ ID NO.8	CTAAGCCT	S508
SEQ ID NO.9	CGTCTAAT	S510
SEQ ID NO.10	TCTCTCCG	S511
SEQ ID NO.11	TCGACTAG	S513
SEQ ID NO.12	TTCTAGCT	S515

所述 P7 端接头序列的核酸序列如 SEQ ID NO.13-22 所示, 所述核酸序列如下:

	序列	接头名称
SEQ ID NO.13	TCGCCTTA	N701
SEQ ID NO.14	CTAGTACG	N702
SEQ ID NO.15	TTCTGCCT	N703

SEQ ID NO.16	GCTCAGGA	N704
SEQ ID NO.17	AGGAGTCC	N705
SEQ ID NO.18	CATGCCTA	N706
SEQ ID NO.19	GTAGAGAG	N707
SEQ ID NO.20	CAGCCTCG	N710
SEQ ID NO.21	TGCCTCTT	N711
SEQ ID NO.22	TCCTCTAC	N712

所述第二正向引物的第一标签序列如 SEQ ID NO.23 所示,所述核酸序列如下:

第一标签序列 ( SEQ ID NO.23 ) :  
AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC.

所述第二正向引物的第一测序通用引物的部分序列如 SEQ ID NO.24 所示,所述核酸序列如下:

第一测序通用引物的部分序列 (SEQ ID NO.24) : TCGTCGGCAGCGTC.

所述第二反向引物的标签序列如 SEQ ID NO.25 所示,所述核酸序列如下:

第二标签序列 (SEQ ID NO.25) : CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT.

所述第二反向引物的第二测序通用引物的部分序列如 SEQ ID NO.26 所示,所述核酸序列如下:

第二测序通用引物的部分序列 (SEQ ID NO.26) : GTCTCGTGGGCTCGG.

所述第二正向引物为 :  
AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC-CTCTCTAT-TCGTCGGCAGCG  
TC;

所述第二反向引物为  
CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT-TCGCCTTA-GTCTCGTGGGCTCGG.

## (2) 其他试剂的制备

缓冲液 A: 0.5M Tris-Cl 缓冲液(pH8.0), 1.0M NaCl;

裂解液 B: 1M Tris-Cl 缓冲液(pH 8.0), 0.2M EDTA, 10% SDS, 12% Tween-40;

悬浮液 C: 30mg/ml RNAaseA

去除剂 D: 1.0M  $Al_2(SO_4)_3$ , 250g/L CTAB, 1.5M NaCl;

结合液 E: 0.5M Tris-Cl 缓冲液(pH 8.0), 5M 异硫脲酸胍;

漂洗液 F: 5M Tris-Cl 缓冲液(pH 8.0), 25% (体积比) 无水乙醇;

洗脱液 G: 无菌去离子水

## (3) 试剂盒的组装

将所述引物组合物和检测探针与试剂盒相关的试剂进行组装, 制备成所述检测试剂盒。

### 实施例 2 样本 DNA 的提取

选取 3 个粪便样本: A、B、C, 平均分成 2 份, 标记为: A1/A2, B1/B2, C1/C2, A1、B1、C1 三个样本用本专利说明的方法处理并获得数据, A2、B2、C2 三个样本直接送去金唯智测序, 具体的 DNA 提取方法包括如下步骤:

- (1) 取 700~800 $\mu$ l 缓冲液 A 和 250 mg 玻璃珠至 2 ml 离心管中;
- (2) 在上述 2 ml 离心管中加入 250 mg 样本, 涡旋混匀 10 s;
- (3) 向样本中加入 70  $\mu$ l 裂解液 B, 涡旋振荡 7 min 混匀样本, 12,000 rpm ( $\sim 13,400\times g$ ), 离心 60 s。转移上清液(500  $\mu$ l) 至新的 2 ml 离心管;
- (4) 加入 250  $\mu$ l 悬浮液 C, 涡旋振荡 10 s, 室温放置 2 min, 12,000 rpm ( $\sim 13,400\times g$ ), 离心 60 s, 沉淀样本颗粒;

(5) 转移上清至新的 2 ml 离心管，加入 300  $\mu\text{l}$  去除剂 D 混匀，4 $^{\circ}\text{C}$  放置 2~5 min;

(6) 12,000 rpm ( $\sim 13,400\times g$ )，离心 60 s。转移上清液至新的 2 ml 离心管，加入 1000  $\mu\text{l}$  结合液 E 颠倒混匀;

(7) 取上一步所得溶液 700  $\mu\text{l}$  加入到一个吸附柱中(吸附柱放入收集管中)，12,000 rpm ( $\sim 13,400\times g$ )，离心 30s，倒掉废液，将吸附柱放入收集管中;

(8) 向吸附柱中，加入 700  $\mu\text{l}$  漂洗液 F，12,000 rpm ( $\sim 13,400\times g$ )，离心 30s，倒掉废液，将吸附柱放入收集管中;

(9) 向吸附柱中，加入 500  $\mu\text{l}$  75%无水乙醇，12,000 rpm ( $\sim 13,400\times g$ )，离心 30s，倒掉废液，将吸附柱放入收集管中;

(10) 将吸附柱放回空收集管中，12,000 rpm ( $\sim 13,400\times g$ )，离心 60 s，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应;

(11) 取出吸附柱，放入一个干净的离心管中，在吸附膜的中间部位加 50~100  $\mu\text{l}$  洗脱液 G (洗脱液可事先在 60~70 $^{\circ}\text{C}$  水浴中预热)，室温放置 2 min，12,000 rpm ( $\sim 13,400\times g$ )，离心 60 s，将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，室温放置 2 min，12,000 rpm ( $\sim 13,400\times g$ )，离心 1 min;

(12) 使用分光光度计或 Qubit 对样品进行精确定量，DNA 可以存放在 0~10 $^{\circ}\text{C}$ ，如果要长时间存放，可以放置在-20 $^{\circ}\text{C}$ 。

将提取后的 DNA 进行纯度测试， $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  的比值在 1.7~1.9 之间，可以直接用于后续的 PCR 建库。

### 对比例 1

所述裂解液 B 中不含有 Tween-40，其他组分同实施例 1，DNA 提取方法同

实施例 2。

结果证明，将提取后的 DNA 进行纯度测试， $OD_{260}/OD_{280}$  的比值在 1.3-1.6 之间，纯度相比于实施例 2 降低。

### 对比例 2

所述裂解液 B 中不含有  $Al_2(SO_4)_3$ ，其他组分同实施例 1，DNA 提取方法同实施例 2。

结果证明，将提取后的 DNA 进行纯度测试， $OD_{260}/OD_{280}$  的比值在 1.3-1.6 之间，纯度相比于实施例 2 降低。

### 对比例 3

所述裂解液 B 中不含有 CTAB，其他组分同实施例 1，DNA 提取方法同实施例 2。

结果证明，将提取后的 DNA 进行纯度测试， $OD_{260}/OD_{280}$  的比值在 1.3-1.6 之间，纯度相比于实施例 2 降低。

### 实施例 3 文库构建

(1) 在冰上配制以下反应液，除 DNA 提取液和  $H_2O$  以外，依照如下组份先按反应数+ $\alpha$  的量配制扩增预混 Mix，取配制好的预混 Mix 分装到 PCR 反应管中，反应体系如下：

试剂	使用量
2×PCR 混合液( $Mg^{2+}$ , dNTPs)	12.5 $\mu$ l
上游引物 (1 $\mu$ M)	5 $\mu$ l
下游引物 (1 $\mu$ M)	5 $\mu$ l
样本 DNA 5ng/ $\mu$ l (或者 ddH <sub>2</sub> O)	2.5 $\mu$ l

Total	25 $\mu$ l
-------	------------

设置一组以水为样本的阴性对照。

反应条件如下：

	反应程序	循环数
扩增程序	95°C 3min	1
	95°C 30s	28
	53°C 30s	
	72°C 30s	
	72°C 5min	1

## (2) 第一轮 PCR 产物的纯化

使用 Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter 公司) 对第一轮 PCR 扩增产物进行纯化，具体步骤如下：

1) 4°C 冰箱取出，室温放置 25 min，将 Agencourt AMPure XP 磁珠充分打散，混匀；

2) 扩增产物与 Agencourt AMPure XP 磁珠的结合，所述扩增产物与 Agencourt AMPure XP 磁珠的体积比为 5:4；

3) 充分混匀，室温孵育 15 min，瞬离，磁力架上静置 5 min，去除上清液；

4) 第一次清洗：反应管放置在磁力架上不动，加入 200  $\mu$ l 新配的 80% 的乙醇室温静置 (>30 s)，去除 80% 的乙醇；

5) 第二次清洗：重复一次上述 4) 第一次清洗操作，轻轻离心，去除残留 80% 的乙醇；

6) 磁珠的干燥：室温干燥 1min；

7) 洗脱：加入 30 $\mu$ l 的洗脱液，轻轻地上下吸打，充分混匀，室温孵育 15 min，瞬离，磁力架上静置 5 min，回收上清液；

### (3) 片段大小确定

琼脂糖电泳确定扩增是否准确，扩增产物长度约 550 bp。

### (4) 第二轮 PCR

将步骤 (2) 中纯化得到的 PCR 产物为模板，进行 PCR 导入测序接头，具体步骤如下：

1) 在冰上配制以下反应液，除第一轮 PCR 纯化产物以外，依照如下组份先按反应数+ $\alpha$  的量配制扩增预混 Mix，取配制好的预混 Mix 分装到 PCR 反应管中，反应体系如下：

试剂	使用量
2 $\times$ PCR 混合液(Mg <sup>2+</sup> , dNTPs)	12.5 $\mu$ l
上游引物 (1 $\mu$ M)	5 $\mu$ l
下游引物 (1 $\mu$ M)	5 $\mu$ l
DNA (第一轮 PCR 纯化产物)	2.5 $\mu$ l
Total	25 $\mu$ l

设置一组以水为样本的阴性对照。

反应条件如下：

扩增程序	反应程序	循环数
	95 $^{\circ}$ C 3min	1

	95°C 30s	8
	55.5°C 30s	
	72°C 30s	
	72°C 5min	1

(5) 第二轮 PCR 产物的纯化

具体步骤同第一轮 PCR 产物纯化, 即步骤(2), 其中 PCR 产物与 Agencourt AMPure XP 磁珠的体积比为 2:1;

(6) 片段大小及浓度测定

琼脂糖电泳确定扩增是否准确, 扩增产物长度约 600 bp;

(7) 使用 Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher) 等测定 PCR 产物的浓度;

(8) 测序建好的文库用 illumina 公司的 Miseq 测序进行测序, 测序侧率为 PE300 测序。

#### 实施例 4 数据分析

(1) 对测序得到的原始数据进行质控: 通过 Barcode 和引物等信息筛选出高质量的数据, 筛选标准如下: 含有完整的序列; 具有完整前引物序列; 去除 Barcode、引物、接头, 序列长度必须大于 400bp, 不含有模糊碱基; 不能存在超过 20 个的单碱基重复, 将得到的序列根据信息分别与各个样品相对应;

(2) 通过数据库比对工具进行比对, 将序列聚类生成 OUT;

(3) 将得到的 OTU 表, 按照 A1/A2, B1/B2, C1/C2 进行相关性分析, 结果如图 1-3 所示。

从图 1 可以看出，样本 A，分成两份后，分别用本专利方法和金唯智公司方法建库测序，得到的数据分析后进行相关性分析发现，两种方法得到的 OUT 相关性达到 0.9988；从图 2 可以看出，样本 B，分成两份后，分别用本专利方法和金唯智公司方法建库测序，得到的数据分析后进行相关性分析发现，两种方法得到的 OUT 相关性达到 0.9403；从图 3 可以看出，样本 C，分成两份后，分别用本专利方法和金唯智公司方法建库测序，得到的数据分析后进行相关性分析发现，两种方法得到的 OUT 相关性达到 0.9428。

### 实施例 5 分析验证

选取 63 例肠癌患者粪便样本，59 例腺瘤患者粪便样本和 66 例健康患者粪便样本，用本专利所述的方法提取建库测序获得 DNA 序列信息，根据序列信息预测肠癌风险，具体试验方法同实施例 2-实施例 4，结果如表 1 所示。

表 1

	肠癌	腺瘤	健康人
实际数目	63	59	66
肠癌检出数目	59	5	0
腺瘤检出数目	4	54	8
健康检出数目	0	0	58
准确率	93.65%	91.53%	87.88%

从表 1 可以看出，本申请检测中，肠癌的检出率为 93.65%，腺瘤的检出率为 91.53%，健康人的准确率为 87.88%，可见，本申请方法用于检测癌症的准确

率可达 90%以上。

综上所述，本申请中，通过采用两步法扩增获得测序文库，所述引物组合物可以更大程度地混合更多的样本，提高了扩增片段覆盖率、检测特异性及灵敏度，结合数据分析，可获得更丰富的微生物组信息，增加了文库序列的复杂度，降低了 phix 的比例，保证更多测序质量，降低了 PCR 扩增偏好性；本申请提供的数据处理分析方法，实现更多微生物物种在分类学属、种上的鉴别及多样性分析，并得到相关微生物群体的相对丰度值。

注意，上述仅为本申请的较佳实施例及所运用技术原理。本领域技术人员会理解，本申请不限于这里所述的特定实施例，对本领域技术人员来说能够进行各种明显的变化、重新调整和替代而不会脱离本申请的保护范围。因此，虽然通过以上实施例对本申请进行了较为详细的说明，但是本申请不仅仅限于以上实施例，在不脱离本申请构思的情况下，还可以包括更多其他等效实施例，而本申请的范围由所附的权利要求范围决定。

## 权利要求书

1、一种用于分析肠道微生物的引物组合物，其包含：

第一组引物，所述第一组引物包含第一正向引物和第一反向引物，其中，所述第一正向引物从 5'到 3'端包括依次相连的四个部分：第一测序通用引物、2bp 的随机碱基序列、linker 序列和肠道微生物 16S rRNA V3-V4 区特异性正向引物；所述第一反向引物从 5'到 3'端包括依次相连的四个部分：第二测序通用引物、2bp 的随机碱基序列、linker 序列和肠道微生物 16S rRNA V3-V4 区特异性反向引物；

第二组引物，所述第二组引物包含第二正向引物和第二反向引物，其中，所述第二正向引物从 5'到 3'端包括依次相连的三个部分：P5 端接头序列、第一标签序列和第一测序通用引物的部分序列；所述第二反向引物从 5'到 3'端包括依次相连的三个部分：P7 端接头序列、第二标签序列和第二测序通用引物的部分序列。

2、根据权利要求 1 所述的引物组合物，其中，所述第一测序通用引物和所述第二测序通用引物独立地选自任意一种二代测序平台的测序通用引物。

3、根据权利要求 1 所述的引物组合物，其中，所述 linker 序列的长度为 2-5bp，优选为 2bp；

优选地，所述第一正向引物的核酸序列如 SEQ ID NO.1 所示，所述第一反向引物的核酸序列如 SEQ ID NO.2 所示；

优选地，所述 P5 端接头序列的核酸序列如 SEQ ID NO.3-12 所示；

优选地，所述 P7 端接头序列的核酸序列如 SEQ ID NO.13-22 所示；

优选地，所述第二正向引物的第一标签序列如 SEQ ID NO.23 所示；

优选地，所述第二正向引物的第一测序通用引物的部分序列如 SEQ ID

NO.24 所示；

优选地，所述第二反向引物的第二标签序列如 SEQ ID NO.25 所示；

优选地，所述第二反向引物的第二测序通用引物的部分序列如 SEQ ID NO.26 所示。

4、一种分析肠道微生物的试剂盒，其包括如权利要求 1-3 任一项所述的引物组合物。

5、一种肠道微生物的分析方法，其采用如权利要求 1-3 任一项所述的引物组合物，包括如下步骤：

(1) 样本基因组 DNA 的提取；

(2) 扩增子文库的构建：进行两轮 PCR 扩增，第一轮 PCR 扩增采用第一组引物组，第二轮 PCR 扩增采用第二组引物组，构建高通量测序文库；

(3) 数据分析。

6、根据权利要求 5 所述的分析方法，其中，步骤(1)所述样本基因组 DNA 的提取包括如下具体步骤：

(1') 将样本与裂解液混合后，重悬；

(2') 将步骤(1')重悬后的样本加入去除剂混匀，离心；

(3') 将步骤(2')离心后的样本加入结合液混匀，加入吸附柱中，离心，漂洗，加入 75%的无水乙醇，离心；

(4') 将步骤(3')离心后的样本加入洗脱液，离心得到所述基因组 DNA。

7、根据权利要求 6 所述的分析方法，其中，步骤(1')所述裂解液包括 Tris-Cl 缓冲液、Tween-40、EDTA 和 SDS；

优选地，所述 Tris-Cl 缓冲液的摩尔浓度为 0.5-2M，优选为 0.8-1.2M；

优选地，所述 Tween-40 的体积分数为 8-15%，优选为 10-13%；

优选地，所述 EDTA 的摩尔浓度为 0.1-1M，优选为 0.1-0.5M；

优选地，所述 SDS 的体积分数为 5-15%，优选为 8-12%。

8、根据权利要求 6 或 7 所述的分析方法，其中，步骤（2'）所述去除剂包括  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ 、CTAB 和 NaCl；

优选地，所述  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  的摩尔浓度为 0.5-2M，优选为 0.8-1.2M；

优选地，所述 CTAB 的质量浓度为 200-300g/L，优选为 230-260 g/L；

优选地，所述 NaCl 的摩尔浓度为 0.8-2M，优选为 1.2-1.8M。

9、根据权利要求 5-8 中任一项所述的分析方法，其中，步骤（2）所述第一轮 PCR 的条件为：93-96℃预变性 1-5min；93-96℃预变性 20-40s，50-55℃ 20-40s，70-75℃ 20-40s，共进行 25-35 个循环；70-75℃延伸 3-6min；

优选地，步骤（2）所述第一轮 PCR 的条件为：95℃预变性 3min；95℃预变性 30s，53℃ 30s，72℃ 30s，共进行 28 个循环；72℃延伸 5min；

优选地，步骤（2）所述第二轮 PCR 的条件为：93-96℃预变性 1-5min；93-96℃预变性 20-40s，54-58℃ 20-40s，70-75℃ 20-40s，共进行 6-12 个循环；70-75℃延伸 3-6min；

优选地，步骤（2）所述第二轮 PCR 的条件为：95℃预变性 3min；95℃预变性 30s，55.5℃延伸 30s，72℃ 30s，8 个循环；72℃ 5min，1 个循环。

10、根据权利要求 5-9 中任一项所述的分析方法，其中，步骤（1）中所述样本来源于粪便、土壤、尿液或口腔细胞中的任意一种或至少两种的组合，优选来源于粪便；

优选地，步骤（1）之后还包括纯化的步骤，优选采用磁珠进行纯化；

优选地，所述磁珠与扩增产物的体积比为(0.4-0.7):1，优选为 0.5:1。

11、根据权利要求 5-10 中任一项所述的分析方法，其中，步骤（3）所述数据分析为采用 Illumina Miseq 测序仪进行测序分析；

优选地，所述测序分析具体包括如下步骤：通过 Illumina Miseq 测序仪测序得到按照标签区分的测序读长，利用读长的重叠关系组装得到高可变区 V3-V4 的全长序列，再对全长序列进行分类分析，得到所述微生物群体的分类；

优选地，所述全长序列进行分类分析具体包括计算全长序列差异度，根据序列差异度执行操作分类学单元 OTU 的分类，将全长序列分配到 OTU 中，再将每一个 OTU 分类中的全长序列比对到 16S rRNA 的 V6 数据库中，将比对结果根据众数原则对 OTU 进行物种注释。

12、一种如权利要求 1-3 任一项所述的引物组合物、如权利要求 4 所述的试剂盒或如权利要求 5-11 中任一项所述的分析方法用于分析分类肠道微生物的用途。

13、一种如权利要求 5-11 中任一项所述的分析方法用于免疫组学分析的用途。

14、一种如权利要求 1-3 任一项所述的引物组合物、如权利要求 4 所述的试剂盒或如权利要求 5-11 中任一项所述的分析方法用于癌症的诊断的用途。

15、根据权利要求 14 所述的用途，其中，所述癌症为肠癌、腺癌或膀胱癌中的任意一种或至少两种的组合。

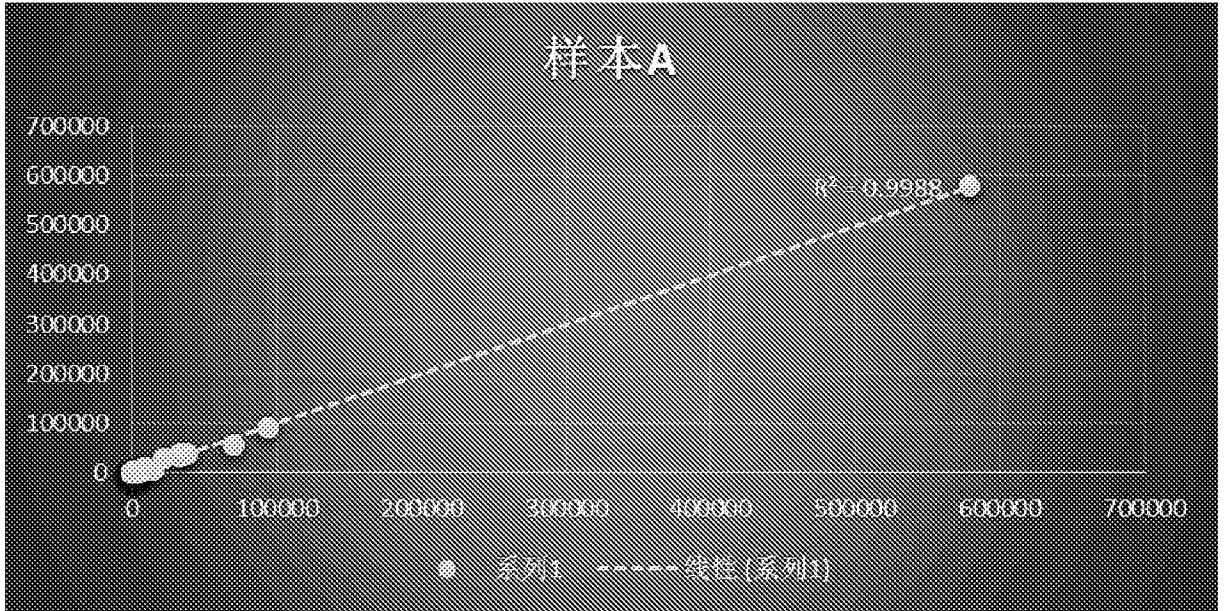


图 1

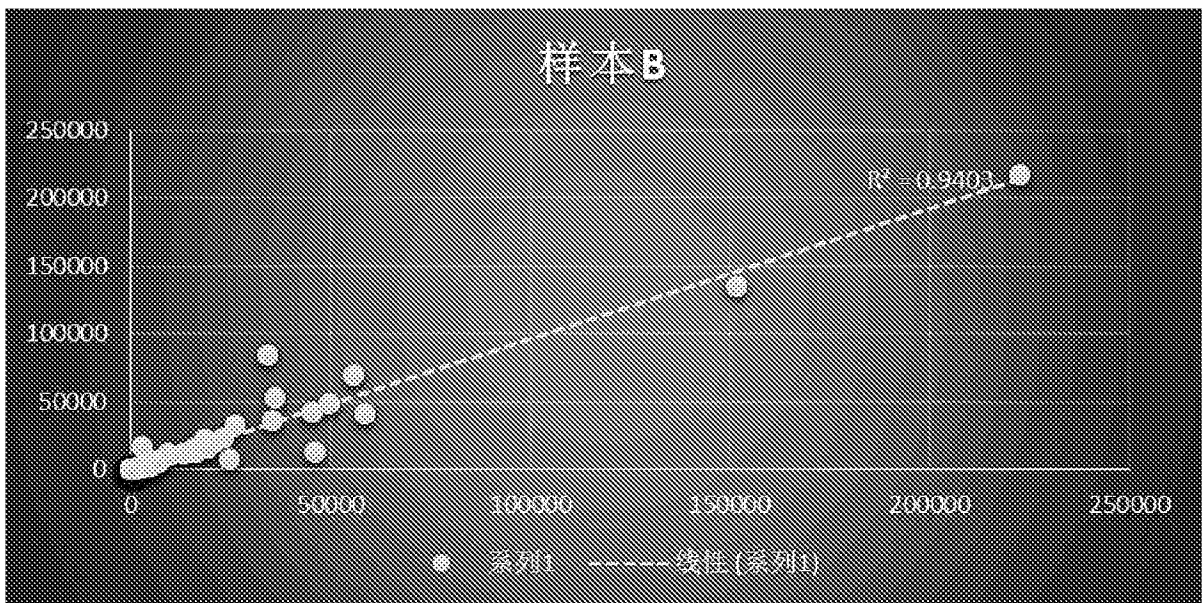


图 2

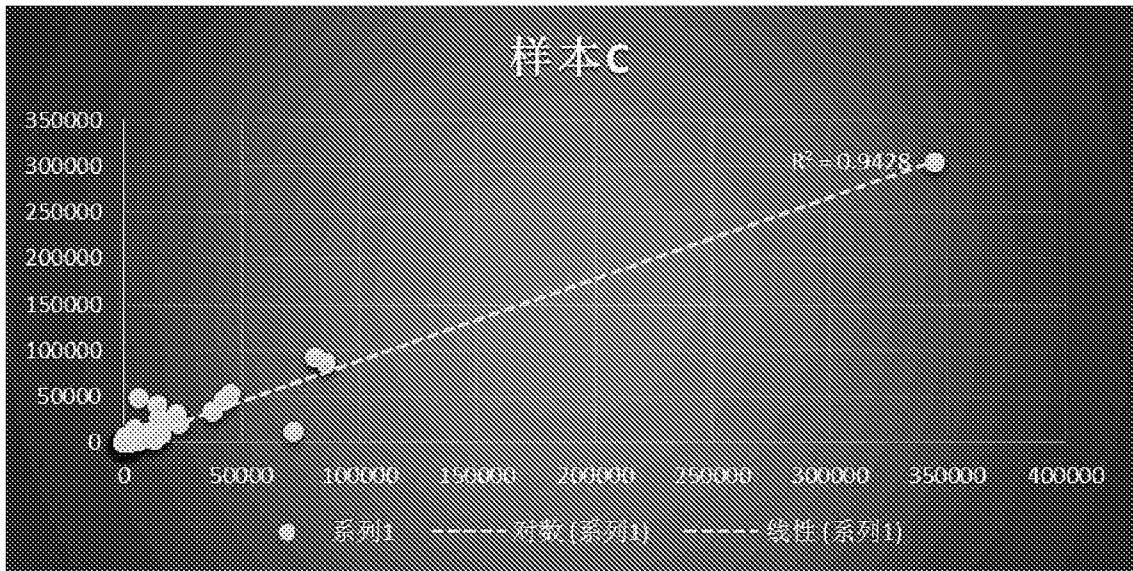


图 3

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/120443

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
C12Q 1/689(2018.01)i; C12Q 1/6869(2018.01)i; C12N 15/11(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
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) DWPI, SIPOABS, CPRSABS, CPEA, TWABS, CNABS, JPABS, CNTXT, USTXT, WOTXT, EPTXT, CNKI, 万方, WANFANG, ISI Web of Science, Elsevier Science, GenBank: 引物, 肠道微生物, 16S rRNA, 测序引物, 连接序列, 随机, 接头, P5, P7, 标签, 巢式, intestinal microbe, microorganism, primer set, sequencing primer, index, random, tag, linker, adaptor, universal primer, barcode, two round, search based on SEQ ID NOs: 1-26		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 105506063 A (BGI SHENZHEN CO., LIMITED) 20 April 2016 (2016-04-20) see description, paragraphs [0028]-[0046]	1-15
Y	CN 106497926 A (CHI BIOTECH CO., LTD.) 15 March 2017 (2017-03-15) see description, paragraphs [0009]-[0034]	1-15
A	WO 2016118719 A1 (QIAGEN SCIENCES LLC) 28 July 2016 (2016-07-28) see entire document	1-15
A	CN 105189748 A (LINEAGE BIOSCIENCES, INC.) 23 December 2015 (2015-12-23) see entire document	1-15
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 <b>09 September 2018</b>		Date of mailing of the international search report <b>18 September 2018</b>
Name and mailing address of the ISA/CN <b>State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088 China</b>		Authorized officer
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No.

**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 13ter.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 13ter.1(a)).
    - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.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/CN2017/120443**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	105506063	A	20 April 2016	None			
CN	106497926	A	15 March 2017	None			
WO	2016118719	A1	28 July 2016	US	2018002738	A1	04 January 2018
				EP	3247804	A1	29 November 2017
CN	105189748	A	23 December 2015	EP	2970958	B1	06 December 2017
				DK	2970958	T3	19 February 2018
				US	2016040234	A1	11 February 2016
				EP	2970959	B1	30 May 2018
				WO	2014144713	A3	27 November 2014
				CA	2905517	A1	18 September 2014
				EP	2970958	A2	20 January 2016
				WO	2014144713	A2	18 September 2014
				EP	2970959	A2	20 January 2016
				CN	105189749	A	23 December 2015
				CA	2905505	A1	18 September 2014
				US	2016228841	A2	11 August 2016
				EP	3327123	A1	30 May 2018
				WO	2014144822	A3	23 April 2015
				US	2016001248	A1	07 January 2016
				DK	2970959	T3	06 August 2018
				WO	2014144822	A2	18 September 2014

<p><b>A. 主题的分类</b></p> <p>C12Q 1/689(2018.01)i; C12Q 1/6869(2018.01)i; C12N 15/11(2006.01)i</p> <p>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</p>																	
<p><b>B. 检索领域</b></p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C12Q, C12N</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>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))</p> <p>DWPI, SIPOABS, CPRSABS, CPEA, TWABS, CNABS, JPABS, CNTXT, USTXT, WOTXT, EPTXT, CNKI, 万方, ISI Web of Science, Elsevier Science, GenBank:引物, 肠道微生物, 16S rRNA, 测序引物, 连接序列, 随机, 接头, P5, P7, 标签, 巢式, intestinal microbe, microorganism, primer set, sequencing primer, index, random, tag, linker, adaptor, universal primer, barcode, two round, 基于序列SEQ ID NOs: 1-26的检索</p>																	
<p><b>C. 相关文件</b></p> <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>Y</td> <td>CN 105506063 A (深圳华大基因科技有限公司) 2016年 4月 20日 (2016 - 04 - 20) 参见说明书第[0028]-[0046]段</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 106497926 A (承启医学深圳科技有限公司) 2017年 3月 15日 (2017 - 03 - 15) 参见说明书第[0009]-[0034]段</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2016118719 A1 (QIAGEN SCIENCES LLC) 2016年 7月 28日 (2016 - 07 - 28) 参见全文</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 105189748 A (血统生物科学公司) 2015年 12月 23日 (2015 - 12 - 23) 参见全文</td> <td>1-15</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	Y	CN 105506063 A (深圳华大基因科技有限公司) 2016年 4月 20日 (2016 - 04 - 20) 参见说明书第[0028]-[0046]段	1-15	Y	CN 106497926 A (承启医学深圳科技有限公司) 2017年 3月 15日 (2017 - 03 - 15) 参见说明书第[0009]-[0034]段	1-15	A	WO 2016118719 A1 (QIAGEN SCIENCES LLC) 2016年 7月 28日 (2016 - 07 - 28) 参见全文	1-15	A	CN 105189748 A (血统生物科学公司) 2015年 12月 23日 (2015 - 12 - 23) 参见全文	1-15
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
Y	CN 105506063 A (深圳华大基因科技有限公司) 2016年 4月 20日 (2016 - 04 - 20) 参见说明书第[0028]-[0046]段	1-15															
Y	CN 106497926 A (承启医学深圳科技有限公司) 2017年 3月 15日 (2017 - 03 - 15) 参见说明书第[0009]-[0034]段	1-15															
A	WO 2016118719 A1 (QIAGEN SCIENCES LLC) 2016年 7月 28日 (2016 - 07 - 28) 参见全文	1-15															
A	CN 105189748 A (血统生物科学公司) 2015年 12月 23日 (2015 - 12 - 23) 参见全文	1-15															
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																	
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“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)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&amp;” 同族专利的文件</p>																	
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2018年 9月 9日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2018年 9月 18日</p>															
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>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</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>受权官员</p> <p>李洋</p> <p>电话号码 62411031</p>															

## 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/CN2017/120443

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	105506063	A	2016年 4月 20日	无			
CN	106497926	A	2017年 3月 15日	无			
WO	2016118719	A1	2016年 7月 28日	US	2018002738	A1	2018年 1月 4日
				EP	3247804	A1	2017年 11月 29日
CN	105189748	A	2015年 12月 23日	EP	2970958	B1	2017年 12月 6日
				DK	2970958	T3	2018年 2月 19日
				US	2016040234	A1	2016年 2月 11日
				EP	2970959	B1	2018年 5月 30日
				WO	2014144713	A3	2014年 11月 27日
				CA	2905517	A1	2014年 9月 18日
				EP	2970958	A2	2016年 1月 20日
				WO	2014144713	A2	2014年 9月 18日
				EP	2970959	A2	2016年 1月 20日
				CN	105189749	A	2015年 12月 23日
				CA	2905505	A1	2014年 9月 18日
				US	2016228841	A2	2016年 8月 11日
				EP	3327123	A1	2018年 5月 30日
				WO	2014144822	A3	2015年 4月 23日
				US	2016001248	A1	2016年 1月 7日
				DK	2970959	T3	2018年 8月 6日
				WO	2014144822	A2	2014年 9月 18日