

(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



(10) 国际公布号
WO 2020/258084 A1

(43) 国际公布日
2020 年 12 月 30 日 (30.12.2020)

(51) 国际专利分类号:
C12Q 1/6869 (2018.01) *C12Q 1/6844* (2018.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/093066

(22) 国际申请日: 2019 年 6 月 26 日 (26.06.2019)

(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)。 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 1810, 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,

(54) Title: METHOD FOR PREPARING NESTED MULTIPLEX PCR HIGH-THROUGHPUT SEQUENCING LIBRARY AND KIT

(54) 发明名称: 巢式多重 PCR 高通量测序文库制备方法及其试剂盒

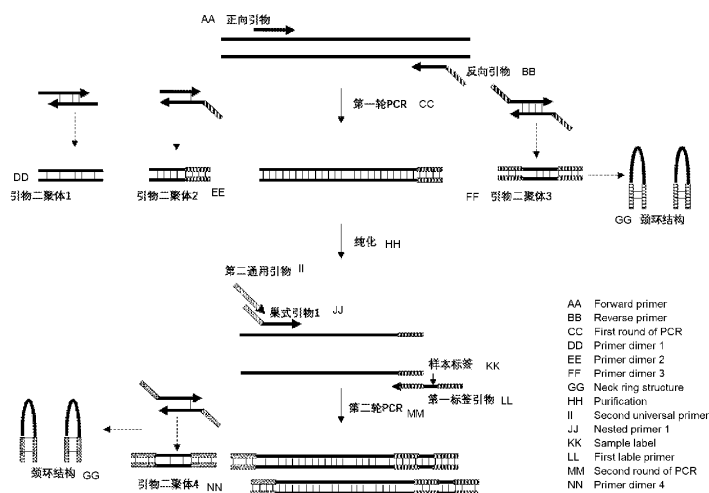


图 2

(57) Abstract: Provided are a method for preparing a nested multiplex PCR high-throughput sequencing library and a kit, wherein the method for preparing the nested multiplex PCR high-throughput sequencing library comprises: amplifying a target region by using a forward primer and a reverse primer, wherein the forward primer is a forward specific sequence, and the reverse primer comprises a 3' end reverse specific sequence and a 5' end first universal sequencing sequence; purifying a product of a first round of PCR amplification; amplifying the purified product by using a nested primer, a first label primer and a second universal primer, wherein the nested primer is located downstream of the forward primer, the nested primer comprises a 5' end second universal sequencing sequence and a 3' end specific sequence, the 3' end sequence of the first label primer is the same as part or all of the 5' end sequence of the reverse primer,

[见续页]

WO 2020/258084 A1

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)。

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))。

and the first label primer further comprises a first label sequence, the 3' end sequence of a second universal primer is the same as part or all of 5' end sequence of the nested primer. The method for preparing the nested multiplex PCR high-throughput sequencing library can effectively avoid dimers generated in the multiplex PCR amplification process, and the nested amplification method can greatly increase the specificity of PCR amplification.

(57) 摘要: 一种巢式多重PCR高通量测序文库制备方法及其试剂盒, 巢式多重PCR高通量测序文库制备方法包括: 使用正向引物和反向引物对目标区域进行扩增, 正向引物是正向特异性序列, 反向引物包括3'端的反向特异性序列和5'端的第一通用测序序列; 对第一轮PCR扩增的产物进行纯化; 使用巢式引物、第一标签引物和第二通用引物对纯化后的产物进行扩增, 其中巢式引物位于正向引物的下游, 巢式引物包括5'端的第二通用测序序列和3'端的特异性序列, 第一标签引物3'端序列和反向引物5'端的部分或全部序列相同, 且第一标签引物还包括第一标签序列, 第二通用引物3'端序列和巢式引物5'端的部分或者全部序列相同。巢式多重PCR高通量测序文库制备方法能够有效避免多重PCR扩增过程中产生的二聚体, 并且采用巢式扩增方法大大增加PCR扩增的特异性。