

(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
2014 年 3 月 13 日 (13.03.2014)



(10) 国际公布号
WO 2014/036729 A1

(51) 国际专利分类号:
C12Q 1/68 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2012/081154

(22) 国际申请日: 2012 年 9 月 7 日 (07.09.2012)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): **深圳华大基因研究院 (BGI SHENZHEN)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。

(72) 发明人: 及

(75) 发明人/申请人 (仅对美国): **崔路漫 (CUI, Luman)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 **韩颖新 (HAN, Yingxin)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 **张印新 (ZHANG, Yinxin)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 **梅严花 (MEI, Yanhua)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 **汪建 (WANG, Jian)** [CN/CN]; 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 PROP-

ERTY 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, 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, 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, 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))。

(54) Title: METHOD AND SYSTEM FOR DETERMINING NUCLEOTIDE SEQUENCE OF PREDETERMINED REGION IN HCV NUCLEIC ACID SAMPLE

(54) 发明名称: 确定 HCV 核酸样本中预定区域核酸序列的方法和系统

(57) Abstract: The invention provides a method, PCR primer and kit for determining a nucleotide sequence of a predetermined region in an HCV nucleic acid sample and their uses, and a system for determining a nucleotide sequence of a predetermined region in an HCV nucleic acid sample. The predetermined region is selected from at least one of a 5'UTR region and an NS5B region. The method for determining a nucleotide sequence of a predetermined region in an HCV nucleic acid sample comprises: amplifying the HCV nucleic acid sample by using a first primer set to acquire a first amplified product; sequencing the first amplified product; and determining the nucleotide sequence of the predetermined region on the basis of a sequencing result. The first primer set comprises at least one of a combination of primers shown in SEQ ID NO: 1 and SEQ ID NO: 2, and a combination of primers shown in SEQ ID NO: 3 and SEQ ID NO: 4.

(57) 摘要: 本发明提供了确定 HCV 核酸样本中预定区域核酸序列的方法、PCR 引物、试剂盒及其用途, 以及确定 HCV 核酸样本中预定区域核酸序列的系统。其中, 该预定区域选自 5'UTR 区和 NS5B 区的至少之一。确定 HCV 核酸样本中预定区域核酸序列的方法包括: 使用第一引物组对 HCV 核酸样本进行扩增, 以便得到第一扩增产物; 对第一扩增产物进行测序; 基于测序结果, 确定预定区域的核酸序列。所述第一引物组包含 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2 所示引物的组合, 以及 SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4 所示引物的组合的至少一种。

WO 2014/036729 A1

确定 HCV 核酸样本中预定区域核酸序列的方法和系统

优先权信息

无

5

技术领域

本发明涉及基因组学和分子生物学中有机生物分子领域，具体而言，本发明涉及确定 HCV 核酸样本中预定区域核酸序列的方法、PCR 引物、试剂盒及其用途，以及确定 HCV 核酸样本中预定区域核酸序列的系统。

10

背景技术

1989 年 Choo 等在感染的黑猩猩血液标本中，克隆出了非甲非乙型肝炎的基因片段，将其命名为“丙型肝炎病毒（Hepatitis C Virus, HCV）”。HCV 是经血传播的非甲非乙型肝炎（PT-NANBH）的主要病原，呈全球分布，流行性很强。

15

HCV 属黄病毒科，为单股正链 RNA 病毒，基因组 RNA 由 9500-10000 个核苷酸组成，含两个非翻译区（UTR）和一个开放读码框架（ORF），排列顺序为 5'-C-E1-E2/p7-NS2-NS3-NS4-NS5-3'。国际通用的分型标准是 Simmonds 等建立的针对 HCV 基因组 C、E1 和 NS5 区的核苷酸序列分析，将 HCV 分为 6 个主要基因型，每型又由若干亚型组成。

20

然而，目前针对 HCV 的分型方法仍有待改进。

发明内容

本发明旨在至少在一定程度上解决上述技术问题之一或至少提供一种有用的商业选择。

25

本发明旨在解决现有技术问题的至少之一。为此，根据本发明的一个方面，本发明提供了一种确定 HCV 核酸样本中预定区域核酸序列的方法。根据本发明的实施例，该预定区域为选自 5' UTR 和 NS5 的至少之一，该方法包括下列步骤：使用第一引物组，对 HCV 核酸样本进行扩增，以便得到第一扩增产物；对第一扩增产物进行测序，以便得到测序结果；以及基于上述测序结果，确定预定区域的核酸序列，其中，第一引物组包含第一引物和第二引物的组合、以及第三引物和第四引物的组合的至少一种，该第一引物具有 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列，该第二引物具有 SEQ ID NO: 2 所示的核苷酸序列，该第三引物具有 SEQ ID NO: 3 所示的核苷酸序列，该第四引物组具有 SEQ ID NO: 4 所示的核苷酸序列。

30

利用该方法，能够有效地确定 HCV 核酸样本中预定区域例如，选自 5' UTR 和 NS5 的至少之一的序列，由此，可以进一步通过对所确定的核酸序列进行分析，以便确定 HCV 的基因型。

根据本发明的实施例，上述确定 HCV 核酸样本中预定区域核酸序列的方法可以具有下

5 列附加技术特征：

根据本发明的具体示例，HCV 核酸样本是从 HCV 的携带者或 HCV 培养装置中分离的。

根据本发明的具体示例，HCV 核酸样本选自血浆、血清、全血、纯病毒培养物和携带 HCV 的媒介生物的至少一种。

10 根据本发明的具体示例，在对 HCV 核酸样本进行扩增之前，进一步包括将 HCV 核酸样本进行逆转录。

根据本发明的实施例，进一步包括：利用第二引物组，对第一扩增产物进行扩增，以便得到第二扩增产物，并对该第二扩增产物进行测序，其中，上述第二引物组包括第五引物和第六引物的组合、以及第七引物和第八引物的组合的至少一种，该第五引物具有如 SEQ
15 ID NO: 5 所示的核苷酸序列，该第六引物具有如 SEQ ID NO: 6 所示的核苷酸序列，该第七引物具有如 SEQ ID NO: 7 所示的核苷酸序列，该第八引物具有如 SEQ ID NO: 8 所示的核苷酸序列。

根据本发明的具体示例，进一步包括通过选自琼脂糖凝胶电泳切胶、磁珠纯化和纯化柱纯化的至少一种分离纯化第一扩增产物。

20 根据本发明的具体示例，测序采用第一代测序方法，优选地采用 Sanger 法，特别优选地采用 3730 测序仪(ABI)进行测序。

根据本发明的实施例，基于所述测序结果，确定 HCV 核酸样本中预定区域核酸序列进一步包括：

将测序结果与参照序列进行比对，以便确定 HCV 核酸样本中预定区域核酸序列。

25 根据本发明的另一个方面，本发明提出了一组 PCR 引物。根据本发明的实施例，该组 PCR 引物包含第一引物和第二引物的组合、以及第三引物和第四引物的组合的至少一种，该第一引物具有 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列，该第二引物具有 SEQ ID NO: 2 所示的核苷酸序列，该第三引物具有 SEQ ID NO: 3 所示的核苷酸序列，该第四引物具有 SEQ ID NO: 4 所示的核苷酸序列，

30 根据本发明的实施例，本发明的一组 PCR 引物进一步包括第五引物和第六引物的组合、以及第七引物和第八引物的组合的至少一种，该第五引物具有如 SEQ ID NO: 5 所示的核苷

酸序列, 该第六引物具有如 SEQ ID NO: 6 所示的核苷酸序列, 该第七引物具有如 SEQ ID NO: 7 所示的核苷酸序列, 该第八引物具有如 SEQ ID NO: 8 所示的核苷酸序列。

根据本发明的另一个方面, 本发明还提供了一种试剂盒。根据本发明的实施例, 该试剂盒包含上述所示的任一组 PCR 引物。

- 5 根据本发明的再一个方面, 本发明还提供了上述试剂盒在检测 HCV 基因的预定区域核酸序列中的用途。

根据本发明的另一个方面, 本发明还提供了一种确定 HCV 核酸样本中预定区域核酸序列的系统。根据本发明的实施例, 该预定区域为选自 5' UTR 和 NS5 的至少之一, 该系统包括:

- 10 扩增装置, 该扩增装置中设置有上述的一组 PCR 引物, 用于对 HCV 核酸样本进行扩增, 以便得到第一扩增产物;

测序装置, 该测序装置与扩增装置相连, 并且适于对第一扩增产物进行测序, 以便得到测序结果; 以及

- 15 分析装置, 该分析装置与测序装置相连, 用于对基于测序结果, 确定 HCV 核酸样本中预定区域核酸序列。

由此, 可以有效地实施前面所描述的确定 HCV 核酸样本中预定区域核酸序列的方法, 从而能够有效地确定 HCV 预定区域例如, 自 5' UTR 和 NS5 的至少之一的序列, 由此, 可以进一步通过对所确定的核酸序列进行分析, 确定 HCV 的基因型。

- 20 根据本发明的实施例, 本发明的确定 HCV 核酸样本中预定区域核酸序列的系统可以进一步包括下列附加技术特征:

根据本发明的实施例, 本发明的确定 HCV 核酸样本中预定区域核酸序列的系统可以进一步包括: 核酸分离装置, 该核酸分离装置适于从 HCV 携带者或 HCV 培养装置中分离 HCV 核酸样本。

- 25 根据本发明的具体示例, 测序装置为选自 Sanger 法测序装置的至少一种, 优选为 3730 测序仪(ABI)。

根据本发明的具体示例, 分析装置进一步包括比对单元, 该比对单元中存储有参照序列, 用于将测序结果与参照序列进行比对, 以便确定 HCV 核酸样本中预定区域核酸序列。

- 30 与现有技术相比, 根据本发明实施例的技术方案采用特异性引物扩增有代表性的分型区域, 应用 Sanger 直接测序法获得目的片段的核酸序列信息, 进而得出 HCV 基因型。根据本发明的实施例, 采用巢式 PCR 的方法和成熟稳定的测序技术, 可以保证病毒载量较低的样品也可以被检测出来。联合检测 5'UTR 和 NS5B 两个极具代表性的分型区域, 确保了分

型结果的准确性。此外，该法成本较低，耗时较短，适合在临床广泛应用。

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。

5 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的确定 HCV 核酸样本中预定区域核酸序列的方法的流程示意图；以及

10 图 2 显示了根据本发明一个实施例的确定 HCV 核酸样本中预定区域核酸序列的系统的结构示意图。

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，其中自始至终相同或类似的标号表示相同或类似的元件或具有相同或类似功能的元件。下面通过参考附图描述的实施

15 所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”、“第三”、“第四”、“第五”、“第六”、“第七”和“第八”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。

20 目前检测 HCV 基因型的方法有很多种，如测序法、基因型特异性 RT-PCR 方法、基因芯片法、限制性片段长度多态性(RFLR)法、基因型特异性探针杂交法、异源分子迁移率分析(HMA)法、酶免疫试验(EIA)等。其中，基因芯片法，需要特殊的分析仪器设备，成本较高；基因型特异性探针杂交法，可以分辨 6 种基因型和相关的亚型，由于需要的探针多，较为繁琐，不适合检测大量样本；限制性片段长度多态性(RFLP)，一般选 5' UTR 和 NS5 保守区作为 RFLP 分型的靶基因。该法具有正确、快速、经济等优点，但不能区分所有的 HCV 基因亚型也不能识别在泰国和越南发现的变异基因型，因为其 5' 端非编码区的核苷酸序列同基因型 1 的相同。总之，上述方法均存在一些缺点，有的成本高，操作繁琐，有的准确度和灵敏度低，特异性差，有的无法检测出新型别，都难以在临床广泛应用。因此，研发一种简便、快速、准确的 HCV 分型方法是目前亟待解决的问题。

25

30

确定 HCV 核酸样本中预定区域核酸序列的方法

本发明提供了一种确定 HCV 核酸样本中预定区域核酸序列的方法，该预定区域为选自 5' UTR 和 NS5 的至少之一。根据本发明的实施例，参考图 1，该方法可以包括：

S100：使用第一引物组，对 HCV 核酸样本进行扩增，任选地可以在扩增之前进行逆转录，以便得到第一扩增产物；

5 根据本发明的实施例，第一引物组包含第一引物和第二引物的组合、以及第三引物和第四引物的组合的至少一种，第一引物具有 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列，第二引物具有 SEQ ID NO: 2 所示的核苷酸序列，第三引物具有 SEQ ID NO: 3 所示的核苷酸序列，第四引物具有 SEQ ID NO: 4 所示的核苷酸序列，具体序列见下表 1。

根据本发明的实施例，可以用于检测的 HCV 核酸样本的类型并不受特别限制，可以是 DNA 样品，也可以是 RNA 样本。根据本发明的实施例，当采用 RNA 样本时，在对所述 HCV 核酸样本进行扩增之前，进一步包括将所述 HCV 核酸样本进行逆转录。

表 1 引物序列

引物名称	序列
SEQ ID NO: 1	5'-CTGTGAGGAAGTACTGTCTT-3'
SEQ ID NO: 2	5'-AGGTGCACGGTCTACGAGA-3'
SEQ ID NO: 3	5'-TATGACACCCGCTGCTTTGA-3'
SEQ ID NO: 4	5'-GAATACCTGGTCATAGCCTC-3'
SEQ ID NO: 5	5'-TTCACGCAGAAAGCGTCTAG-3'
SEQ ID NO: 6	5'-GAGCACCCCTATCAGGCAGT-3'
SEQ ID NO: 7	5'-TGCTTTGACTCAACCGTCAC-3'
SEQ ID NO: 8	5'-ATAGCCTCCGTGAAGGCTC-3'

根据本发明的实施例，HCV 核酸样本的来源并不受特别限制。根据本发明的一些具体实施例，HCV 核酸样本是从 HCV 的携带者或 HCV 培养装置中分离的。根据本发明的进一步的实施例，优选 HCV 核酸样本选自血浆、血清、全血、纯病毒培养物和携带此类病毒的媒介生物的至少一种，更优选，HCV 核酸样本取自 HCV 携带者血清。

根据本发明的实施例，在得到第一扩增产物之后，可以对第一扩增产物进行纯化。例如，根据本发明的实施例，本发明的确定 HCV 核酸样本中预定区域核酸序列的方法进一步包括通过选自琼脂糖凝胶电泳切胶、磁珠纯化和纯化柱纯化的至少一种分离纯化所得到的第一扩增产物。

S200：对第一扩增产物进行测序，以便得到测序结果。

根据本发明的实施例，针对拷贝数较低的 HCV 核酸样本，对第一扩增产物进行测序可

以进一步包括：利用第二引物组，对第一扩增产物进行扩增，以便得到第二扩增产物，并对第二扩增产物进行测序，其中，所述第二引物组包括第五引物和第六引物的组合、以及第七引物和第八引物的组合的至少一种，所述第五引物具有如 SEQ ID NO: 5 所示的核苷酸序列，所述第六引物具有如 SEQ ID NO: 6 所示的核苷酸序列，所述第七引物具有如 SEQ ID NO: 7 所示的核苷酸序列，所述第八引物具有如 SEQ ID NO: 8 所示的核苷酸序列，具体序列见表 1。由此，可以针对量非常少的 HCV 核酸样本进行有效的扩增，从而提高了扩增效率，进而提高了确定 HCV 核酸样本中预定区域核酸序列的方法的效率。

根据本发明的实施例，可以进行测序的方法和设备，并不受特别限制。根据本发明的实施例，可以采用选自 Sanger 测序装置的至少一种进行所述测序，优选地采用 3730 测序仪进行测序。此外，本领域技术人员可以理解，当样本较多时，还可以采用第二代或第三代的高通量测序平台，参照相应的操作规程，进行文库构建及测序，从而能够准确高效地获得测序结果。由此，可以充分利用这些测序技术的高通量测序能力，从而可以极大地降低测序的成本，提高测序的效率。

S300: 基于测序结果，确定预定区域的核酸序列，

根据本发明的实施例，在获得测序结果后，可以根据测序技术选择适当的手段，来确定预定区域的核酸序列。另外，根据本发明的实施例，在得到测序结果之后，还可以通过将测序结果与参照序列进行比对，以便确定所述 HCV 核酸样本中预定区域核酸序列。可以采用的参照序列可以为 HCV 全基因组序列。另外，也可以将所得到的核酸序列通过在线比对，例如，在 NCBI 数据库中进行比对，确定 HCV 的基因型。

PCR 引物和试剂盒

本发明还提出了一组 PCR 引物。根据本发明的实施例，该组 PCR 引物包含第一引物和第二引物的组合、以及第三引物和第四引物的组合的至少一种，所述第一引物具有 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列，所述第二引物具有 SEQ ID NO: 2 所示的核苷酸序列，所述第三引物具有 SEQ ID NO: 3 所示的核苷酸序列，所述第四引物具有 SEQ ID NO: 4 所示的核苷酸序列。利用该组 PCR 引物，可以有效地实施前述确定 HCV 核酸样本中预定区域核酸序列的方法。关于该方法的优点和特征，前面已经进行了详细描述，不再赘述。

根据本发明的实施例，该组 PCR 引物还可以进一步包括第五引物和第六引物的组合、以及第七引物和第八引物的组合的至少一种，所述第五引物具有如 SEQ ID NO: 5 所示的核苷酸序列，所述第六引物具有如 SEQ ID NO: 6 所示的核苷酸序列，所述第七引物具有如 SEQ ID NO: 7 所示的核苷酸序列，所述第八引物具有如 SEQ ID NO: 8 所示的核苷酸序列。

由此，可以利用该组 PCR 引物有效地对少量核酸样本进行扩增，进而实施前述确定 HCV 核酸样本中预定区域核酸序列的方法。

根据本发明的实施例，本发明还提出了一种试剂盒，该试剂盒包含前面所述的 PCR 引物。该试剂盒可以有效地实施前述确定 HCV 核酸样本中预定区域核酸序列的方法。关于该方法的优点和特征，前面已经进行了详细描述，不再赘述。

当然，本领域技术人员能够理解，试剂盒中还可以包含其他常用试剂，在此不再赘述。此外，本发明还提供了上述试剂盒在检测 HCV 基因的预定区域核酸序列中的用途。

确定 HCV 核酸样本中预定区域核酸序列的系统

本发明还提出了一种确定 HCV 核酸样本中预定区域核酸序列的系统 1000。参考图 2，根据本发明的实施例，该系统 1000 包括：扩增装置 100、测序装置 200 和分析装置 300。

根据本发明的实施例，扩增装置 100 中设置有前面所示的一组 PCR 引物，用于对所述 HCV 核酸样本进行扩增，以便得到第一扩增产物。根据本发明的实施例，本发明的确定 HCV 核酸样本中预定区域核酸序列的系统还可以进一步包括核酸分离装置（图中未示出），该核酸分离装置适于从 HCV 的宿主分离 HCV 核酸样本，由此可以为扩增装置 100 提供用于检测的核酸样本。

根据本发明的实施例，测序装置 200 与扩增装置 100 相连，并且适于对第一扩增产物进行测序，以便得到测序结果。根据本发明的实施例，测序装置的类型并不受特别限制。根据本发明的实施例，测序装置可以为适于进行 Sanger 测序法的装置，优选为 3730 测序仪。

根据本发明的实施例，分析装置 300 与测序装置 200 相连，用于基于测序结果，确定所述 HCV 核酸样本中预定区域的核酸序列。如前所述，还可以进一步通过比对，确定预定区域核酸序列。因而，根据本发明的实施例，分析装置进一步包括比对单元，该比对单元中存储有参照序列，用于将所述测序结果与参照序列进行比对，以便确定所述 HCV 核酸样本预定区域核酸序列。

由此，可以有效地实施前面所描述的确 HCV 核酸样本中预定区域核酸序列的方法，能够有效地确定 HCV 预定区域例如，自 5' UTR 和 NS5 的至少之一的序列，由此，可以进一步通过对所确定的核酸序列进行分析，以便确定 HCV 的基因型。需要说明的是，前面针对引物、试剂盒以及确定 HCV 核酸样本中预定区域核酸序列的方法所描述的特征和优点，也适用确定 HCV 核酸样本中预定区域核酸序列的系统，在此不再赘述。

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，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。

5 实施例 1:

本实施例是采用 3730 测序技术对病人血清中 HCV 样品进行基因型检测，操作步骤如下：

1.首先根据丙肝病毒（HCV）基因组的序列(NCBI 登录号：NC_004102，GenBank: D14853.1)的 5'UTR 和 NS5B 两个区域分别设计一对 PCR 引物，引物序列如下所示：

10 5'UTR 区域扩增引物为：

上游：5'-CTGTGAGGAACTACTGTCTT-3' (SEQ ID NO: 1);

下游：5'-AGGTGCACGGTCTACGAGA-3' (SEQ ID NO: 2);

NS5B 区域扩增引物为：

上游：5'-TATGACACCCGCTGCTTTGA-3' (SEQ ID NO: 3);

15 下游：5'-GAATACCTGGTCATAGCCTC-3' (SEQ ID NO: 4)。

其中，5'UTR 区域（第 63-306 位碱基，共 242bp）的序列为：

GCCAGCCCCCTGATGGGGGCGACACTCCGCCATGAATCACTCCCCTGTGAGGAAC
TACTGTCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCGTGCAGCCT
CCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCG
20 GAATTGCCAGGACGACCGGGTCCTTTCTTGGATAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTG
GGCGTGCCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTTGGGTCGCGAAAGGCCTTGTGG
TACTGCCTGATAGGGTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATG
AGCACGAATCCT(SEQ ID NO: 9);

NS5B 区域（第 8268-8629 位碱基，共 362bp）的序列为：

25 CTATGGGGTTTTCTATGACACCCGTTGCTTTGACTCGACAGTCACTGAGGCTGAT
ATCCGTACGGAGGAAGACCTCTACCAATCTTGTGACCTGGTCCCTGAGGCCCGCGCGG
CCATAAGGTCTCTCACAGAGAGGCTTTACATCGGGGGCCCGCTTACCAACTCTAAGGG
ACAAAAGTGC GGCTATCGGCGATGCCGCGCGAGCGGCGTGCTGACCACTAGCTGCGGT
AACACCATAACCTGTTATCTCAAGGCCAGTGCAGCCTGTCGAGCTGCAAAGCTCCGGG
30 ACTGCACTATGCTCGTGTGCGGCGACGACCTCGTCGTTATCTGTGAGAGCGCCGGTGT
CCAGGAGGACGCTGCGAACCTGAGAGCCTTCACGGAGGCTATGACCAGGTACTCCGC

CCCCCGGGAGACCCGC(SEQ ID NO: 10)。

针对拷贝数低的样品, 经过上一轮没有扩增结果的, 进一步设计了巢式 PCR 引物, 再进行第二轮 PCR 扩增

5'UTR 区域第二轮 PCR 引物为:

5 上游: 5'-TTCACGCAGAAAGCGTCTAG-3' (SEQ ID NO: 5);

下游: 5'-GAGCACCTATCAGGCAGT-3' (SEQ ID NO: 6);

NS5B 区域第二轮 PCR 引物为:

上游: 5'-TGCTTTGACTCAACCGTCAC-3' (SEQ ID NO: 7);

下游: 5'-ATAGCCTCCGTGAAGGCTC-3' (SEQ ID NO: 8);

10 2.HCV-RNA 的提取

用 QIAamp 病毒基因组 RNA 提取试剂盒, 按制造商所提供的操作说明书, 提取丙肝血清样本 HCV-RNA。

3.HCV-RNA 逆转录成 cDNA

15 用 TaKaRa 逆转录试剂盒, 按制造商所提供的操作说明书, 将 HCV-RNA 逆转录成 cDNA, 以便获得 HCV 核酸样本。

4.PCR 扩增反应

对逆转录获得的 HCV-cDNA 的 5'UTR 区域进行 PCR 扩增反应, PCR 扩增反应试剂的配置见表 2:

表 2

试剂	微升/反应
H ₂ O (HPLC 级)	16.3
10x PCR Buffer 含 2.0mM MgCl ₂	2.0
dNTP mix (均为 2.5 mM)	2
第一引物	1.0
第二引物	1.0
Taq® (5 U/μL)	0.2
模板 DNA	2
总体积	25

20 其中, 反应条件为: 94℃, 1 min; 94℃变性 30 s, 46℃退火 30 s, 72℃延伸 1 min, 共

扩增 40 个循环, 72℃延伸 5 min, 最终 12℃, 保持。

进一步, 针对拷贝数低的样品, 进行巢式 PCR 反应, 即将上述 PCR 产物作为模板进行第二轮 PCR 扩增, 反应试剂配置见表 3:

表 3

试剂	微升/反应
H ₂ O (HPLC 级)	16.3
10x PCR Buffer 含 2.0mM MgCl ₂	2.0
dNTP mix (均为 2.5 mM)	2
第五引物	1.0
第六引物	1.0
Taq® (5 U/μL)	0.2
模板 DNA	2
总体积	25

- 5 其反应条件为: 94℃, 1 min; 94℃变性 30 s, 54℃退火 30 s, 72℃延伸 1 min, 共扩增 40 个循环, 72℃延伸 5 min, 最终 12℃, 保持。

对提取的 HCV-cDNA 的 NS5B 区域进行 PCR 扩增反应, PCR 扩增反应试剂的配置见表 4:

表 4

试剂	微升/反应
H ₂ O (HPLC 级)	16.3
10x PCR Buffer 含 2.0mM MgCl ₂	2.0
dNTP mix (均为 2.5 mM)	2
第三引物	1.0
第四引物	1.0
Taq® (5 U/μL)	0.2
模板 DNA	2

总体积	25
-----	----

其中，反应条件为 94℃，1 min；94℃变性 30 s，46℃退火 30 s，72℃延伸 1 min，共扩增 40 个循环，72℃延伸 5 min，最终 12℃，保持。

进一步，针对拷贝数低的样品，进行巢式 PCR 反应，将上述 PCR 产物作为模板进行第二轮 PCR 扩增，反应试剂配置见表 5：

5

表 5

试剂	微升/反应
H ₂ O（HPLC 级）	16.3
10x PCR Buffer 含 2.0mM MgCl ₂	2.0
dNTP mix (均为 2.5 mM)	2
第七引物	1.0
第八引物	1.0
Taq® (5 U/μL)	0.2
模板 DNA	2
总体积	25

其反应条件为 94℃，1 min；94℃变性 30 s，46℃退火 30 s，72℃延伸 1 min，共扩增 40 个循环，72℃延伸 5 min，最终 12℃，保持。

5. 电泳检测

取 5 μL 的 PCR 产物，利用 1.5%的琼脂糖凝胶进行电泳检测，其中电压 140 伏，电泳 23 分钟。然后，EB 染胶 15 分钟后，采用凝胶成像系统拍照检测。

6. 切胶纯化

利用 1.5%的琼脂糖凝胶，将所有 PCR 产物均进行电泳检测，其中电压 100 伏，电泳 1 小时 30 分。然后在紫外灯下切下目的片段，放入 EP 管中。并根据纯化试剂盒说明书回收目的片段，最后溶解于水中。并电泳鉴定目的片段的回收浓度。

15 7. 测序反应

对获得的目的片段进行 PCR 测序反应。其中试剂的配置如下：

试剂	微升/反应
引物	1

bigdye	2
模板 DNA	2
总体积	5

反应条件为 96℃, 2min; 96℃变性 10s, 51℃退火 10s, 60℃延伸 190s, 共扩增 25 个循环, 最终 12℃, 保持。

7. 反应后纯化

7.1 PCR 循环完并冷却到 4℃, 取下并马上进行短时间离心 (4000rpm 离心 1min)。

5 7.2 加 2 微升的 0.125M 的 EDTA 于 PCR 测序反应产物中, 再加入 16 微升常温无水乙醇, 充分振荡 5min (关键), 振荡后短时间离心, 避光常温静置 15min。此时将离心机温度调至 4℃。

7.3 然后, 将上述反应产物于 4000rpm, 4℃下离心 30min, 并倒出孔中的液体, 倒扣在干净的纸巾上倒离心(到 700rpm 停止)。

10 7.4 加 30 微升 70%的冰乙醇 (-20℃) 于上步的反应产物中, 充分振荡 3min 后, 离心 15min, 然后倒出孔中的液体, 倒扣在干净的纸巾上倒离心(到 700rpm 停止)。

7.5 将上步的反应产物进行避光风干 15min, 加 8 微升 HI-DI, 贴普通封口膜, 短甩至 2000rpm。

15 7.6 变性 (96℃, 2min)。变性完后取出迅速放在冰盒上, 并冷却到 4℃后进行短时间离心 (4000rpm 离心 30s)。

8. 上 3730 测序仪

9. 数据分析

将 3730 测定的目的片段序列信息与 NCBI 中参考序列(NCBI 登录号: NC_004102, GenBank: D14853.1)进行比对, 比对结果显示, 目的片段序列与 NCBI 数据库中的几条 1b
20 型 HCV 病毒株的碱基序列比对匹配碱基数目最多, 由此, 判断病人的 HCV 基因型为 1b 型。

工业实用性

25 本发明的确定 HCV 核酸样本中预定区域核酸序列的方法、PCR 引物、试剂盒及其用途, 以及确定 HCV 核酸样本中预定区域核酸序列的系统, 能够有效地应用于确定 HCV 核酸样本中预定区域例如选自 5' UTR 和 NS5 的至少之一的核酸序列序列, 进而, 基于对所确定的核酸序列进行分析, 能够有效地确定 HCV 的基因型。

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。

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。

5

权利要求书

1、一种确定 HCV 核酸样本中预定区域核酸序列的方法，所述预定区域为选自 5' UTR 和 NS5 的至少之一，其特征在于，所述方法包括下列步骤：

- 5 使用第一引物组，对所述 HCV 核酸样本进行扩增，以便得到第一扩增产物；
 对所述第一扩增产物进行测序，以便得到测序结果；以及
 基于所述测序结果，确定所述预定区域的核酸序列，

 其中，所述第一引物组包含第一引物和第二引物的组合、以及第三引物和第四引物的组合的至少一种，所述第一引物具有 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列，所述第二引物具有
10 SEQ ID NO: 2 所示的核苷酸序列，所述第三引物具有 SEQ ID NO: 3 所示的核苷酸序列，
 所述第四引物组具有 SEQ ID NO: 4 所示的核苷酸序列。

2、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述 HCV 核酸样本是从 HCV 的携带者或 HCV 培养装置中分离的。

3、根据权利要求 2 所述的方法，其特征在于，所述 HCV 核酸样本选自血浆、血清、
15 全血、纯病毒培养物和携带 HCV 的媒介生物的至少一种。

4、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，在对所述 HCV 核酸样本进行扩增之前，进一步包括将所述 HCV 核酸样本进行逆转录。

5、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，进一步包括：利用第二引物组，对所述第一扩增产物进行扩增，以便得到第二扩增产物，并对所述第二扩增产物进行测序，

20 其中，所述第二引物组包括第五引物和第六引物的组合、以及第七引物和第八引物的组合的至少一种，所述第五引物具有如 SEQ ID NO: 5 所示的核苷酸序列，所述第六引物具有如 SEQ ID NO: 6 所示的核苷酸序列，所述第七引物具有如 SEQ ID NO: 7 所示的核苷酸序列，所述第八引物具有如 SEQ ID NO: 8 所示的核苷酸序列。

6、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，进一步包括通过选自琼脂糖凝胶电泳切
25 胶、磁珠纯化和纯化柱纯化的至少一种分离纯化所述第一扩增产物。

7、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述测序采用第一代测序方法，优选地采用 Sanger 法，特别优选地采用 3730 测序仪进行测序。

8、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，基于所述测序结果，确定所述 HCV 核酸样本中预定区域的核酸序列进一步包括：

30 将所述测序结果与参照序列进行比对，以便确定所述 HCV 核酸样本中预定区域的核酸序列。

9、一组 PCR 引物，其特征在于，包含第一引物和第二引物的组合、以及第三引物和第四引物的组合的至少一种，所述第一引物具有 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列，所述第二引物具有 SEQ ID NO: 2 所示的核苷酸序列，所述第三引物具有 SEQ ID NO: 3 所示的核苷酸序列，所述第四引物具有 SEQ ID NO: 4 所示的核苷酸序列。
35

10、根据权利要求 9 所述的 PCR 一组引物，其特征在于，进一步包括第五引物和第六

引物的组合、以及第七引物和第八引物的组合的至少一种，所述第五引物具有如 SEQ ID NO: 5 所示的核苷酸序列，所述第六引物具有如 SEQ ID NO: 6 所示的核苷酸序列，所述第七引物具有如 SEQ ID NO: 7 所示的核苷酸序列，所述第八引物具有如 SEQ ID NO: 8 所示的核苷酸序列。

5 11、一种试剂盒，其特征在于，包含权利要求 9 或 10 所示的一组 PCR 引物。

12、权利要求 11 的试剂盒在检测 HCV 基因的预定区域核酸序列的用途。

13、一种确定 HCV 核酸样本中预定区域核酸序列的系统，所述预定区域为选自 5' UTR 和 NS5 的至少之一，其特征在于，所述系统包括：

10 扩增装置，所述扩增装置中设置有权利要求 9 或 10 所示的一组 PCR 引物，用于对所述 HCV 核酸样本进行扩增，以便得到第一扩增产物；

测序装置，所述测序装置与所述扩增装置相连，并且适于对所述第一扩增产物进行测序，以便得到测序结果；以及

分析装置，所述分析装置与所述测序装置相连，用于基于所述测序结果，确定所述 HCV 核酸样本中预定区域的核酸序列。

15 14、根据权利要求 13 所述的系统，其特征在于，进一步包括：

核酸分离装置，所述核酸分离装置适于从 HCV 携带者或 HCV 培养装置中分离 HCV 核酸样本。

15、根据权利要求 13 所述的系统，其特征在于，所述测序装置为选自 Sanger 法测序装置的至少一种，优选为 3730 测序仪。

20 16、根据权利要求 13 所述的系统，其特征在于，所述分析装置进一步包括比对单元，所述比对单元中存储有参照序列，用于对所述测序结果与参照序列进行比对，以便确定所述 HCV 核酸样本中预定区域核酸序列。

25

30

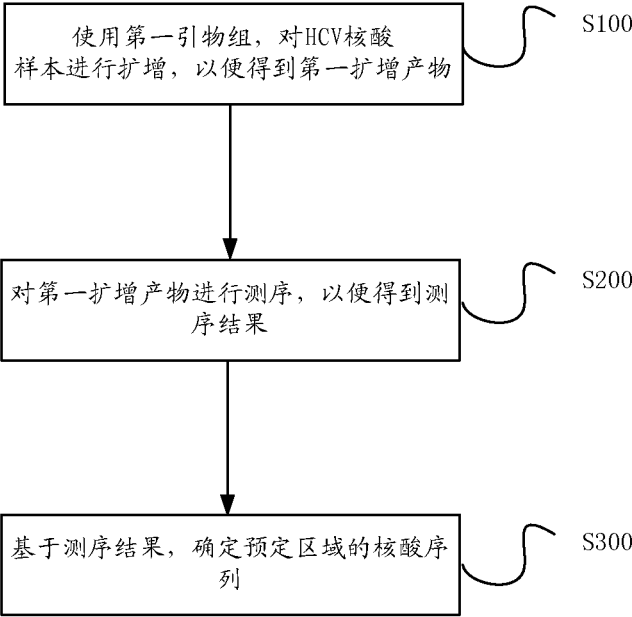


图 1

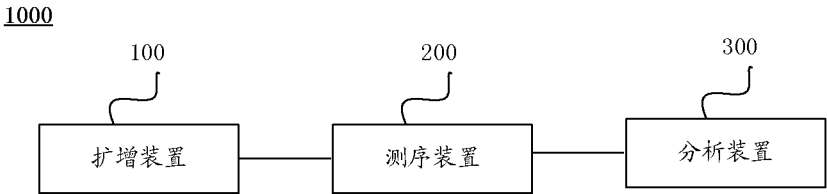


图 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2012/081154

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/68 (2006.01) i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C12Q

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)

CNKI, CNABS, NCBI, VEN, ISI-WEB OF KNOWLEDGE, GOOGLE SCHOLAR: HCV, genotype, genotyping, primer, nest PCR, sequencing, 5' non-coding region, 5'-UTR, NS5B, sequence search on SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 8

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BACLIG, M.O. et al. Correlation of the 5'untranslated region (5'UTR) and non-structural 5B (NS5B) nucleotide sequences in hepatitis C virus subtyping. Int J Mol Epidemiol Genet. 2010, vol. 1, no. 3, pages 236-244 See the whole document, especially table 1, pages 237-238	1-16
A	ANDONOV, A. et al. Genotyping of Canadian Hepatitis C Virus Isolates by PCR. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. 1994, vol. 32, no. 8, pages 2031-2034 See the whole document	1-16

☒ 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 05 June 2013 (05.06.2013)	Date of mailing of the international search report 27 June 2013 (27.06.2013)
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 TIAN, Yuan Telephone No. (86-10) 62411047

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2012/081154

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHEN, Zhenyu et al. Hepatitis C Virus Genotyping: Interrogation of the 5' Untranslated Region Cannot Accurately Distinguish Genotypes 1a and 1b. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. 2002, vol. 40, no. 9, pages 3127-3134 See the whole document	1-16

A. 主题的分类

C12Q 1/68 (2006.01) i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: C12Q

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))

CNKI, CNABS, NCBI, VEN, ISI-WEB OF KNOWLEDGE, GOOGLE SCHOLAR: HCV, 基因型, 分型, 引物, 巢式, PCR, 测序, 5' 非编码区, 5' UTR, NS5B, genotype, genotyping, primer, nest PCR, sequencing, SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:8 的序列检索

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	Michael O. Baclic等. Correlation of the 5' untranslated region (5' UTR) and non-structural 5B (NS5B) nucleotide sequences in hepatitis C virus subtyping. Int J Mol Epidemiol Genet.2010, 第1卷, 第3期, 第236-244页 参见全文, 特别是表1, 第237-238页	1-16
A	A. ANDONOV 等.Genotyping of Canadian Hepatitis C Virus Isolates by PCR. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY.1994, 第 32 卷, 第 8 期, 第 2031-2034 页 参见全文	1-16

☒ 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
05.6 月 2013 (05.06.2013)

国际检索报告邮寄日期
27.6 月 2013 (27.06.2013)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:
中华人民共和国国家知识产权局
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088
传真号: (86-10)62019451

授权官员
田园
电话号码: (86-10) 62411047

C(续). 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	Zhenyu Chen 等. Hepatitis C Virus Genotyping: Interrogation of the 5' Untranslated Region Cannot Accurately Distinguish Genotypes 1a and 1b. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY.2002, 第 40 卷, 第 9 期, 第 3127-3134 页 参见全文	1-16