



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106367528 A

(43)申请公布日 2017.02.01

(21)申请号 201610741104.7

(22)申请日 2016.08.26

(71)申请人 厦门大学

地址 361005 福建省厦门市思明南路422号

申请人 厦门致善生物科技股份有限公司

(72)发明人 廖逸群 李庆阁 许晔 宋娜杰
占伟 牟毅 吴玉珍

(74)专利代理机构 厦门南强之路专利事务所
(普通合伙) 35200

代理人 马应森

(51)Int.Cl.

C12Q 1/70(2006.01)

C12Q 1/68(2006.01)

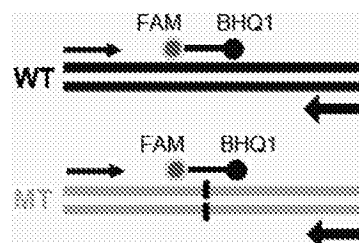
权利要求书1页 说明书5页 附图3页

(54)发明名称

一种乙型肝炎病毒耐药突变的检测方法

(57)摘要

一种乙型肝炎病毒耐药突变的检测方法,涉及乙型肝炎病毒。包括以下步骤:1)在HBV聚合酶基因序列上的相对保守区域设计PCR扩增引物;2)设计能够覆盖HBV耐药突变位点的荧光探针;3)通过熔解曲线分析技术识别荧光探针和PCR扩增产物杂交后的特征熔点温度值;4)判定待HBV聚合酶基因序列是否发生耐药突变,并识别HBV耐药突变的类型。覆盖耐药突变位点全面、检测效率高,检测耗时短;均相检测、闭管操作;操作简便、检测通量高;检测特异性高、结果容易判读。



1. 一种乙型肝炎病毒耐药突变的检测方法,其特征在于包括以下步骤:

- 1) 在HBV聚合酶基因序列上的相对保守区域设计PCR扩增引物;
- 2) 设计能够覆盖HBV耐药突变位点的荧光探针;
- 3) 通过熔解曲线分析技术识别荧光探针和PCR扩增产物杂交后的特征熔点温度值;
- 4) 判定待HBV聚合酶基因序列是否发生耐药突变,并识别HBV耐药突变的类型。

2. 如权利要求1所述一种乙型肝炎病毒耐药突变的检测方法,其特征在于在步骤1)中,所述PCR扩增引物的长度为15~40bp的寡核苷酸链;

上游PCR扩增引物碱基序列为5'-AGACTCGTGGTGGACTTCTCTCA-3';

下游PCR扩增引物碱基序列为5'-TTGACATACTTTCCAATCAAT-3'。

3. 如权利要求1所述一种乙型肝炎病毒耐药突变的检测方法,其特征在于在步骤2)中,所述荧光探针为淬灭荧光探针,标记有荧光基团和淬灭基团。

4. 如权利要求3所述一种乙型肝炎病毒耐药突变的检测方法,其特征在于所述荧光基团为饱和染料,所述荧光基团的类型包括但不限于:ALEX-350、FAM、VIC、TET、CAL Fluor Gold 540、JOE、HEX、CAL Flour Orange 560、TAMRA、Cal Fluor Red 590、ROX、CAL Fluor Red610、TEXAS RED、CAL Flour Red 635、Quasar 670、CY3、CY5、CY5.5、Quasar 705。

5. 如权利要求3所述一种乙型肝炎病毒耐药突变的检测方法,其特征在于所述淬灭基团包括但不限于DABCYL、BHQ、ECLIPSE或TAMRA。

6. 如权利要求1所述一种乙型肝炎病毒耐药突变的检测方法,其特征在于在步骤2)中,所述荧光探针覆盖至少一个耐药突变位点,所述耐药突变位点为:rt80、rt174、rt180、rt181、rt184、rt194、rt202、rt204、r233、rt236中的至少一个。

7. 如权利要求1所述一种乙型肝炎病毒耐药突变的检测方法,其特征在于在步骤2)中,荧光探针可判定待检HBV对哪种核苷类似物产生耐药。

8. 如权利要求1所述一种乙型肝炎病毒耐药突变的检测方法,其特征在于在步骤3)中,所述PCR扩增的成分如下:75mmol/L Tris-HCl pH 8.5,20mmol/L (NH₄)₂SO₄,0.1% Tween20,2.5mmol/L MgCl₂,200μmol/L dNTPs,1U Taq polymerase,0.04μmol/L上游PCR扩增引物,0.4μmol/L下游PCR扩增引物,荧光探针0.2μmol/L,HBV DNA模板5μl。

9. 如权利要求1所述一种乙型肝炎病毒耐药突变的检测方法,其特征在于在步骤3)中,所述PCR扩增的程序如下:95℃预变性3min;95℃15s,52℃20s,72℃20s,45个循环;每个循环在52℃退火时采集FAM、TET、ROX、CY5四个通道的荧光信号。

10. 如权利要求1所述一种乙型肝炎病毒耐药突变的检测方法,其特征在于在步骤3)中,所述熔解曲线分析的程序如下:95℃预变性1min;35℃1min;35℃升温到75℃熔解,温度每上升0.5℃采集一次荧光信号。

一种乙型肝炎病毒耐药突变的检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及乙型肝炎病毒 (HBV), 尤其是涉及一种乙型肝炎病毒耐药突变的检测方法。

背景技术

[0002] HBV是引起病毒性肝炎的主要病原体之一, 而且HBV慢性感染人群患原发性肝癌的可能性是正常人群的300倍以上。目前用于HBV治疗的临床药物主要有两大类: 干扰素类和核苷类似物类。干扰素类药物主要通过激活细胞表达多种抗病毒蛋白, 从而实现对病毒的抑制作用。干扰素治疗具有治疗成功后复发率低的优点, 不过较长的起效时间和较多的禁忌症限制了干扰素的临床应用。核苷类似物主要通过竞争性结合HBV聚合酶的dNTP结合位点来阻断病毒的复制, 从而快速有效地降低体内病毒载量。核苷类似物类药物具有见效快、疗效好、副作用小以及口服用药等优点, 是目前临床上治疗病毒性肝炎最常用的抗HBV药物。目前已经获得FDA批准用于乙型肝炎治疗的核苷类似物有以下五种: 拉米夫定 (LMV, 1998年获得批准)、阿德福韦 (ADV, 2002年获得批准)、恩替卡韦 (ETV, 2005年获得批准)、替比夫定 (LdT, 2006年获得批准) 和替诺福韦 (TDF, 2008年获得批准)。

[0003] HBV在复制过程中需要经过逆转录步骤而且HBV聚合酶缺乏校正功能, 因此HBV在复制子代基因组DNA过程中容易出现碱基突变。伴随着核苷类似物在临床治疗上的长期使用, HBV在药物环境筛选作用下就会发生针对核苷类似物的耐药突变, 从而导致药物的疗效在不同程度上的降低^[1]。因此如果患者携带的HBV为耐药突变株, 那么就需要根据发生耐药突变位点情况调整核苷类似物的用药类型或给药剂量^[2,3]。同时也可以采取干扰素和核苷类似物联合治疗的方案来解决HBV耐药突变问题^[4,5]。产生耐药突变的HBV病毒株的复制能力普遍要低于野生株。HBV主要耐药位点发生突变时, 经常会伴随有提高病毒复制能力的补偿突变。在这种情况下, 就需要根据HBV突变组合情况及时修正治疗疗程。所以快速准确地检测出乙型肝炎患者所携带的HBV病毒株是否产生耐药突变以及耐药突变的具体类型就显的尤为重要。

[0004] 目前国内外临床上使用的HBV耐药检测方法主要有两种类型: 第一种为特异探针膜杂交技术, 例如比利时Innogenetics公司的HBV DR v.3试剂盒^[6]和深圳亚能生物技术有限公司的HBV耐药突变基因检测试剂盒^[7]。这类试剂盒均存在操作步骤多, 操作时间长, 需要PCR后处理, 易发生污染等问题。另一类为荧光探针实时PCR技术, 例如德国MoBiTec公司的HBV Quantitative and YMDD Mutation Real Time PCR试剂盒和上海科华生物科技有限公司的HBV YMDD基因突变检测试剂盒^[8]。这类试剂盒能够检测突变类型则十分有限。

[0005] 综上所述, 虽然目前国内外已有多种HBV耐药突变检测方法, 但是都具有一定的局限性, 所以有必要开发一种快速简便、灵敏特异、稳定可靠的高通量HBV耐药突变检测方法。

[0006] 参考文献:

[0007] [1] Zoulim F, Locarnini S. Hepatitis B virus resistance to nucleoside analogues [J]. *Gastroenterology*, 2009, 137 (5): 1593-1608e1591-1592.

- [0008] [2] Ayoub W, Keefe E. Review article: current antiviral therapy of chronic hepatitis B [J]. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 2008, 28 (2): 167-177.
- [0009] [3] Choe WH, Kwon SY, Kim BK, et al. Tenofovir plus lamivudine as rescue therapy for adefovir-resistant chronic hepatitis B in hepatitis B e antigen-positive patients with liver cirrhosis [J]. *Liver International*, 2008, 28 (6): 814-820.
- [0010] [4] Gish RG, Locarnini SA. Chronic hepatitis B: current testing strategies [J]. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2006, 4 (6): 666-676.
- [0011] [5] Saltk-Temizel IN, Koçak N, Demir H. Lamivudine and High-dose Interferon-[alpha] Combination Therapy for Naive Children With Chronic Hepatitis B Infection [J]. *Journal of clinical gastroenterology*, 2005, 39 (1): 68.
- [0012] [6] Degertekin B, Hussain M, Tan J, et al. Sensitivity and accuracy of an updated line probe assay (HBV DR v.3) in detecting mutations associated with hepatitis B antiviral resistance [J]. *Journal of hepatology*, 2009, 50 (1): 42-48.
- [0013] [7] 欧阳耀灵, 杨忠民, 刘顺, 卢亚祖, 胡勤明. HBV基因分型和耐药突变基因检测 [J] 《中国卫生检验杂志》, 2015, 25卷, 13期, 2176-2178。
- [0014] [8] 陈建, 王缦, 陈华, 王卓莹, 华兵. 实时荧光PCR法快速检测乙型肝炎病毒基因YMDD突变株 [J] 《中国生物制品学杂志》, 2008, 21卷, 4期, 333-336。

发明内容

[0015] 本发明的目的在于提供基于荧光探针熔解曲线分析技术的一种乙型肝炎病毒耐药突变的检测方法。

[0016] 本发明包括以下步骤:

[0017] 1) 在HBV聚合酶基因序列上的相对保守区域设计PCR扩增引物;

[0018] 2) 设计能够覆盖HBV耐药突变位点的荧光探针;

[0019] 3) 通过熔解曲线分析技术识别荧光探针和PCR扩增产物杂交后的特征熔点温度值;

[0020] 4) 判定待HBV聚合酶基因序列是否发生耐药突变, 并识别HBV耐药突变的类型。

[0021] 在步骤1) 中, 所述PCR扩增引物的长度为15~40bp的寡核苷酸链;

[0022] 上游PCR扩增引物碱基序列为5'-AGACTCGTGGTGGACTTCTCTCA-3';

[0023] 下游PCR扩增引物碱基序列为5'-TTGACATACTTTCCAATCAAT-3'。

[0024] 在步骤2) 中, 所述荧光探针为淬灭荧光探针, 标记有荧光基团和淬灭基团; 所述荧光基团为饱和染料, 这些荧光基团类型包括但不限于: ALEX-350、FAM、VIC、TET、CAL Fluor Gold 540、JOE、HEX、CAL Fluor Orange 560、TAMRA、Cal Fluor Red 590、ROX、CAL Fluor Red 610、TEXAS RED、CAL Fluor Red 635、Quasar 670、CY3、CY5、CY5.5或Quasar 705; 淬灭基团包括但不限于DABCYL、BHQ、ECLIPSE或TAMRA; 所述荧光探针可覆盖至少一个耐药突变位点, 所述耐药突变位点可为: rt80、rt174、rt180、rt181、rt184、rt194、rt202、rt204、rt233、rt236等中的至少一个; 荧光探针可判定待检HBV对哪种核苷类似物产生耐药。

[0025] 在步骤3)中,所述PCR扩增的成分如下:75mmol/L Tris-HCl pH 8.5,20mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,0.1% Tween20,2.5mmol/L MgCl_2 ,200 $\mu\text{mol/L}$ dNTPs,1U Taq polymerase,0.04 $\mu\text{mol/L}$ 上游PCR扩增引物,0.4 $\mu\text{mol/L}$ 下游PCR扩增引物,荧光探针0.2 $\mu\text{mol/L}$,HBV DNA模板5 μl ;所述PCR扩增的程序如下:95 $^\circ\text{C}$ 预变性3min;95 $^\circ\text{C}$ 15s,52 $^\circ\text{C}$ 20s,72 $^\circ\text{C}$ 20s,45个循环;每个循环在52 $^\circ\text{C}$ 退火时采集FAM、TET、ROX、CY5四个通道的荧光信号;

[0026] 所述熔解曲线分析的程序如下:95 $^\circ\text{C}$ 预变性1min;35 $^\circ\text{C}$ 1min;35 $^\circ\text{C}$ 升温到75 $^\circ\text{C}$ 熔解,温度每上升0.5 $^\circ\text{C}$ 采集一次荧光信号。

[0027] 本发明的有益效果如下:

[0028] (1)覆盖耐药突变位点全面、检测效率高,检测耗时短:本发明覆盖了HBV对拉米夫定、阿德福韦、恩替卡韦、替比夫定和替诺福韦五种药物的主要耐药位点的突变检测。在单个PCR体系中可完成多个HBV耐药位点的检测。整个检测操作流程少于3h。

[0029] (2)均相检测、闭管操作:本发明为均相检测体系,PCR扩增及熔解曲线分析都在同一封闭的反应管中完成,无需PCR后处理,减少了PCR产物污染的风险。

[0030] (3)操作简便、检测通量高:本发明基于荧光PCR和熔解曲线技术,PCR后只需运行一个简单的熔解曲线分析步骤即可完成。由于熔解曲线分析时间只需30min,因此可以通过在普通PCR仪上完成扩增后再置于实时荧光PCR仪上进行熔解曲线分析来提高荧光PCR仪的利用率,进一步提高检测通量。

[0031] (4)检测特异性高、结果容易判读:本发明是通过荧光探针和PCR扩增产物杂交的熔点温度变化来判读HBV是否产生耐药突变。熔点温度可由仪器自动判读,减少了人为误差,结果客观准确,因而检测特异性高。

附图说明

[0032] 图1为本发明的PCR扩增步骤技术原理图。

[0033] 图2为本发明的原始熔解曲线分析步骤技术原理图。

[0034] 图3为本发明的熔解曲线求导及结果判读步骤技术原理图。

[0035] 图4为实施例一中本发明对HBV的rt204耐药位点检测结果。

[0036] 图5为实施例二中本发明对HBV的rt173耐药位点检测结果。

[0037] 图6为实施例三中本发明对野生型HBV检测灵敏度考察结果。

[0038] 图7为实施例三中本发明对耐药突变型HBV检测灵敏度考察结果。

具体实施方式

[0039] 以下实施例将结合附图对本发明作进一步的说明。

[0040] 本发明的基本原理如下:如图1所示,所述上游PCR扩增引物和下游PCR扩增引物对特定的HBV聚合酶基因序列进行不对称PCR扩增;不对称PCR扩增后产生大量可与所述荧光探针互补的DNA单链;如图2所示,荧光探针与野生型HBV(WT)的PCR扩增产物和耐药突变型HBV(MT)PCR扩增产物的杂交稳定性不同;最后如图3所示,可以根据荧光探针与PCR扩增产物杂交时的熔点温度判断待检HBV模板是否携带耐药突变。

[0041] 以下给出具体实施例。

[0042] 实施例一:

[0043] 野生型HBV (WT) 和三种耐药突变型HBV (204V、204I和204S) 在ROX通道的检测结果如图4所示。

[0044] 该实施例检测流程如下：

[0045] (1) 分别配制以下PCR扩增体系：75mmol/L Tris-HCl pH 8.5, 20mmol/L (NH₄)₂SO₄, 0.1% Tween20, 2.5mmol/L MgCl₂, 200μmol/L dNTPs, 1U Taq polymerase, 0.04μmol/L上游PCR扩增引物, 0.4μmol/L下游PCR扩增引物, 荧光探针0.2μmol/L, 野生型HBV (WT) 和三种耐药突变型HBV (204V、204I和204S) DNA模板各5μl。所述上游PCR扩增引物碱基序列为5'-AGACTCGTGGTGGACTTCTCTCA-3'; 下游PCR扩增引物碱基序列为5'-TTGACATACTTTCCAATCAAT-3'。所述荧光探针碱基序列为5'-TGGCTTTCAGTTATGTGGATGATTGGT-3', 5'端标记ROX荧光基团, 3'端标记BHQ2淬灭基团。

[0046] (2) 在Bio-Rad公司CFX-96机型的实时荧光PCR仪上运行如下程序：95℃预变性3min; 95℃15s, 52℃20s, 72℃20s, 45个循环; 每个循环在52℃退火时采集FAM、TET、ROX、CY5四个通道的荧光信号。95℃预变性1min; 35℃1min; 35℃升温到75℃熔解, 温度每上升0.5℃采集一次荧光信号。

[0047] (3) 结果判读：黑色熔解曲线为野生型HBV (WT) 的检测结果, 特征熔点温度值为63.6±0.32℃; 黑色熔解曲线为三种耐药突变型HBV (204V、204I和204S) 的检测结果, 204V特征熔点温度值为56.0±0.32℃, 204I特征熔点温度值为53.5±0.32℃, 204S特征熔点温度值为49.6±0.42℃。野生型HBV和三种耐药突变型HBV特征熔点温度差值均在7℃以上。

[0048] 实施例二：

[0049] 野生型HBV (WT) 和两种种耐药突变型HBV (173L和173G) 在FAM通道的检测结果如图5所示。

[0050] 该实施例检测流程如下：

[0051] (1) 分别配制以下PCR扩增体系：75mmol/L Tris-HCl pH 8.5, 20mmol/L (NH₄)₂SO₄, 0.1% Tween20, 2.5mmol/L MgCl₂, 200μmol/L dNTPs, 1U Taq polymerase, 0.04μmol/L上游PCR扩增引物, 0.4μmol/L下游PCR扩增引物, 荧光探针0.2μmol/L, 野生型HBV (WT) 和两种耐药突变型HBV (173L和173G) DNA模板各5μl。所述上游PCR扩增引物碱基序列为5'-AGACTCGTGGTGGACTTCTCTCA-3'; 下游PCR扩增引物碱基序列为5'-TTGACATACTTTCCAATCAAT-3'。所述荧光探针碱基序列为5'-CTATGGGAGTGGGCCTCAGT-3', 5'端标记FAM荧光基团, 3'端标记BHQ1淬灭基团。

[0052] (2) 在Bio-Rad公司CFX-96机型的实时荧光PCR仪上运行如下程序：95℃预变性3min; 95℃15s, 52℃20s, 72℃20s, 45个循环; 每个循环在52℃退火时采集FAM、TET、ROX、CY5四个通道的荧光信号。95℃预变性1min; 35℃1min; 35℃升温到75℃熔解, 温度每上升0.5℃采集一次荧光信号。

[0053] (3) 结果判读：黑色熔解曲线为野生型HBV (WT) 的检测结果, 特征熔点温度值为59.1±0.32℃; 黑色熔解曲线为两种耐药突变型HBV (173L和173G) 的检测结果, 173L特征熔点温度值为55.1±0.32℃, 173G特征熔点温度值为51.6±0.32℃。野生型HBV和两种耐药突变型HBV特征熔点温度差值均在4℃以上。

[0054] 实施例三：

[0055] 本发明对野生型HBV (WT) 检测灵敏度考察结果如图6所示; 耐药突变型HBV (204V)

检测灵敏度考察结果如图7所示。

[0056] 该实施例检测流程如下：

[0057] (1) 分别配制以下PCR扩增体系：75mmol/L Tris-HCl pH 8.5, 20mmol/L (NH₄)₂SO₄, 0.1% Tween20, 2.5mmol/L MgCl₂, 200μmol/L dNTPs, 1U Taq polymerase, 0.04μmol/L上游PCR扩增引物, 0.4μmol/L下游PCR扩增引物, 荧光探针0.2μmol/L, 浓度为1×10⁶, 1×10⁵, 1×10⁴, 1×10³, 1×10², 1×10¹拷贝/μL的野生型HBV (WT) 和耐药突变型HBV (204V) DNA模板各5μL。

[0058] 所述上游PCR扩增引物碱基序列为5'-AGACTCGTGGTGGACTTCTCTCA-3'；

[0059] 所述下游PCR扩增引物碱基序列为5'-TTGACATACTTTCCAATCAAT-3'。

[0060] 所述荧光探针碱基序列为5'-TGGCTTTCAGTTATGTGGATGATTGGT-3', 5'端标记ROX荧光基团, 3'端标记BHQ2淬灭基团。

[0061] (2) 在Bio-Rad公司CFX-96机型的实时荧光PCR仪上运行如下程序：95℃预变性3min; 95℃15s, 52℃20s, 72℃20s, 45个循环; 每个循环在52℃退火时采集FAM、TET、ROX、CY5四个通道的荧光信号。95℃预变性1min; 35℃1min; 35℃升温到75℃熔解, 温度每上升0.5℃采集一次荧光信号。

[0062] (3) 结果判读：所有浓度的野生型HBV (WT) 和耐药突变型HBV (204V) 均有显著的检测信号, 即本发明对野生型HBV和耐药突变型HBV的检测灵敏度均至少可到达5拷贝/反应。图6与图7中红色熔解曲线为本发明对野生型HBV和耐药突变型HBV检测灵敏度下限 (5拷贝/反应) 的检测结果。本发明涉及的PCR扩增引物和荧光探针序列参见表1。

[0063] 表1

[0064]

引物名称和探针名称	引物序列和探针序列 (5'端至3'端)	5'端荧光 基团	3'端淬灭 基团
上游PCR扩增引物	AGACTCGTGGTGGACTTCTCTCA	无	无
下游PCR扩增引物	TTGACATACTTTCCAATCAAT	无	无
rt204位点荧光探针	TGGCTTTCAGTTATGTGGATGATTGGT	ROX	BHQ2
rt173位点荧光探针	CTATGGGAGTGGGCCTCAGT	FAM	BHQ1

[0065] 本发明相对传统HBV耐药突变检测方法具备覆盖位点全面、检测灵敏度高、检测特异性好、检测通量高、操作简便、耗时短等优点。

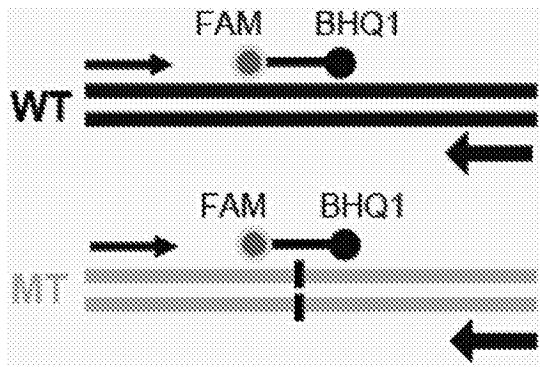


图1

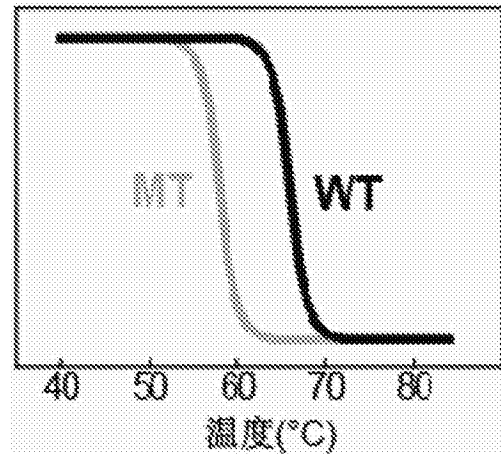


图2

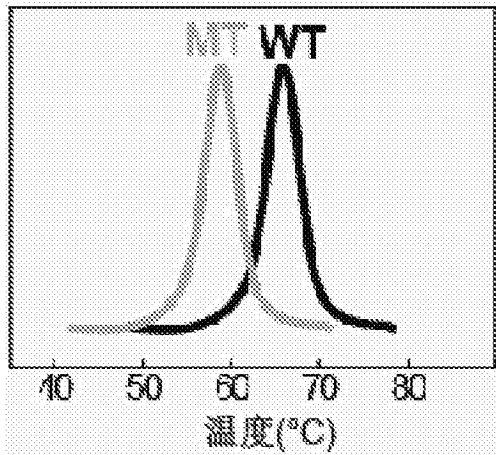


图3

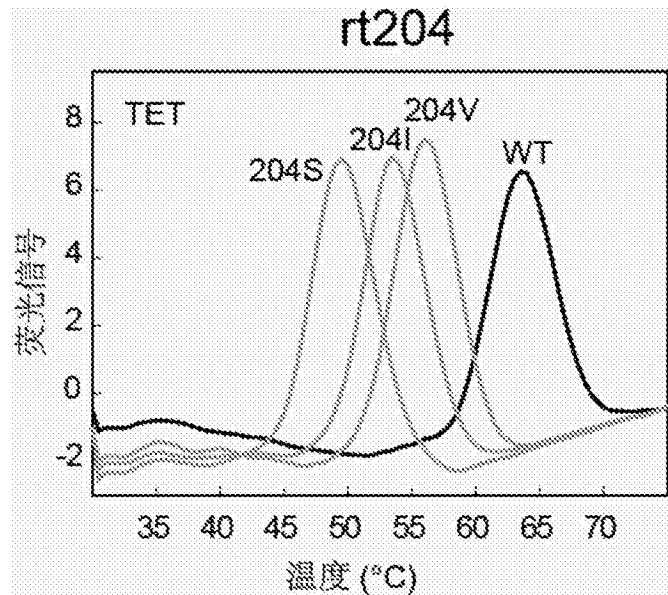


图4

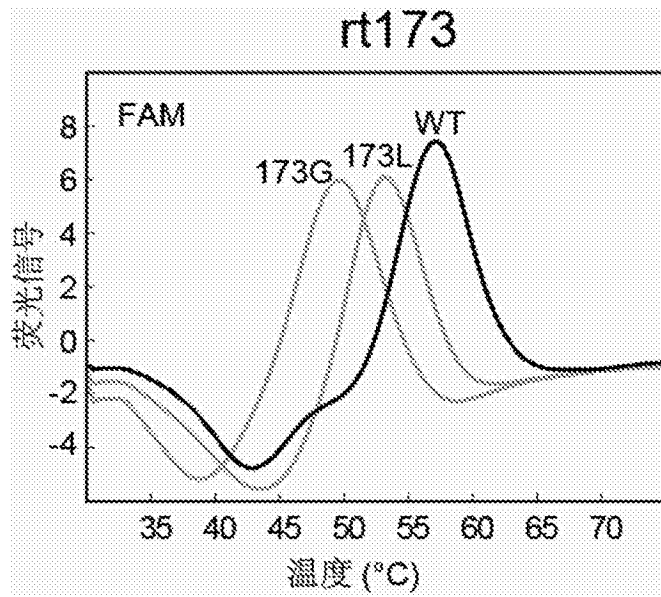


图5

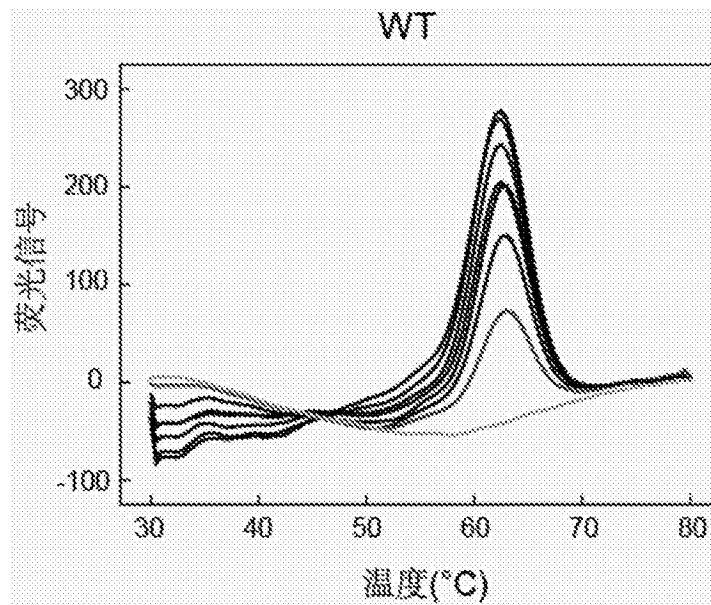


图6

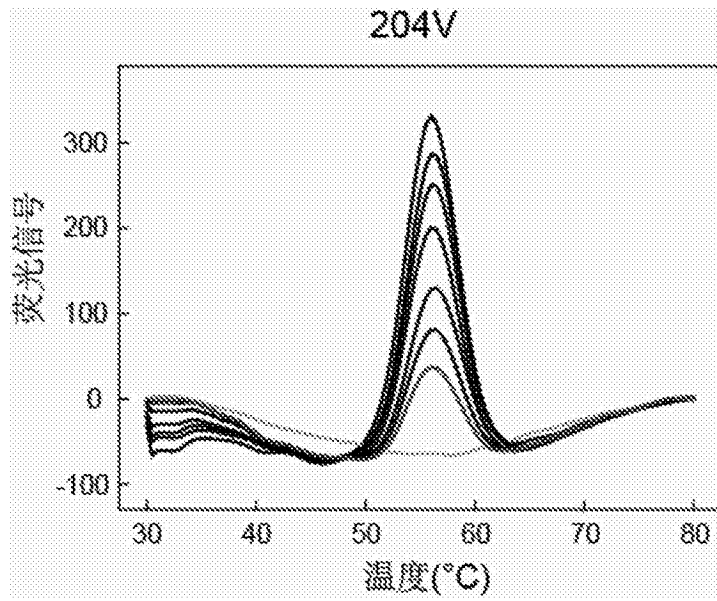


图7