

(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
2010 年 11 月 11 日 (11.11.2010)

PCT

(10) 国际公布号
WO 2010/127474 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 7/00 (2006.01) C12N 15/01 (2006.01)
C12Q 1/70 (2006.01) C12N 15/51 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) C12R 1/92 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2009/001165
- (22) 国际申请日: 2009 年 10 月 20 日 (20.10.2009)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
200910083422.9 2009 年 5 月 4 日 (04.05.2009) CN
- (71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 北京大学人民医院 (PEKING UNIVERSITY PEOPLE'S HOSPITAL) [CN/CN]; 中国北京市西城区西直门南大街 11 号北京大学人民医院肝病研究所, Beijing 100044 (CN)。
- (72) 发明人; 及
- (75) 发明人/申请人 (仅对美国): 魏来 (WEI, Lai) [CN/CN]; 中国北京市西城区西直门南大街 11 号北京大学人民医院肝病研究所, Beijing 100044 (CN)。 杜绍财 (DU, Shaocai) [CN/CN]; 中国北京市西城区西直门南大街 11 号北京大学人民医院肝病研究所, Beijing 100044 (CN)。 刘丽君 (LIU, Lijun) [CN/CN]; 中国北京市西城区西直门南大街 11 号北京大学人民医院肝病研究所, Beijing 100044 (CN)。 汪江华 (WANG, Jianghua) [CN/CN]; 中国北京市西城区西直门南大街 11 号北京大学人民医院肝病研究所, Beijing 100044 (CN)。
- (74) 代理人: 北京路浩知识产权代理有限公司 (CN-KNOWHOW INTELLECTUAL PROPERTY AGENT LIMITED); 中国北京市海淀区大柳树路 17 号富海国际港 707 室, Beijing 100081 (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, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (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, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则 4.17 的声明:

— 发明人资格(细则 4.17(iv))

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: A HEPATITIS B VIRUS MUTATION STRAIN WITH RESISTANCE TO ADEFOVIR DIPIVOXIL AND THE USES THEREOF

(54) 发明名称: 乙型肝炎病毒耐阿德福韦变异病毒株及其应用

(57) Abstract: A HBV mutation strain is provided, wherein rtE218G mutation occurs at the polymerase region of the mutation strain. The use of the HBV strain in screening anti-HBV drugs and related detection reagents used to detect rtE218G mutation are also provided.

(57) 摘要:

提供了一种 HBV 突变株, 该突变株的聚合酶区发生了 rtE218G 突变。还提供了所述病毒株在筛选抗 HBV 药物中的应用, 以及检测 rtE218G 突变的相关检测试剂。

WO 2010/127474 A1

乙型肝炎病毒耐阿德福韦变异病毒株及其应用

技术领域

本发明涉及医药生物技术领域，具体涉及一株耐阿德福韦的乙型肝炎病毒（HBV）变异株，本发明还涉及其检测试剂以及该病毒株在耐药性监测，交叉耐药性分析、药物筛选和新药物的发现等多方面的应用。

背景技术

阿德福韦酯是腺嘌呤磷酸酯化合物阿德福韦（ADV）的前药，口服后可迅速水解为 ADV 而发挥抗病毒作用。ADV 是广谱抗病毒药物，为核苷类病毒逆转录酶抑制剂，通过抑制 HBV 的复制而发挥抗病毒作用。研究已证实，ADV 对 HBeAg 阳性或 HBeAg 阴性的慢性乙型肝炎患者均有很好的疗效和安全性。现已作为一线药物应用于慢性乙型肝炎的抗病毒治疗。

与其他核苷类药物一样，ADV 治疗中，也会发生 HBV DNA 耐药突变，从而导致 ADV 耐药。研究表明，ADV 治疗慢性乙型肝炎患者过程中，第 1-5 年的耐药突变发生率分别为 0%、3%、11%、18%和 29%。

最常见的 ADV 耐药突变是 HBV 聚合酶 D 区的 rtN236T 和 B 区的 rtA181V/T。在 ADV 治疗初期，几种突变可以伴随发生，也可单独出现，但随着疗程的增加，rtA181V 常伴随 rtN236T 而出现。在体外药敏试验中，与野生株病毒相比，rtN236T 变异病毒株对 ADV 的敏感性下降了 3.9 至 13.8 倍，而 rtA181V 变异株下降了 2.5 至 3.0 倍。已有多项研究指出，rtN236T 的出现改变了复制催化活性区内氨基酸的极性，使得 HBV 聚合酶的折叠发生了变化，因此在复制阶段不利于其与底物的结合，从而导致复制过程受阻碍。而 rtA181V 的出现，在一定程度上校正了氨基酸极性上的变化，使得发生 rtN236T 突变后，聚合酶折叠更接近于原来状态，有利于耐药性变异病毒株的复制传代。此外，体内试验和体外试验的数据均提示，rtA181V 变异对拉米夫定的敏感性不及 rtN236T 变异。这很可能是因为 rtA181V 变异与拉米夫定的 rtL180M 相毗邻，所以任何一种变异的发生都会对其产生邻位效应。

突变 rtN236T 和 rtA181V 对 HBeAg 阴性和阳性患者的影响不完全相同。ADV 耐药现象在低病毒血症且 HBeAg 阳性患者中的发生率相当低，耐药的发生也部分

体现在 ALT 的升高上。对于 HBeAg 阴性的患者来说，ADV 治疗 48 周后停药，治疗获益常在停药 1~2 年后消失。但若继续用药直至 144 周，患者在治疗 48 周时所获得的病毒学、血清生化及组织学等各方面改善，将被保留且进一步好转。期间耐药发生率很低，且负面作用与初始的 48 周治疗时相似。

目前，ADV 也常用于前期拉米夫定治疗失效的患者。早期 48 周及 96 周临床试验均提示，无论是野生型还是 YMDD 突变型病毒株，均对 ADV 敏感，治疗后 HBV DNA 下降呈指数趋势，且患者的耐受性良好。故两种药物联合应用更加有效地抑制了病毒的复制，但也可能发生聚合酶区的 rtL180M+M204V 和 rtN236T 联合突变，对拉米夫定和 ADV 产生双重耐药。尽管研究表明，拉米夫定耐药株对 ADV 敏感，但对 HBV 本身来说，三种变异联合增加了对 ADV 的耐药水平，与 rtN236T 单突变相比，对 ADV 的敏感性下降了 2 倍。在分子水平，联合突变导致底物结合位点更难与阿德福韦结合，因此进一步降低了对 ADV 的敏感性。

迄今为止，学者们发现不但 HBV 聚合酶基因区的 rtA181V、rtN236T 变异可引起 ADV 相关耐药，其他许多与 ADV 相关的突变，例如 rtI233V、rtS85A、rtS85P、rtS119A、rtH133L、rtV214A、rtH234Q、rtP237H 和 rtN238D 等，也可能与 ADV 耐药有关。然而，仍有许多慢性乙型肝炎患者，在 ADV 治疗中出现临床耐药，却检测不出已知变异位点的存在。故 ADV 相关 HBV 突变的研究还需要进一步的探索。

发明内容

本发明的目的是，找到引起 ADV 耐药的 HBV 新变异位点和相应的 HBV 突变病毒株，提供此新变异位点的检测方法和检测试剂盒，提供相应 HBV 突变病毒株的鉴定方法和鉴定试剂盒，以及此新变异位点和相应的 HBV 突变病毒株在筛选抗 HBV 药物，监测耐药突变等方面的应用。

本发明发现 rtE218G 突变，即 HBV DNA 聚合酶区 218 位的氨基酸密码子由 GAG 突变为 GGG，该突变是与 ADV 耐药相关的新的 HBV 基因突变位点。体外表型实验结果显示，rtE218G 突变病毒株能够独立引起对 ADV 的耐药，其 IC₅₀ 是野生病毒株的 5.5 倍。rtE218G 突变株在体外的复制能力有所降低，大约是野生株的 87%。

本发明还提供 rtE218G 突变株在筛选抗病毒药物中的应用。可以利用该突变株对其他抗 HBV 药物进行交叉耐药性分析和用药筛选。本领域技术人员还可以进一步将含有 rtE218G 突变位点的 DNA 片段克隆到载体中，并且可以进一步将所述载体导入相应的宿主细胞中，以便于使用和保存。

本发明还提供几种检测 rtE218G 突变位点和鉴定相应 HBV 突变病毒株的方法，包括：

1、特异性探针杂交法：用针对 rtE218G 突变位点的探针与待检 HBV DNA 片段进行杂交，通过检测杂交结果，判断是否发生了 rtE218G 突变。可以采用反向探针杂交法，即将所述探针固定在固相载体上，将带有标记的待检 DNA 片段与之杂交，洗掉未杂交的序列，进而检测杂交结果。按照这种原理，可进一步采用以下两种方法进行杂交检测：

1) 反向线性探针杂交法：基于探针杂交原理，先设计合成一系列探针，覆盖突变高发区，其中 S 系列探针针对野生株序列，R 系列探针含数个有常见突变序列的探针，还可以设计一个有种属特异性的探针，将这一系列探针顺次固定于同一杂交膜上，在严格条件下与亲和素标记的 PCR 产物杂交，检测杂交信号，根据不同杂交带谱判定出突变有无及大致位置。基于反向杂交的原理，扩增后的被生物素标记的 HBV DNA 产物，与平行线形式固定在尼龙膜检测条上的特异性寡核苷酸探针杂交。杂交后，未能杂交的 DNA 从检测条上被洗脱。随后加入标记有碱性磷酸酶的链霉亲和素，与杂交产物上标记的生物素结合。最后加入 BCIP/NBT 显色，显现紫色/棕色，从而判断结果。

2) 基因芯片法：利用杂交的原理，即 DNA 根据碱基配对原则，在常温下和中性条件下形成双链 DNA 分子，但在高温、碱性或有机溶剂等条件下，双螺旋之间的氢键断裂，双螺旋解开，形成单链分子（称为 DNA 变性，DNA 变性时的温度称 T_m 值）。变性的 DNA 黏度下降，沉降速度增加，浮力上升，紫外吸收增加。当消除变性条件后，变性 DNA 两条互补链可以重新结合，恢复原来的双螺旋结构，这一过程称为复性。复性后 DNA，其理化性质能得到恢复。利用 DNA 这一重要理化特性，将两个以上不同来源的多核苷酸链之间由于互补性而使它们在复性过程中形成异源杂合分子的过程称为杂交（hybridization）。杂交体中的分子不是来自同一个二聚体分子。由于温度比其他变性方法更容易控制，当双链的核酸在高

于其变性温度 (T_m 值) 时, 解螺旋成单链分子; 当温度降低低于 T_m 值时, 单链分子根据碱基的配对原则再度复性成双链分子。因此通常利用温度的变化使 DNA 在变性和复性的过程中进行核酸杂交。

核酸分子单链之间有互补的碱基顺序, 通过碱基对之间非共价键的形成即出现稳定的双链区, 这是核酸分子杂交的基础。杂交分子的形成并不要求两条单链的碱基顺序完全互补, 所以不同来源的核酸单链彼此之间只要有一定程度的互补序列就可以形成杂交双链, 分子杂交可在 DNA 与 DNA、RNA 与 RNA 或 RNA 与 DNA 的两条单链之间。利用分子杂交这一特性, 先将杂交链中的一条用某种可以检测的方式进行标记, 再与另一种核酸(待测样本)进行分子杂交, 然后对待测核酸序列进行定性或定量检测, 分析待测样本中是否存在该基因或该基因的表达有无变化。基因芯片通常采用反向杂交方法, 即将多个探针分子点在芯片上, 样本的核酸靶标进行标记后与芯片进行杂交。这样的优点是同时可以研究成千上万的靶标甚至全基因组作为靶序列。

2、聚合酶链式反应—限制性片段长度多态性 (PCR—RFLP) 分析技术: 原理为采用 PCR 扩增目的 DNA 片段, 然后将待检测的 DNA 片段用限制性内切酶酶切, 限制性内切酶识别并切割特异的序列, 然后将酶切后的产物进行电泳, 再由限制酶图谱分析此段序列的特异酶切位点, 借由片段的多样性来比对不同来源基因序列的差异性。这里 rtE218G 突变核苷酸包含于所述限制性内切酶的识别序列中。在本发明的一个实施例中, 从 GenBank 中选取 HBV 各基因型参考株序列, 设计诱变引物 B2 (下游 5'-TTG GTA ATA GAG GTA AAA AGG TAC-3'), 该引物与 rtE218G 的变异位点共同构成可被 *Ban* I 内切酶识别的酶切位点。应用 B1 (上游 5'-GAG TGG GCC TCA GTC CGT TTC TC-3'), 与 B2, 扩增 HBV DNA, 得到 160bp 扩增片段, 再用 *Ban* I 限制性内切酶消化, rtE218G 变异株被切成 140bp 和 20bp 两个片段, 而野生株不能被 *Ban* I 切开, 保持 160bp 的片段。

3、连接酶链反应(Ligase chain reaction, LCR), 也是一种 DNA 体外扩增和检测技术, 主要用于点突变的检测。LCR 的基本原理是在 DNA 连接酶的作用下, 通过连接与模板 DNA 互补的两个相邻寡核苷酸链, 快速进行 DNA 片段扩增。DNA 连接酶可将与模板 DNA 链互补的两条毗邻寡核苷酸片段连接起来。两条寡核苷酸链接头处存在碱基错配则阻止连接反应的发生。所以通过 LCR, 可明确区分寡聚

核苷酸是否与模板 DNA 完全互补,检测基因点突变。其程序为:模板 DNA、DNA 连接酶、寡核苷酸引物在相应的反应条件下,首先加热至一定温度下(94~95℃)使 DNA 变性,双链打开,然后降温退火(65℃左右),引物与之互补的模板 DNA 结合并留下一缺口,如果与靶序列杂交的相邻的寡核苷酸引物与靶序列完全互补,DNA 连接酶即可连接封闭这一缺口,则 LCR 反应的三步骤(变性-退火-连接)就能反复进行,每次连接反应的产物又可在下一轮反应中作模板,使更多的寡核苷酸被连接与扩增。若连接处的靶序列有点突变,引物不能与靶序列精确结合,缺口附近核苷酸的空间结构发生变化,连接反应不能进行,也就不能形成连接产物。

LCR 的引物是两对分别互补的引物,引物长度为 20~26 个,以保证引物与靶序列的特异性结合,LCR 识别点突变的特异性高于 PCR,其特异性首先取决于引物与模板的特异性结合,其次是耐热连接酶的特异性。LCR 连接反应温度接近寡核苷酸的解链温度(T_m),因而识别单核苷酸错配的特异性极高。

LCR 的扩增效率与 PCR 相当,用耐热连接酶做 LCR 只用两个温度循环,94℃min 变性和 65℃复性并连接,循环 30 次左右,其产物的检测也较方便灵敏。目前该方法主要用于点突变的研究与检测、微生物病原体的检测及定向诱变等,还可用于单碱基遗传病多态性及单碱基遗传病的产物诊断,微生物的种型鉴定,癌基因的点突变研究等。

根据连接酶链反应方法,针对 rtE218G 突变设计两对分别与 HBV 突变株 DNA 序列互补的相邻寡核苷酸链,每对中的其中一条寡核苷酸链与另一条相邻,且相邻端的末尾碱基与 rtE218G 突变位点的碱基互补。以待检 HBV DNA 为模板进行连接酶链反应,检测连接产物,判断是否发生 rtE218G 突变。

4、核苷酸测序法:采用 PCR 扩增目的 DNA 片段,待检测的 DNA 片段,直接通过核苷酸序列测定,来判断是否为突变株。PCR 产物也可先进行克隆,然后挑多个菌落进行测序分析。

5、序列特异性引物法:根据突变位点,设计合成序列特异性引物。采用 PCR 扩增目的 DNA 片段,由于野生或者突变的序列只会和相应的引物互补结合得以扩增,故通过检测特异扩增产物的有无判断是否为突变株。优选结合探针进行定量 PCR。在本发明的一个实施例中,采用特异性引物 F1:5'-GAG TGG GCC TCA GTC CGT TTC TC-3', F2: 5'-TTG GTA ATA GAG GTA AAA AGG TTT C-3', 荧光标

记探针: FAM-5'-TAG TGC CAT TTG TTC AGT GGT TCG TAG-3'-TAMRA, 进行定量 PCR 检测, 只有突变株才能检测得到特异性扩增。

6、聚合酶链反应-单链构象多态性分析 (Single Strand Conformation Polymorphism Analysis of Polymerase Chain Reaction Products, PCR-SSCP) 是近年来发展起来的一种基因分析方法。

PCR-SSCP 分析的基本程序为: 首先 PCR 扩增特定靶序列, 然后将扩增产物变性为单链, 进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。在不含变性剂的中性聚丙烯酰胺凝胶中电泳时, DNA 单链的迁移率除与 DNA 链的长短有关外, 更主要的是取决于 DNA 单链所形成的构象。在非变性条件下, DNA 单链可自身折叠形成具有一定空间结构的构象。这种构象由 DNA 单链碱基决定, 其稳定性靠分子内局部顺序的相互作用 (主要为氢键) 来维持。相同长度的 DNA 单链其顺序不同, 甚至单个碱基不同, 所形成的构象不同, 电泳迁移率也不同。PCR 产物变性后, 单链产物经中性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 靶 DNA 中含碱基置换, 或数个碱基插入或缺失等改变时, 因迁移率变化会出现泳动变位, 从而可将变异 DNA 与正常 DNA 区分开。由此可见, PCR-SSCP 分析技术是一种 DNA 单链凝胶电泳技术, 它根据形成不同构象的等长 DNA 单链在中性聚丙烯酰胺凝胶中的电泳迁移率变化来检测基因变异。该技术已被广泛用于癌基因和抗癌基因变异的检测、遗传病的致病基因分析以及基因诊断、基因制图等领域。

为了高灵敏特异性地显示 SSCP 分析结果, 现已发展多种 PCR-SSCP 技术, 各有其优势及适用领域。例如, 可以在 PCR 扩增中用同位素或荧光素等标记引物或核苷, 也可以在电泳后用银染或溴化乙锭染色以显示结果。这里将重点介绍最常用的放射性同位素 PCR-SSCP 法。在进行 PCR 扩增特定靶基因序列时, 利用 γ -³²P-ATP 标记引物或直接在 PCR 反应体系中加入 α -³²P-dCTP 进行 PCR 扩增, 使扩增产物带有同位素标记物, 然后将扩增产物变性为单链进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 放射自显影显示结果。利用引物标记或碱基掺入法使 PCR 扩增产物带有同位素标记物, 均可使产物信号增强几个数量级。二者相比较, 前者经济、扩增特异性强, 多用于大样本的检测和筛选; 后者操作简便, 适于一般实验室开展, 可用于小样本或大样本的检测和筛查。

本发明进一步提供检测 rtE218G 突变位点和鉴定相应 HBV 突变病毒株的检测

试剂，其中包括各种引物和/或探针。还可以进一步将所述检测试剂和必要的其它试剂组装成检测试剂盒以方便使用。例如，将上述引物与限制性内切酶等组成 PCR—RFLP 检测试剂盒，或者将位点特异引物与荧光探针组成荧光定量 PCR 检测试剂盒等等。

具体地说，所述检测试剂可选自：

- 1) 引物对，a、其特异性地扩增包括 rtE218G 突变位点的核苷酸序列；或 b、其扩增产物包括 rtE218G 突变位点并且该位点与两端或一端序列可以构成限制性内切酶的识别位点；
- 2) 序列特异性引物对，其中一条引物特异性地与包含 rtE218G 突变位点的核苷酸序列结合；
- 3) 特异性探针，其特异性地与包含 rtE218G 突变位点的核苷酸序列结合；
- 4) 用于连接酶链反应的寡核苷酸序列，根据连接酶链反应方法，针对 rtE218G 突变设计两对分别与 HBV 突变株 DNA 序列互补的相邻寡核苷酸链，每对中的其中一条寡核苷酸链与另一条相邻，且相邻端的末尾碱基与 rtE218G 突变位点的碱基互补。

当该上述试剂盒包含 1) 中所述的引物对时，其还包含所述限制性内切酶；当包含 2) 中所述的序列特异性引物时，其还包括与目的序列特异结合的探针。

检测 HBV rtE218G 突变的方法和鉴定相应 HBV 突变病毒株的方法可以仅用于实验室研究，或仅通过上述方法检测或鉴定出适用于耐药监测和新药开发的 HBV rtE218G 突变位点和相应的 HBV 突变病毒株。HBV rtE218G 突变也可以用于临床指导用药。本发明还提供临床指导用药的方法，包括检测 HBV rtE218G 突变，根据检测结果选择用药。当然，在检测 HBV rtE218G 突变时可以优选使用上述的试剂或试剂盒进行检测。本发明中 rtE218G 变异位点的发现，能够结合已知变异位点解释临床 ADV 耐药现象。通过检测该变异位点，可以用于临床指导用药，以及新药的开发和筛选。

附图说明

图 1 显示各质粒经内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切后，产生 1.2 倍 HBV 全长基因（约 3.8kb）和 PUC18 载体片段（约 2.8kb）；

图 2 为突变质粒测序图，以验证诱变部位的正确引入，其中诱变核苷酸位置由箭头指出，下划线处为编码相应诱变氨基酸的密码子；

图 3 为 Southern blotting 结果，显示不同浓度 ADV 对野生株和 rtE218G 突变株 HBV 复制中间体的抑制作用；

图 4 为根据 Southern blotting 的结果进行灰度值分析而得到的剂量效应曲线，显示 ADV 对野生株和 rtE218G 突变株不同的抑制作用，突变株 IC₅₀ 为野生株的 5.5 倍。

具体实施方式

以下实施例进一步说明本发明的内容，但不应理解为对本发明的限制。在不背离本发明精神和实质的情况下，对本发明方法、步骤或条件所作的修改或替换，均属于本发明的范围。

若未特别指明，实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规技术手段。

实施例 1

一、实验材料

1. 血清：

ADV 治疗无效的慢性乙型肝炎患者血清标本，存于-30℃备用。

2. 质粒和受体菌：

质粒 PUC-HBV 1.2WT 含 1.2 拷贝 HBV DNA（基因型 C，Genbank 引入号为 AY518556），由北京大学人民医院肝病研究所保存。A-T 克隆所用 pGEM-T Easy 载体试剂盒购自美国 Promega 公司，DH5α 感受态细胞购自鼎国生物技术公司。

3. 主要试剂：

蛋白酶 K、Poly(A)、dNTPs、糖原购自德国 Boehringer Mannheim（BM）公司，X-gal、IPTG 购自美国 Promega 公司，琼脂糖、二乙基焦碳酸酯（DEPC）购自 Fluka 公司，胰蛋白酶、酵母提取物购自 Oxid 公司，酚购自 Invitrogen 公司，DMEM 培养基、胎牛血清购自 GIBCO 公司，磷酸硝基苯酚 pNPP 购自 Sigma 公司，其它生化试剂为国产分析纯试剂。

DNA 凝胶回收纯化试剂盒（QIA quick Gel Extraction Kit）及质粒提取纯化试

试剂盒 (EndoFree™ Plasmid Mega Kit) 为德国 Qiagen 公司产品, 高效真核转染试剂 VigoFect 购自威格拉斯生物技术 (北京) 有限公司, HBsAg 和 HBeAg 的测定使用 ARCHITECT® 微粒子化学发光检测试剂盒 (Abbott 公司, 美国) HBV DNA 荧光定量 PCR 试剂盒购自深圳匹基生物工程有限公司。地高辛探针标记试剂盒、抗地高辛抗体和 CPD Star 试剂盒购自德国 Roche 公司。

4. 工具酶:

高保真 DNA 聚合酶购自北京全式金生物技术有限公司, T4 DNA 连接酶购自美国 Promega 公司, 各种限制性内切酶购自美国 NEB 公司。

5. 肝癌细胞株:

人肝癌细胞系 HepG2 购自中国科学院细胞生物研究所, 冻存于液氮中, 复苏后培养于 37℃、5%CO₂ 孵箱内, 用含 10%胎牛血清的高糖 DMEM 培养基培养。

6. 阿德福韦酯:

阿德福韦酯 (adefovir dipivoxil), 冻干粉剂, 4℃ 保存, 用 PBS 溶解后, -20℃ 保存。

7. 主要仪器和耗材:

高速低温离心机 CF15R 为 HITACHI 公司产品, 台式高速离心机 Micromax 为德国 IEC 公司产品, PTC-100 Peltier Thermal Cycler PCR 仪为美国 MJ Research 公司产品, 凝胶自动成像系统 GEL Doc2000 为 Bio-Rad 公司产品, 恒温孵箱为美国 Revco 公司产品, 恒温气浴摇床为哈尔滨东明医疗仪器厂产品, 二氧化碳培养箱 3111 为 Forma Scientific 公司产品, 超净工作台为北京昌平长城空气净化工程公司产品, 高压灭菌蒸锅 MLS-3000 为 SANYO 公司产品, 酶标仪 Reader 230s 为 DRGA non Teknika 公司产品, 荧光定量 PCR 仪 LightCycler II 为 Roche 公司产品。

8. 引物设计和测序:

检测方法中应用的引物根据 GenBank 中各 HBV 基因型序列设计, 在相应位置引入变异位点; 其余的引物根据 PUC-HBV1.2WT 中 HBV 序列设计。所有引物均由北京三博远志生物技术公司合成。测序工作由北京诺赛基因组研究中心有限公司完成, 测序试剂为 ABI BigDye3.1, 测序仪器为 ABI 3730XL。

二、实验步骤

1. ADV 耐药的慢型乙型肝炎患者血清样本进行聚合酶区扩增, 其 PCR 产物进

行克隆测序。

采用蛋白酶 K- 酚氯仿法提取血清样本中的病毒 DNA，溶于 30 μ l TE 中，- 80 $^{\circ}$ C 保存备用。

每个 PCR 反应体系 30 μ l，包含 10 $\times$ PCR buffer 3 μ l，10mmol/L dNTP 1 μ l，上游引物和下游引物各 50ng，高保真 Taq 酶 1u，最后根据模板量，加入 DEPC 水，使总反应体系达到 30 μ l。

首先各取从患者血清中已提取的 HBV DNA 3 μ l 为模板，以 BSE(上游: 5'-CTC GTG GTG GAC TTC TCT CA-3') 及 P0 (下游: 5'-GGG TTG CGT CAG CAA ACA CTT G-3') 为引物，扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 300 秒，94 $^{\circ}$ C 30 秒，55 $^{\circ}$ C 30 秒，72 $^{\circ}$ C 45 秒，30 个循环。取 3 μ l 第一次 PCR 产物，再以 Hinfed (上游: 5'-GAG TGG GCC TCA GTC CGT TTC TC-3') 和 SSG(下游: 5'-ACA TAT CCC ATG AAG TTA AG-3') 为引物进行二次 PCR 扩增，94 $^{\circ}$ C 300 秒，94 $^{\circ}$ C 30 秒，55 $^{\circ}$ C 30 秒，72 $^{\circ}$ C 45 秒，35 个循环。得到的 244bp 大小的 PCR 产物。PCR 产物无需经过纯化，直接将 PCR 产物与 pGEM-T Easy Vector 连接。连接体系含：

2 $\times$ 快速连接缓冲液	5.0 μ l
pGEM-T Easy 载体 (50ng/ μ l)	0.5 μ l
T4 DNA 连接酶 (3 Weiss unit/ μ l)	0.5 μ l
PCR 产物	2 ~ 4 μ l
dH ₂ O 补足至反应总体积为	10.0 μ l

4 $^{\circ}$ C 连接过夜。取 5 μ l 连接产物，加入 100 μ l DH5 α 感受态细菌，轻轻混匀冰上静置 20 分钟。42 $^{\circ}$ C 循环水浴热休克 60 秒，置于冰上 2 分钟。加入 1ml 37 $^{\circ}$ C 预温的 LB 培养液，37 $^{\circ}$ C 振荡 (250rpm) 培养 1 小时。

将合适体积的转化产物涂于含有 100mg/ml 氨苄青霉素的 LB 培养板(含 1mol/l IPTG 4 μ l，20mg/ml X-gal 40 μ l) 上，37 $^{\circ}$ C 倒置培养过夜。

挑取 24 个白色菌落，接种于 2ml 含 100mg/ml 氨苄青霉素的 LB 培养液中，37 $^{\circ}$ C 振荡 (250rpm) 培养过夜。转移培养过夜产物 1.5ml 至离心管中，5,000rpm 离心 30 秒，弃上清，细菌悬浮于 100 μ l 溶液 I (50mmol/L 葡萄糖，50mmol/L Tris-HCl(pH8.0)，10mmol/L EDTA) 中，室温静置 5 分钟。加入 200 μ l 溶液 II (0.2mol/L NaOH，1%(W/V)SDS)，轻柔颠倒混匀 5-6 次，冰上静置 5 分钟。加入 150 μ l 溶液 III (3mol/L KAc，2mol/L HAc)，轻轻震荡混匀，冰上静置 5 分

钟, 12,000rpm 离心 5 分钟。转移上清至新离心管, 加入 900 μ l 无水乙醇, 混匀, 室温静置溶液 5 分钟, 12,000rpm 离心 5 分钟。弃上清, 室温静置干燥沉淀, 加入 100 μ l 溶液 IV (20 μ g/ml RNase TE (pH8.0)) 悬浮沉淀, 即为质粒溶液。*EcoR*I 酶切鉴定:

反应体系含:

10 $\times$ 酶缓冲液	1.0 μ l
<i>EcoR</i> I (10unit/ μ l)	0.2 μ l
质粒	0.2 μ g
dH ₂ O 补足至反应总体积为	10 μ l

37 $^{\circ}$ C 酶切 1 小时。1.0%琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 紫外灯下观察结果。根据插入片段的长度判断是否有 HBV 基因插入。

挑取阳性菌落, 增菌后提取质粒进行上述限制性酶切分析鉴定后测序。

2. 采用 PCR 介导的定点诱变技术构建诱变质粒

质粒 PUC-HBV 1.2WT 为含 1.2 拷贝 HBV DNA (基因型 C, Genbank 引入号为 AY518556), 第一轮 PCR 先以 PUC-HBV1.2WT 2ng 为模板, 分别用两对引物 P1A-2(上游: 5'-GAACATCGCATCAGGACTCCTAGGACCCCTG-3') 和 E218-3(下游: 5'-GGGTTTAAATGTATACCCAAAGACAAAAGAAAATTGGTAACAGCG GCATAAAGGGACCCAAG-3'), E218-P1(上游: 5'-CAACATCTTGGGTCCCTTT ATGC-3') 和 P2A(下游: 5'-GGCATTAAAGCAGGATATCCAC-3') 进行 PCR 扩增, 扩增体系同上所述, 扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 300 秒, 94 $^{\circ}$ C 45 秒, 55 $^{\circ}$ C 45 秒, 72 $^{\circ}$ C 60 秒, 35 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 分钟。分别获得 680bp 大小的片段 A 和 287bp 大小的片段 B。片段 A 和 B 分别通过凝胶回收纯化试剂盒(德国 Qiagen 公司)纯化回收。等比混合纯化后片段 A 和 B 并且经过 1:100 倍稀释后, 取 3 μ l 作为第二轮融合 PCR 反应模板, 应用引物 P1A-2 和 P2A 扩增, 反应体系同上, 扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 300 秒, 94 $^{\circ}$ C 60 秒, 55 $^{\circ}$ C 60 秒, 72 $^{\circ}$ C 60 秒, 35 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 分钟, 获得 899bp 的片段 C, 经过 A-T 克隆(同上所述), *EcoR*I 限制性酶切和序列测定鉴定诱变成功的阳性克隆。以限制性内切酶 *EcoR*V 和 *Avr* II 双酶切此阳性克隆和质粒 pUC-HBV1.2WT, 定向连接和克隆后, 获得 rtE218G 诱变质粒 PUC-HBV1.2-E218G (SEQ ID NO.20)。含有该诱变质粒的菌种已于 2009 年 05 月

26 日在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心（地址：北京市朝阳区大屯路甲 3 号，中国科学院微生物研究所，邮编 100101）保藏，分类命名为大肠埃希氏菌（*Escherichia coli*）PUC-HBV1.2-E218G，保藏号为 CGMCC No.3079。

3. 药物敏感试验

人肝癌细胞株 HepG2 复苏后在 37℃、5% CO₂ 孵箱条件下，含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中呈单层贴壁细胞生长，每隔 3~5 天以 1:3 传代 1 次。转染前 24 小时，接种适量细胞（6 孔板中每个孔约 2×10^5 ）。至转染时细胞密度以 40~60% 为宜（80~90% 亦可）。转染前 1 小时，更换新鲜的完全培养液（每孔 2ml），置 37℃，5% CO₂ 培养。以每孔为例，取 2μg DNA，加入注射用生理盐水中至总体积为 100 μl，轻轻混匀，室温放置。取 VigoFect 2μl，加入注射用生理盐水中至总体积为 100 μl，轻轻混匀，室温放置 5 分钟。将稀释的 VigoFect 逐滴加入稀释的 DNA 溶液中，轻轻混匀，所得的转染工作液在室温放置 15 分钟。将转染工作液轻轻混匀，逐滴加入 2 ml 培养液中，轻轻混匀培养液，置 37℃，5% CO₂ 培养。转染后第 2 天，更换培养基，并分别加入终浓度为 0、0.01、0.1、1、5、10 和 20μM 的 ADV，以后隔天更换培养基同时加抗 HBV 药/ADV，转染后第 8 天收获细胞。

5. 细胞培养上清中 HBV DNA 定量检测

细胞培养上清经 100μg/ml DNase I 37℃ 处理 1 小时以消化残余的转染质粒。病毒 DNA 检测在 Light Cycler II 全自动荧光定量 PCR 仪（Roche 公司，美国）上进行，使用 HBVDNA 定量 PCR 检测试剂盒，样品处理和扩增按照产品说明书进行。

HBsAg 和 HBeAg 的测定使用 ARCHITECT® 微粒子化学发光检测试剂盒（Abbott 公司，美国）进行，操作步骤计算方法按照说明书进行，HBsAg 表示为 IU/ml，HBeAg 表示为 S/CO 值。

6. Southern blotting 检测 HBV 胞内复制中间体。

6.1 全基因组 HBV DNA 探针制备

PCR 法地高辛标记全基因组 HBV DNA 探针的制备按照试剂生产者提供的说明书进行。反应引物：上游 D1，5'-CCGGAAAGCTTGAGCTCTTCTTTTTCACCTCTGCCTAATCA-3'；下游 D2，5'-CCGGAAAGCTTGAGCTCTTCAAAAAGTTGCATGGTGCTGG-3'。反应条件为：94℃ 预变性 2 分钟，94℃ 30 秒，55℃ 30

秒, 72℃ 2 分钟, 共 35 个循环, 第 11 个循环开始每个循环延伸时间增加 20 秒, 最后 72℃ 延伸 7 分钟。取 PCR 产物 1μl, 加入 1μl 6 × 上样缓冲液, 4μl H₂O, 经过 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 0.5μg/ml EB 染色, 紫外灯下观察结果。注意预计产物长度由于掺入地高辛标记 dUTP 片段电泳速度较慢, 电泳结果显示的片段大小略大于 3.2kb。用 Qiagen 凝胶回收纯化试剂盒回收纯化 PCR 产物并和标准含量探针比较定量。

6.2 细胞质中 HBV 复制中间体的提取

收获的细胞, 以 PBS 洗两遍, 然后每孔中加入 300μl 细胞裂解液 (50mmol/L Tris-HCl, pH7.4, 1mmol/l EDTA, 1% NP-40), 充分溶解破裂细胞。溶解的细胞转移至 1.5ml EP 管, 震荡后置于冰上 15 分钟, 再次震荡后 14,000rpm, 离心 1 分钟去除细胞核。收集上清至新离心管中, 加入终浓度 10mol/l MgCl₂、100μg/ml DNase I 37℃ 1 小时消化游离 HBV DNA。加入终浓度为 25mmol/L 的 EDTA 终止 DNase I 消化反应。加入终浓度为 0.5mg/ml 蛋白酶 K 及 1% SDS, 60℃ 裂解 1 小时 酚: 氯仿: 异戊醇 (25:24:1, V/V) 抽提两遍。取上清加入 2.5 体积无水乙醇, 0.25 体积 10mol/L 醋酸铵, 1μl (20mg/ml) 糖原, -20℃ 沉淀过夜。14000rpm, 4℃ 离心 15 分钟, 吸弃上清。用 4℃ 预冷 70% 乙醇洗 2 遍, 14000rpm 4℃ 离心 5 分钟。获得的 HBV DNA 溶于 10μl 含 20μg/ml RNase A 的 TE 中。

6.3 细胞质中 HBV 复制中间体的 Southern blot 杂交检测

将提取的细胞质中的 HBV 复制中间体进行 1.0% 琼脂糖电泳。电泳结束后, 于 5 倍凝胶体积变性液中 (0.5mol/L NaOH, 1.5mol/L NaCl) 室温下于脱色摇床上轻摇动 45min 变性, 将胶用蒸馏水简单漂洗后, 换到约 5 × 体积中和液中 (1mol/L Tris-HCl, pH7.4, 1.5mol/L NaCl) 中和两遍, 每次中和 30min。准备与胶大小相同的一张尼龙膜、6 张 3MM 滤纸, 将尼龙膜和 3MM 滤纸浸入到转移缓冲液 0.5×TBE 中 5min, 准备电转移装置, 根据 DNA 泳动方向, 用平镊从负极至正极依次铺海绵、3 层 3MM 滤纸、琼脂糖凝胶、尼龙膜、3 层 3MM 滤纸、海绵, 对齐后室温下 40 伏特恒压电泳转膜 (<400mA) 2-4 小时。

停止电泳, 以铅笔标记凝胶加样孔的位置, 在 5×SSC 中洗一下以去除琼脂碎片。取出尼龙膜, 吸干液体后平放于纸巾上, 室温自然干燥 30min。将尼龙膜携带 DNA 的一面暴露于紫外线, 100mJ/cm² 进行紫外交联固定。将固定后的尼龙膜

膜漂浮于 5×SSC 液面，由下至上完全浸润 2 分钟。将浸润的膜放入杂交瓶中，按每平方厘米滤膜加入 100 μ l (10ml/100cm²) 预热至 42℃ 的预杂交液 DIG Easy Hyb。在 42℃ 杂交箱中预杂交 30min。

倒尽预杂交液，将 42℃ 预热好的杂交液 Dig High Hyb (3.5ml/100cm²) 加入杂交瓶中，加入经过 100℃ 5 分钟变性的终浓度 25ng/ml 的地高辛标记 HBV 全基因组探针。杂交反应在 42℃ 杂交箱中杂交过夜。

取出杂交膜置于 15cm 培养皿中，加入约 200ml 2×SSC 和 0.1% SDS 溶液，室温下于脱色摇床上轻摇 5min×2。

倒尽洗液，加入预热至 65℃ 的 0.5×SSC 和 0.1% SDS 溶液 200ml，于预热至 65℃ 的杂交箱中 65℃ 轻摇 20min×2。以 2×SSC 简单漂洗一次。

取出杂交膜，在 1×封闭液中 (含 1% 封闭剂的马来酸 buffer: 0.1mol/L 马来酸, 0.15mol/L NaCl, pH7.5) 室温封闭 30min。

去除封闭液，加入以 1×封闭液 1:5000 稀释的抗-地高辛抗体，室温孵育 30min。用 200ml 马来酸洗液 (含 0.3% Tween-20 的 1×马来酸缓冲液) 洗膜，室温 15min 洗膜 2 遍。在检测缓冲液 (0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl, pH9.5) 中漂洗 5min。以检测缓冲液 1:200 稀释 CSPD (25 mmol/L, 11.6 mg/ml)，用纸巾吸干尼龙膜上的液体，放于保鲜膜上，将稀释好的 CSPD 以 1ml/100cm² 体积加至尼龙膜上并涂匀。用保鲜膜夹好尼龙膜，室温作用 5min 后，用滤纸吸干多余 CSPD，37℃ 继续孵育 10min。在暗室中将 X 光片和用保鲜膜裹好的尼龙膜压于暗盒中，曝光 15-20min。冲洗 X 光片，用图像分析软件 Quantity One 对转染细胞中 HBV 复制中间体进行相对灰度值的测定。

7. 培养上清 SEAP 的测定

共转染内参质粒 pSEAP2，测定细胞培养上清中 SEAP 的活性，可检测转染效率，除外实验偏差如转染质粒和转染细胞数量的差别而导致的病毒表达抗原及病毒复制转录的区别，另外还可鉴定是否由于 ADV 的细胞毒性作用所致的转染细胞数量减少导致的病毒测定指标下降。针对同样处理的共转染 SEAP 质粒的 HepG2 细胞，检测细胞培养上清中的 SEAP，发现 SEAP 的分泌值相近，数值之间相比较差值 <5%-10%，提示实验偏差可以忽略不计，各组间的实验结果可以直接进行比较。具体检测过程如下：

100 μ l 细胞培养上清经 65℃, 30 分钟热灭活内源性碱性磷酸酶, 14,000 $\times$ g, 2 分钟离心去除细胞碎片。(上清液可于-20℃保存)。取 50 μ l 已处理的细胞培养上清转移至 96 孔板, 平衡至 37℃, 设置复孔, 然后加入 45 μ l 已平衡至 37℃的 2 $\times$ SEAP 缓冲液 (20mmol/l 高精氨酸, 1mmol/L MgCl₂, 21%乙醇胺, pH 9.8) 和 5 μ l 底物溶液 (120 mmol/L 磷酸硝基苯酚, 以 2 $\times$ SEAP 试剂缓冲液配制,)。检测板置 37℃显色 15 分钟后, 测 A405 吸光度值。

三、实验结果

1. 发生临床 ADV 耐药后患者血清变异位点检测结果

23 例患者中, 有 5 例除检出 rtE218G 外, 还检出 rtA181V/T 和 / 或 rtN236T 变异位点, 其余 18 例只检出 rtE218G 变异位点。

2. rtE218G 诱变 HBV 表达质粒的构建和鉴定

利用 PCR 定点诱变技术, 以野生型 HBV 复制质粒 PUC-HBV1.2WT 为模板, 构建得到 rtE218G 变异株表达质粒, 命名为 PUC-HBV1.2-E218G。对诱变质粒进行 *EcoRI* 和 *Hind III* 双酶切鉴定, 结果见图 1; 对变异位点进行测序验证, 测序结果见图 2, 与野生型相比, 聚合酶区发生了 rtE218G 突变, 密码子由 GAG 变成了 GGG。

3. 野生型和阿德福韦耐药变异 HBV 表达质粒转染后在 HepG2 细胞中的抗原表达、上清中病毒颗粒分泌水平

野生型和上述诱变质粒瞬时转染 HepG2 细胞 96 小时后, 收集细胞及培养上清, 以质粒 pSEAP2 表达的外源性碱性磷酸酶水平进行转染效率校正, 检测到野生型和诱变型 HBV 表达质粒转染组上清中存在较高水平的 HBeAg、HBsAg, 病毒 DNA 拷贝数达到 $(4.52 \pm 0.83) \times 10^5$ (copies/ml) 和 $(4.25 \pm 0.14) \times 10^5$ (copies/ml), 提示诱变质粒转染 HepG2 细胞后能够建立 HBV 的复制状态并表达病毒抗原和分泌病毒颗粒。

4. 野生型、rtE218G 变异株病毒复制能力的比较

野生型和诱变质粒瞬时转染 HepG2 细胞 96 小时后, 测定上清中 HBV DNA 和细胞浆内 HBV 复制中间体水平。结果表明变异株的病毒复制能力低于野生株, 为野生株的 87%。

5. 野生型、rtE218G 变异株对阿德福韦的敏感性

野生型和上述诱变质粒瞬时转染 HepG2 细胞后分别加入终浓度为 0、0.01、0.1、1、5、10 和 20 μ M 的阿德福韦进行处理 7 天后,检测细胞浆内 HBV 复制中间体, Southern blotting 结果如图 3 所示,不同浓度阿德福韦对野生株和变异株复制中间体的抑制作用。进行相对灰度值分析后,根据不同浓度药物对复制中间体水平的影响进行定量分析,应用 SPSS10.0 统计软件作出各剂量效应曲线,结果如图 4 所示,并计算出阿德福韦对野生株和变异株的半数有效抑制浓度 (IC₅₀ 值),分别为 1.7 μ M 和 9.3 μ M。rtE218G 变异株的 IC₅₀ 是野生株的 5.5 倍。

实施例 2 突变位点的检测

本例中提供三种不同的检测方法,对 rtE218G 突变位点进行检测。

1、聚合酶链式反应—限制性片段长度多态性 (PCR—RFLP) 分析法

根据 GenBank 中 HBV 各基因型参考株序列,设计诱变引物 B2 (下游 5'-TTG GTA ATA GAG GTA AAA AGG TAC-3'),该引物与 rtE218G 的变异位点共同构成可被 *Ban* I 内切酶识别的酶切位点。另设计引物上游引物 B1 (上游 5'-GAG TGG GCC TCA GTC CGT TTC TC-3'),然后采用 PCR 扩增目的 DNA 片段,扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 60 秒, 94 $^{\circ}$ C 30 秒, 60 $^{\circ}$ C 45 秒, 35 个循环,扩增片段长度为 160bp。采用 *Ban* I 限制性内切酶分析检测。酶切体系: 10 $\times$ 酶缓冲液 1 μ l, 酶 5U, PCR 产物 2-4 μ l, 加 DEPC 水至总体积 10 μ l。酶切条件: 37 $^{\circ}$ C, 2~4 小时。结果突变株被切成 140bp 和 20bp 两个片段,野生株不被切开,保持 160bp 的片段。

2、核苷酸序列测定

采用套式 PCR 扩增目的 DNA 片段。外侧引物为,上游 SA: 5'-TCG TGT TACAGGCGGGGT TT-3', 下游 P0: 5'-GGG TTG CGT CAG CAAACA CTT G-3'; 内侧引物为,上游 BSE: 5'-CTC GTG GTG GAC TTC TCT CA-3', 下游 1162: 5'-TTG CCG GGC AAC GGG GTAAAG-3'。扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 300 秒, 94 $^{\circ}$ C 30 秒, 55 $^{\circ}$ C 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 45 秒, 35 个循环。取 3 μ l 1: 100 稀释的第一次 PCR 产物,作为第二次的模板。得到 910bp 大小的 PCR 产物,可直接通过核苷酸序列测定;也可先进行 A-T 克隆,然后挑多个菌落进行测序分析。最终根据测序结果,直接判断是否为突变株。

3、序列特异性引物法: 根据突变位点,设计合成序列特异性引物 F1:5'-GAG

TGG GCC TCA GTC CGT TTC TC-3', F2: 5'-TTG GTA ATA GAG GTA AAA AGG TTT C-3', 荧光标记探针: FAM-5'-TAG TGC CAT TTG TTC AGT GGT TCG TAG-TAMRA-3'。采用荧光定量 PCR 扩增目的 DNA 片段, 扩增条件为 42℃ 120 秒, 94℃ 120 秒, 然后 94℃ 10 秒, 65℃ 20 秒, 40 个循环。结果表明只有突变株才能得到特异性扩增, 这是由于只有已发生 rtE218G 突变的序列能够和的引物互补结合。

工业实用性

本发明公开了 HBV rtE218G 突变位点, 发现其与阿德福韦耐药有关, 本发明进一步提供了检测 rtE218G 突变位点的方法和相关的试剂。通过检测该变异位点, 来指导临床用药, 以及新药的筛选。

DO NOT DELETE THIS PAGE

中国微生物菌种保藏管理委员会
普通微生物中心

China General Microbiological Culture Collection Center(CGMCC)

地址：北京市朝阳区大屯路，中国科学院微生物研究所，邮政编码：100101，<http://www.cgmcc.net>

电话：010-64807355

传真：010-64807288

电子邮件：cgmcc@sun.im.ac.cn

受理通知书（收据）

存活性报告书

用于专利程序的生物材料保存

发出日期 2009 年 05 月 26 日

(请求保藏人或代理人的姓名、地址)

魏来
北京大学人民医院
北京市西城区西直门南大街11号

本保藏中心登记入册编号

CGMCC No. 3079

你（们）提供的请求保藏并注明以下鉴定

参据的生物材料（株）：PUC-HBV1.2-E218G

上述请求保藏的生物材料（株）附有

☐ 科学描述☒ 建议的分类命名：大肠埃希氏菌*Escherichia**coli*

申请专利的发明名称

申请号 NO.

申请日期

年

月

日

该微生物（株）已于 2009 年 05 月 26 日由本保藏中心收到，并登记入册。

根据你（们）的请求，由该日起保存三十年，在期满前收到提供生物材料样品的请求后再延续保存五年。

该生物材料（株）的存活性经本保藏中心于 2009 年 05 月 26 日检测，结果是

(1) 存活 ☒(2) 失活 ☐

中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心负责人签字和日期

姓名



2009

年

05

月

26

日

权 利 要 求 书

1、一种 HBV 突变株，其特征在于，该病毒株的聚合酶基因 218 位的氨基酸密码子由 GAG 突变为 GGG，即发生了 rtE218G 突变。

2、一种鉴定权利要求 1 所述 HBV 突变株的方法，其步骤包括：

1) 采用 PCR 扩增含有 rtE218G 突变位点的目的 DNA 片段；

2) 扩增产物用限制性内切酶进行酶切，所述限制性内切酶的识别序列包含所述 rtE218G 突变位点；

3) 步骤 2) 中的酶切产物进行琼脂糖电泳，根据不同的切割条带来判断是否发生了 rtE218G 突变。

3、如权利要求 2 所述的方法，其特征在于步骤 1) 中扩增目的 DNA 片段的引物对为 B1 和 B2，其核苷酸序列分别如 SEQ ID NO.2 和 SEQ ID NO.1 所示。

4、如权利要求 2 所述的方法，其特征在于步骤 2) 中所述的限制性内切酶为 *Ban* I 内切酶。

5、一种鉴定权利要求 1 所述 HBV 突变株的方法，其步骤包括：

1) 采用 PCR 扩增包含 rtE218G 突变位点的 DNA 片段；

2) 对步骤 1) 中扩增的 DNA 片段进行核苷酸序列测定；

3) 根据测序结果判断是否发生了 rtE218G 突变。

6、如权利要求 5 所述的方法，其特征在于步骤 1) 中采用的 PCR 为套式 PCR。

7、如权利要求 6 所述的方法，其特征在于套式 PCR 所使用的外侧引物对为 SA 和 P0，其核苷酸序列分别如 SEQ ID NO.18 和 SEQ ID NO.7 所示。

8、如权利要求 6 所述的方法，其特征在于套式 PCR 所使用的内侧引物对为 BSE 和 1164，其核苷酸序列分别如 SEQ ID NO.6 和 SEQ ID NO.19 所示。

9、一种鉴定权利要求 1 所述 HBV 突变株的方法，其步骤包括：

1) 根据突变位点，设计合成序列特异性引物；

2) PCR 扩增目的 DNA 片段，通过检测特异扩增产物的有无，来判断是否发生了 rtE218G 突变。

10、如权利要求 9 所述的方法，其特征在于步骤 2) 中使用的 PCR 为定量 PCR。

11、如权利要求 9 所述的方法，其特征在于 PCR 扩增所使用的序列特异性引

物为 F1，其核苷酸序列如 SEQ ID NO.3 所示。

12、如权利要求 11 所述的方法，其特征在于与 F1 配对使用的另一条引物为 F2，其核苷酸序列如 SEQ ID NO.4 所示。

13、如权利要求 10 所述的方法，其特征在于荧光定量 PCR 使用核苷酸序列如 SEQ ID NO.5 所示的荧光标记探针。

14、一种鉴定权利要求 1 所述 HBV 突变株的方法，其特征在于用针对 rtE218G 突变位点的探针与待检 HBV DNA 片段，通过检测杂交结果，来判断是否发生了 rtE218G 突变。

15、如权利要求 14 所述的方法，其特征在于，所述探针固定在杂交膜上，通过 PCR 法获得带有标记的包含待检位点的 HBV DNA 片段，将所述 DNA 片段与探针杂交，洗掉未杂交的 DNA 片段，检测杂交结果，来判断是否发生了 rtE218G 突变。

16、如权利要求 15 所述的方法，其特征在于所述标记为生物素标记，杂交后加入标记有碱性磷酸酶的链霉亲和素，使其与杂交产物上标记的生物素结合，最后加入 BCIP/NBT 显色，进而根据杂交结果，来判断是否发生了 rtE218G 突变。

17、一种鉴定权利要求 1 所述 HBV 突变株的方法，其特征在于根据连接酶链反应方法，针对 rtE218G 突变设计两条与 HBV 突变株 DNA 互补的两个相邻寡核苷酸链，其中一条寡核苷酸链与另一条相邻的一端与 rtE218G 突变位点的碱基互补，以待检 HBV DNA 为模板进行连接酶链反应，检测连接产物，判断是否发生 rtE218G 突变。

18、一种检测试剂，其特征在于，该试剂含有检测 HBV 聚合酶基因 rtE218G 突变位点的引物和/或探针。

19、如权利要求 18 所述的检测试剂，其选自：

1) 引物对，a、其特异性地扩增包括 rtE218G 突变位点的核苷酸序列；或 b、其扩增产物包括 rtE218G 突变位点并且该位点与两端或一端序列可以构成限制性内切酶的识别位点；

2) 序列特异性引物对，其中一条引物特异性与包含 rtE218G 突变的核苷酸序列结合；

3) 特异性探针，其特异性与包含 rtE218G 突变的核苷酸序列结合

4) 用于连接酶链反应的寡核苷酸序列, 针对 rtE218G 突变设计两对分别与 HBV 突变株 DNA 序列互补的相邻寡核苷酸链, 每对中的其中一条寡核苷酸链与另一条相邻, 且相邻端的末尾碱基与 rtE218G 突变位点的碱基互补。

20、如权利要求 19 所述的检测试剂, 其中 1) 的引物对 b 为 B1 和 B2, 其核苷酸序列分别如 SEQ ID NO.1 和 SEQ ID NO.2 所示。

21、如权利要求 19 所述的检测试剂, 其中 2) 的序列特异性引物对为 F1 和 F2, 其核苷酸序列分别如 SEQ ID NO.3 和 SEQ ID NO.4 所示。

22、如权利要求 19 所述的检测试剂, 其中 3) 的特异性探针的核苷酸序列如 SEQ ID NO.5 所示。

23、如权利要求 19 所述的检测试剂, 其中包含 1) 引物对 a 的检测试剂, 还包括引物对 a 的内侧引物或外侧引物, 组成套式 PCR 的内侧引物和外侧引物。

24、如权利要求 19 或 23 所述的检测试剂, 其特征在于所述引物对 a 为 SA 和 P0, 其核苷酸序列分别如 SEQ ID NO.18 和 SEQ ID NO.7 所示。

25、如权利要求 24 所述的检测试剂, 其特征在于其还包括内侧引物对为 BSE 和 1164, 其核苷酸序列分别如 SEQ ID NO.6 和 SEQ ID NO.19 所示。

26、含有权利要求 18 - 25 任一项所述试剂的检测试剂盒。

27、如权利要求 26 所述的试剂盒, 其特征在于, 当该试剂盒包含权利要求 15 中 1) 所述的引物对 b 时, 其还包含所述限制性内切酶; 当该试剂盒包含权利要求 15 中 2) 所述的序列特异性引物对时, 其还包括与目的序列特异结合的荧光探针。

28、HBV rtE218G 突变在指导临床用药中的应用。

29、核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 和 SEQ ID NO.2 所示的引物对 B1 和 B2 在制备通过检测 HBV rtE218G 突变而指导临床用药的试剂盒中的用途。

30、核苷酸序列如 SEQ ID NO.18 和 SEQ ID NO.7 所示的引物对 SA 和 P0 在制备通过检测 HBV rtE218G 突变而指导临床用药的试剂盒中的用途。

31、核苷酸序列如 SEQ ID NO.6 和 SEQ ID NO.19 所示的引物对 BSE 和 1164 在制备通过检测 HBV rtE218G 突变而指导临床用药的试剂盒中的用途。

32、核苷酸序列如 SEQ ID NO.3 和 SEQ ID NO.4 所示的引物对 F1 和 F2 在制备通过检测 HBV rtE218G 突变而指导临床用药的试剂盒中的用途。

33、核苷酸序列如 SEQ ID NO.5 所示的荧光探针在制备通过检测 HBV

rtE218G 突变而指导临床用药的试剂盒中的用途。

34、一种药物筛选方法，其特征在于，以权利要求 1 所述突变株为对象，在体外或体内筛选对所述突变株复制具有抑制作用的药物。

35、含有权利要求 1 所述 HBV 突变株或包含有 rtE218G 的 HBV DNA 的载体。

36、含有权利要求 35 所述载体的宿主细胞。

37、如权利要求 36 所述的宿主细胞，其为大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) PUC-HBV1.2-E218G，保藏号为 CGMCC No.3079。

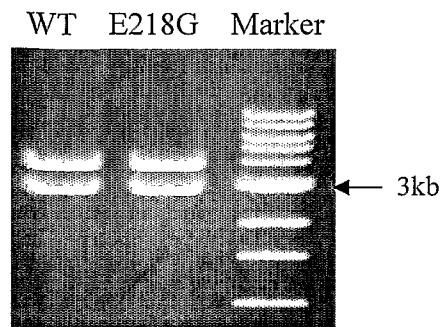


图 1

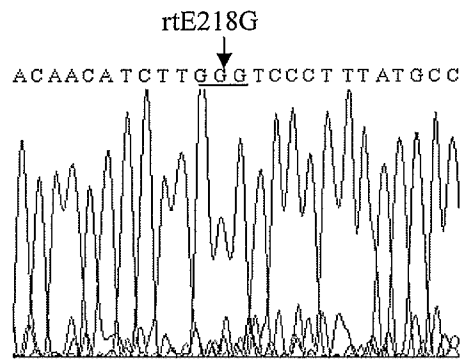


图 2

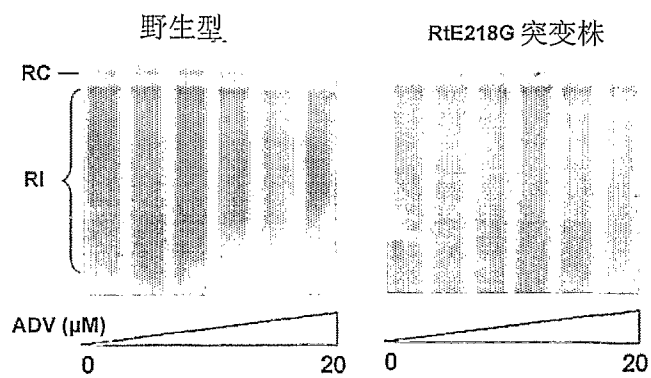


图 3

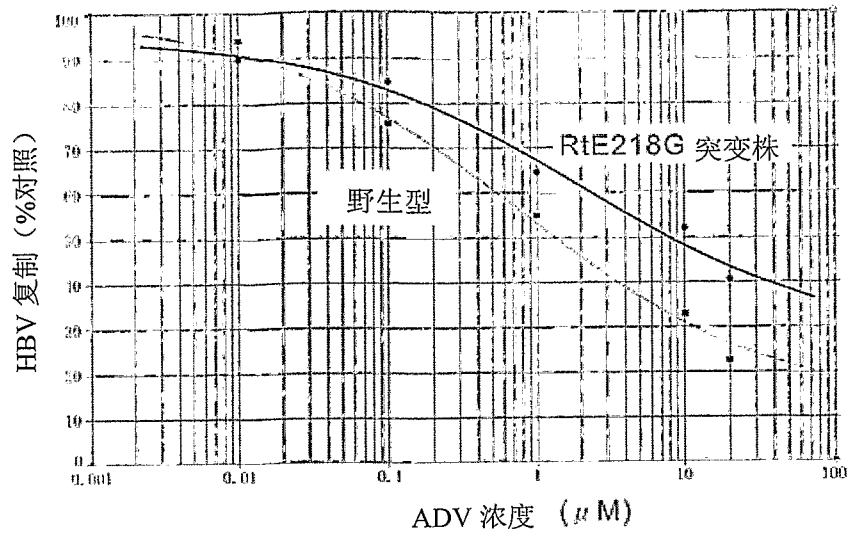


图 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2009/001165

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See the extra sheet

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: C12N, C12Q, C12R

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)

database: EPODOC, WPI, CNPAT, ISI WEB OF KNOWLEDGE (BIOSIS, EMBASE), CNKI, GENBANK+DDBJ+EMBL

search terms: hepatitis B virus, HBV, adefovir dipivoxil, ADV, polymerase, variant, mutation, reverse transcriptase, rtE218G, E218G,

Sequence search on SEQ ID NO: 1-7, 18-19

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	L.J.Liu et al, "A NOVEL HEPATITIS B VIRUS MUTATION WITH RESISTANCE TO ADEFOVIR DIPIVOXIL IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS B", Online, 25 April 2009 (25.04.2009), see methods and results	1,5,35-37
Y		2-4,6-34
Y	CN101092651A(YANENG BIOTECHNOLOGY SHENZHEN CO LT), 26 Dec.2007(26.12.2007), see claims 1 and 5, example 1	2-4,6-34

☒ 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 26 Jan.2010(26.01.1010)	Date of mailing of the international search report 11 Feb. 2010 (11.02.2010)
Name and mailing address of the ISA/CN The State Intellectual Property Office, the P.R.China 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088 Facsimile No. 86-10-62019451	Authorized officer WANGHuimei Telephone No. (86-10)62411090

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2009/001165

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See the extra sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2009/001165

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN101248173A(ALFRED HOSPITAL MELBOURN), 20 Aug.2008(20.08.2008), see the whole document	1-37
A	WO2007140522A1 (AUSTIN HEALTH ET AL) , 13 Dec. 2007 (13.12.2007) , see the whole document	1-37

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2009/001165

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN101092651A	26.12.2007	NONE	
CN101248173A	20.08.2008	WO2006105597A1	12.10.2006
		EP1874923A1	09.01.2008
		AU2006230802A1	12.10.2006
		US2008176218A1	24.07.2008
		JP2008534020T	28.08.2008
		ZA200708522A	29.10.2008
		US2009130651A1	21.05.2009
WO2007140522A1	13.12.2007	EP2029747A1	04.03.2009
		KR20090016632A	16.02.2009
		AU2007257323A1	13.12.2007

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2009/001165

Continuation of Box A:

IPC:

C12N7/00 (2006.01) i
C12Q1/70 (2006.01) i
C12Q1/68 (2006.01) i
C12N15/01 (2006.01) i
C12N15/51 (2006.01) i
C12R1/92 (2006.01) n

Continuation of Box III:

The present application includes the following six groups of inventions:

Group I: Claims 1 and 35-37, relate to HBV mutation strain, vectors and host cells containing rtE218G mutation;

Group II: Claims 2-17, relate to methods of identifying HBV rtE218G mutation strains;

Group III: Claims 18-27, relate to detection reagents for detecting HBV rtE218G mutation and detection kits containing the detection reagents;

Group IV: Claim 28, relates to uses of HBV rtE218G mutation in guiding clinical drug use;

Group V: Claims 29-33, relate to uses of nucleotide sequence as shown in SEQ ID NO:1-7 and 18-19 in preparing the kits for guiding clinical drug use through detecting HBV rtE218G mutation ;

Group VI: Claim 34, relates to a method of screening drug;

D1 (L.J.Liu et al, "A NOVEL HEPATITIS B VIRUS MUTATION WITH RESISTANCE TO ADEFOVIR DIPIVOXIL IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS B" , see methods and results) discloses a novel HBV rtE218G mutation strain, using clone sequencing of the HBV polymerase gene to detect ADV-resistant mutation, cloning the full HBV genome of the novel pattern into an expression vector, and determining its in vitro replication capacity and susceptibility to ADV in transiently transfected HepG2 cells. The said novel rtE218G mutation strain is the same HBV rtE218G mutation strain as that of the present application. So there are no same or corresponding special technical features between the six groups of inventions, which do not belong to a single general inventive concept. Therefore, claims 1-37 lack unity, thus do not meet the requirements of Rule 13(1) and (2) PCT.

A. 主题的分类		
参见附加页		
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: C12N, C12Q, C12R		
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))		
数据库: EPODOC,WPI, CNPAT,ISI WEB OF KNOWLEDGE(BIOSIS, EMBASE),CNKI,GENBANK+DDBJ+EMBL		
检索词: hepatitis B virus, HBV, adefovir dipivoxil, ADV, polymerase, variant, mutation, reverse transcriptase, 乙肝, 乙型肝炎, 阿德福韦酯, 变异, 突变, 聚合酶, 变体, rE218G, E218G, 关于 SEQ ID NO:1-7,18-19 的检索		
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	L.J.Liu 等, “A NOVEL HEPATITIS B VIRUS MUTATION WITH RESISTANCE TO ADEFOVIR DIPIVOXIL IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS B”, Online, 25. 4 月 2009 (25.04.2009), 参见方法和结果	1, 5, 35-37
Y		2-4, 6-34
Y	CN101092651A (亚能生物技术(深圳)有限公司), 26.12 月 2007 (26.12.2007), 参见权利要求 1 和 5, 实施例 1	2-4, 6-34
A	CN101248173A (墨尔本保健公司等), 20.08 月 2008 (20.08.2008), 参见全文	1-37
☒ 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 26.01 月 2010 (26.01.2010)		国际检索报告邮寄日期 11.2 月 2010 (11.02.2010)
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		受权官员 王慧梅 电话号码: (86-10) 62411090

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☐ 权利要求：
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，
具体地说：

3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

参见附加页

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
2. ☒ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何附加费。
3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。
具体地说，是权利要求：
4. ☐ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：

关于异议的说明：☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。
☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

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	WO2007140522A1 (AUSTIN HEALTH ET AL), 13.12 月 2007 (13.12.2007), 参见全文	1-37

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2009/001165

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN101092651A	26.12.2007	无	
CN101248173A	20.08.2008	WO2006105597A1	12.10.2006
		EP1874923A1	09.01.2008
		AU2006230802A1	12.10.2006
		US2008176218A1	24.07.2008
		JP2008534020T	28.08.2008
		ZA200708522A	29.10.2008
		US2009130651A1	21.05.2009
WO2007140522A1	13.12.2007	EP2029747A1	04.03.2009
		KR20090016632A	16.02.2009
		AU2007257323A1	13.12.2007

A 栏的续页:

IPC:

C12N7/00 (2006.01) i

C12Q1/70 (2006.01) i

C12Q1/68 (2006.01) i

C12N15/01 (2006.01) i

C12N15/51 (2006.01) i

C12R1/92 (2006.01) n

第III栏的续页:

本申请包括以下六组发明:

第一组: 权利要求 1 和 35-37, 涉及含有 rtE218G 突变的 HBV 突变株, 载体和宿主细胞;

第二组: 权利要求 2-17, 涉及鉴定 HBV rtE218G 突变株的方法;

第三组: 权利要求 18-27, 涉及用于检测 HBV rtE218G 突变的检测试剂和含有所述检测试剂的检测试剂盒;

第四组: 权利要求 28, 涉及 HBV rtE218G 突变在指导临床用药中的应用;

第五组: 权利要求 29-33, 核苷酸序列 SEQ ID NO:1-7 和 18-19 在制备通过检测 HBV rtE218G 突变而指导临床用药的试剂盒中的用途;

第六组: 权利要求 34, 涉及一种药物筛选方法;

D1 (L.J.Liu 等, “A NOVEL HEPATITIS B VIRUS MUTATION WITH RESISTANCE TO ADEFOVIR DIPIVOXIL IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS B”, 参见方法和结果) 公开了一株新的 rtE218G 突变株, 使用 HBV 聚合酶基因的克隆测序来检测 ADV 抗性突变, 并把该新型的全长 HBV 基因组克隆到表达载体中, 在瞬时转染的 HepG2 细胞中测定它的体外复制能力和对 ADV 的敏感性, 其中的新的 rtE218G 突变株与本申请的 HBV rtE218G 突变株相同, 从而这六组发明之间没有相同或相应的特定技术特征, 不属于一个总的发明构思, 即这六组发明之间没有单一性, 因此, 权利要求 1-37 不符合 PCT 细则第 13 条 (1) 和 (2) 的规定。