

(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
2022 年 4 月 7 日 (07.04.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/068079 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12Q 1/70 (2006.01) *C12Q 1/6858* (2018.01)
C12N 15/11 (2006.01) *C12R 1/93* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2020/136277
- (22) 国际申请日: 2020 年 12 月 14 日 (14.12.2020)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
202011066425.4 2020年9月30日 (30.09.2020) CN
- (71) 申请人: 浙江大学(ZHEJIANG UNIVERSITY) [CN/
CN]; 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路
866号, Zhejiang 310058 (CN)。
- (72) 发明人: 任艳丽(REN, Yanli); 中国浙江省杭州市
西湖区余杭塘路866号, Zhejiang 310058 (CN)。

陈智(CHEN, Zhi); 中国浙江省杭州市西湖区
余杭塘路866号, Zhejiang 310058 (CN)。 朱海
红(ZHU, Haihong); 中国浙江省杭州市西湖区
余杭塘路866号, Zhejiang 310058 (CN)。 洪萌
(HONG, Meng); 中国浙江省杭州市西湖区余
杭塘路866号, Zhejiang 310058 (CN)。 吴国娣
(WU, Guodi); 中国浙江省杭州市西湖区余
杭塘路866号, Zhejiang 310058 (CN)。

(74) 代理人: 杭州中成专利事务所有
限公司(HANGZHOU ZHONGCHENG PATENT
AGENCY CO., LTD.); 中国浙江省杭州市西湖
区天目山路46号宁波大厦1301室(联系人:
朱莹莹), Zhejiang 310007 (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,

(54) Title: METHOD FOR DETECTING HEPATITIS B VIRUS T216C MUTATION BASED ON MICRO-DROPLET DIGITAL PCR TECHNOLOGY

(54) 发明名称: 一种基于微滴式数字PCR技术的乙型肝炎病毒T216C突变检测方法

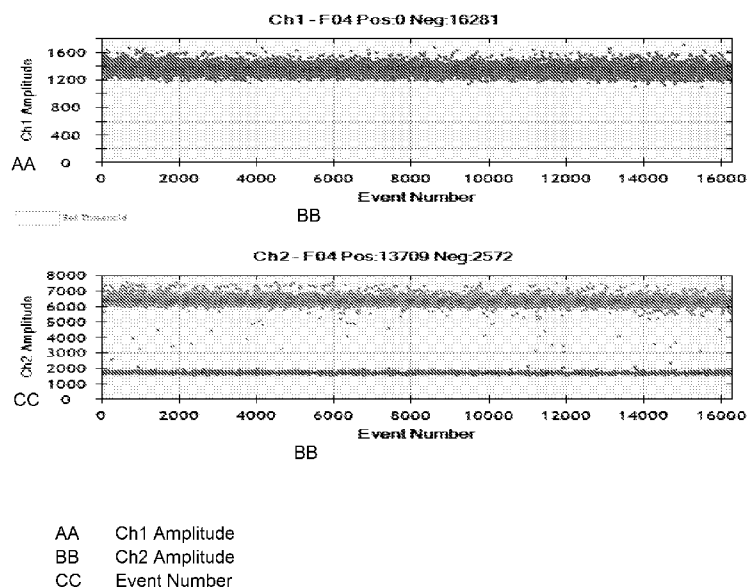


图 1

(57) Abstract: A method for detecting Hepatitis B virus (HBV) T216C mutation based on micro-droplet digital PCR technology. By combining micro-droplet digital PCR technology with an amplification mutation system method, i.e., making use of the advantages of high sensitivity and absolute quantification of a digital PCR in combination with the advantage of high specificity of an amplification refractory mutation system, a method capable of detecting a low-abundance HBV mutation situation early is developed, so as to better satisfy the requirements of clinical medication and scientific research.

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, IT, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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))。
-

(57) 摘要: 一种基于微滴式数字PCR技术的乙型肝炎病毒T216C突变检测方法。结合微滴式数字PCR技术和突变扩增系统方法, 利用数字PCR的高灵敏度和绝对定量的优势, 联合突变扩增阻滞系统的高特异性优势, 开发一个能够早期检测低丰度HBV突变情况, 以便更好的满足临床用药及科研的需求。

一种基于微滴式数字 PCR 技术的乙型肝炎病毒 T216C 突变检测方法

技术领域

本发明属于生物检测方法技术领域，具体涉及一种基于微滴式数字 PCR 技术的乙型肝炎病毒 T216C 突变检测方法。

背景技术

乙型病毒性肝炎仍是一个世界性的公共卫生问题，乙型肝炎病毒（Hepatitis B virus, HBV）相关的慢加急性肝衰竭(acute on chronic liver failure, ACLF)是慢性肝炎患者死亡的重要原因。长期以来宿主免疫一直被认为是乙型肝炎加剧的主要原因，但是近年的研究结果表明病毒因素在 ACLF 的发病中同样起重要作用。HBV 是嗜肝病毒家族的一员，其基因组全长约为 3200 个核苷酸，包含 4 个相互重叠的开放性读码框，分别编码 HBV 表面抗原、核心抗原、聚合酶和多功能的非结构性蛋白 X。由于 HBV 的复制过程包含前基因组 RNA 的逆转录，其逆转录酶缺乏校正功能，故 HBV 的突变率显著高于其它的 DNA 病毒。HBV 基因组的突变率可随着病毒的复制不断增加，其中一些突变可能与慢性肝炎的急性加剧相关，可作为 ACLF 的预警的生物标志物和抗病毒治疗的靶标。有研究通过收集 ACLF 样本，利用 HBV 全基因组测序筛选出与 ACLF 发病相关的 HBV 突变，发现 T216C 突变为 ACLF 发生的独立危险因素，可作为预测乙型肝炎加剧的分子标志物，为阻止 ACLF 发病和改善 HBV 感染者的预后提供依据。

数字 PCR（Digital PCR）技术是一种核酸分子绝对定量技术，不依赖于标准曲线和参照样本，直接检测目标序列的拷贝数，与传统的荧光定量相比，数字 PCR 有更高的灵敏度、特异性和精确性。由于数字 PCR 在进行结果判读时仅判断有/无两种扩增状态，不需要检测荧光信号与设定阈值线的交点，完全不依赖于 Ct 值，因此数字 PCR 反应受扩增效率的影响大大降低，对反应抑制物的耐受能力大大提高；数字 PCR 标准反应体系分配的过程可以极大程度上降低与目标序列有竞争性作用的背景序列浓度，因此数字 PCR 技术适用于在复杂背景中检测稀有突变，在极微量核酸样本检测、复杂背景下稀有突变检测和表达量微小差异鉴定方面具有明显的优势。微滴式数字 PCR 仪是将含有核酸分子的反应体系形成成千上万个纳升级的微滴，其中每个微滴或不含待检核酸靶分子，或者含有一个至数个待检核酸靶分子，且每个微滴都作为一个独立的 PCR 反应器。经 PCR 扩增后，采用微滴分析仪对每个微滴进行检测，有荧光信号微滴判读为 1，没有荧光信号微滴判读为 0，根据泊松分布原理可计算出检测分子的浓度或拷贝数。

突变扩增阻滞系统(amplification refractory mutation system,ARMS)是 Newton 等首先建立用来检测已知突变的方法。在一定条件下,PCR 引物 3'末端的错配导致产物的急剧减少,针对不同的已知突变,设计适当的引物可以通过 PCR 方法直接达到区分突变型和野生型基因的目的。ARMS 技术即针对突变位点设计引物,将需检测的突变位点置于引物的 3' 端,突变引物扩增野生型模板时会被阻滞,不能有效扩增。该系 ARMS 技术具有高特异性和高灵敏度,已用于多种疾病的点突变的检测。

本发明将突变扩增阻滞系统和数字 PCR 系统结合起来,开发具有高灵敏度和高特异性的能够绝对定量的突变检测方法。

发明内容

针对现有技术存在的问题和需求,本发明目的是提供一种基于微滴式数字 PCR 技术的 HBV T216C 突变位点检测方法。结合微滴式数字 PCR 技术和突变扩增系统方法,利用数字 PCR 的高灵敏度和绝对定量的优势,联合突变扩增阻滞系统的高特异性优势,开发一个能够早期检测低丰度 HBV 突变情况,以便更好的满足临床用药及科研的需求。

技术方案:为实现上述目的,本发明提供一种基于微滴式数字 PCR 技术检测 HBV T216C 突变的方法,所述方法包括如下步骤:

- (1) 对 HBV 基因的 T216C 突变位点设计 PCR 扩增引物和探针
- (2) 对 HBV 基因保守序列设计 PCR 扩增引物和探针
- (3) 对步骤(1)和(2)的突变位点基因和保守序列基因进行两通道的微滴式数字 PCR 检测
- (4) 通过对 HBV 突变位点的微滴式数字 PCR 扩增结果确定待测样品是否存在突变及突变拷贝数,通过对 HBV 基因保守序列基因的数字 PCR 扩增结果确定样品中 HBV 基因总数,通过比较来计算判断 HBV 突变基因占 HBV 基因总数的比例。

本发明提供了用于步骤(1)检测 HBV 基因 T216C 突变位点的引物和探针包括由 SEQ NO:1 所示的正向引物、由 SEQ ID:2 所示的反向引物、由 SEQ ID NO:3 所示的探针。

NO:1 HBV 基因 T216C 突变位点正向引物

GTTACAGGCGGGGTTTTTCGC

NO:2 HBV 基因 T216C 突变位点反向引物

TTGGGGACTGCGAATTTTGG

NO:3 HBV 基因 T216C 突变位点探针

FAM-TCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCA-BHQ1

本发明提供用于步骤（2）检测 HBV 基因保守序列的引物和探针包括由 SEQ NO:4 示的正向引物、由 SEQ ID:5 所示的反向引物、由 SEQ ID NO:6 所示的探针。

NO:4 HBV 基因保守区域正向引物

CCTGGCTATCGCTGGATGTGT

NO:5 HBV 基保守区域反向引物

GGACAAACGGGCAACATACCTT

NO:6 HBV 基因保守区域探针

VIC-CCTCTTCATCCTGCTGCTATGCCTCA-BHQ1

本发明所述检测探针 5' 端标记荧光染料，标记荧光基团优选的是 FAM、VIC 或 HEX 中的任意一种，优选为 FAM 荧光，3' 端标记淬灭基团，所述淬灭基团为 BHQ1、BHQ2 或 MGB 中的任意一种，优选为 BHQ1。

本发明所述检测探针 5' 端标记荧光染料，标记荧光基团优选的是 FAM、VIC 或 HEX 中的任意一种，优选为 VIC 荧光，3' 端标记淬灭基团，所述淬灭基团为 BHQ1、BHQ2 或 MGB 中的任意一种，优选为 BHQ1。

本发明所述用于步骤（3）两通道检测的数字 PCR 检测试剂，还包括微滴生成卡，96 孔反应板、铝箔热封膜和读数油。

本发明所述微滴式数字 PCR 检测方法至少包括以下步骤：

- （1）提取模板 DNA；
- （2）将所述数字 PCR 检测试剂与引物、探针及 DNA 模板混合，配制微滴式数字 PCR 反应混合液
- （3）将所述微滴式数字 PCR 反应混合液和微滴生成油加入微滴生成卡中，与微滴生成仪中生成微滴，转移到 96 孔反应板中进行 PCR 反应；
- （4）将 96 孔板置于微滴读取仪中，利用软件直接读取结果，进行分析，计算 HBV 总拷贝数和突变拷贝数，计算突变比例。

本发明所述的微滴式数字 PCR 扩增反应条件为：95℃作用 10 分钟，然后 94℃作用 30 秒、58℃作用 45 秒，共进行 40 个循环，最后 98℃作用 10 分钟灭活，降温至 4℃。

与现有技术相比，本发明具有以下的优点和效果：

- (1) 本发明结合数字 PCR 技术和突变扩增阻滞系统方法,兼具数字 PCR 技术的灵敏度高、能够绝对定量及突变扩增阻滞系统方法检测突变特异性强的特点,在 HBV 发生 216 位点突变基因丰度很低的情况下进行特异性检测,能够精确快速得出低丰度突变的比例,可预警预测乙型肝炎重症化,为阻止 ACLF 发病和改善 HBV 感染者的预后提供依据。
- (2) 本发明基于数字 PCR 系统平台,具有绝对定量的优势,可直接根据结果计算得到突变比例。
- (3) 本发明检测方法操作简单,与传统荧光定量 PCR 技术的兼容性高,检测结果一致性好,具有较高的实际应用价值。

附图说明

图 1: 突变型为阴性,野生型为阳性的检测图。

图 2: 突变质粒模板与野生质粒模板比例为 1:1000 的检测图。

具体实施方式

通过下面具体的实例可以更容易的了解本发明的内容,本发明的保护范围不局限于下述特定的具体实施方案。

实施例一:

利用突变扩增系统(ARMS)方法设计合成检测 HBVT216C 突变的引物和探针

针对 HBV216 位点的突变,根据 ARMS 方法原理,利用 Beacon Designer 生物软件设计引物和探针,利用引物设计规则,手动输入含突变位点的上游引物,将突变位点放在上游引物 3'端,软件搜索匹配的下游引物和探针;得到 SEQ NO:1 所示的正向引物、由 SEQ ID:2 所示的反向引物、由 SEQ ID NO:3 所示的探针,探针荧光基团为 FAM,淬灭基团为 BHQ1。

针对 HBV 保守序列,根据 ARMS 方法原理,利用 Beacon Designer 生物软件设计引物和探针,得到 SEQ NO:4 所示的正向引物、由 SEQ ID:5 所示的反向引物、由 SEQ ID NO:6 所示的探针,探针荧光基团为 VIC,淬灭基团为 BHQ1。

本发明的引物和探针是从多条引物和探针中筛选出最优化的,具有特异性强,灵敏度高的特性。

实施例二

HBV 基因 216 位点的突变检测

1. 准备检测样本: 将含有 HBV 突变型位点基因(T216C)的质粒和含有 HBV 保守序列的质粒

按照拷贝数含量为 1:100、1:1000 和 1:5000 的比例混合，取 2 μ l 混合后的 DNA 检测。

2. 配制 ddPCR 反应液：2*ddPCR supermix for probes(no dUTP) (BIO-RAD)，用于检测 216 突变位点的上下游引物和探针，用于检测 HBV 保守序列的上下游引物和探针，待测混合型 DNA 模板，蒸馏水补充至总体积为 20 μ l，配制 ddPCR 反应液，其中两对上下游引物的浓度均为 500nM，两个探针的含量为 250nM。

3. 将配制好的 20 μ l PCR 反应液，转移至微滴发生卡中，加入 70 μ l 微滴发生油后，利用微滴生成仪制备反应微滴。

4. 将生成的微滴全部转移至 96 孔 PCR 反应板，于普通 PCR 仪上进行扩增，扩增程序如下：

过 程		温 度	时间	循环数
1	预变性	95℃	10min	1
2	变性	94℃	30s	40
3	退火和延伸	58℃	45s	
4	灭活	98℃	10min	1
5	冷却	4℃	60min	1

5. 将扩增后的 96 孔板放入微滴读取仪中，并在软件 QuantaSoft 上设定检测模式，检测 FAM 和 VIC 的荧光信号，仪器会自动分析每个微滴中荧光信号，根据检测得出的突变型 HBV 绝对定量，计算样品中 HBV 突变型占总的 HBV 含量的比率。

6
权 利 要 求 书

1. 一种基于微滴式数字 PCR 技术的乙型肝炎病毒 T216C 突变检测的方法，其特征在于，所述方法包括如下步骤：
 - (1) 对 HBV 基因的 T216C 突变位点设计 PCR 扩增引物和探针；
 - (2) 对 HBV 基因的保守序列设计 PCR 扩增引物和探针；
 - (3) 对步骤(1)和(2)的突变位点基因和保守序列基因进行两通道的微滴式数字 PCR 检测；
 - (4) 通过对 HBV 突变位点的微滴式数字 PCR 扩增结果确定待测样品是否存在突变及突变拷贝数，通过对 HBV 基因保守序列基因的数字 PCR 扩增结果确定样品中 HBV 基因总数，通过比较来计算判断 HBV 突变基因占 HBV 基因总数的比例。
2. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述用于步骤(1)检测 HBV 基因 T216C 突变位点的引物和探针包括由 SEQ NO:1 所示的正向引物、由 SEQ ID:2 所示的反向引物、由 SEQ ID NO:3 所示的探针。
3. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述用于步骤(2)检测 HBV 基因保守序列的引物和探针包括由 SEQ NO:4 示的正向引物、由 SEQ ID:5 所示的反向引物、由 SEQ ID NO:6 所示的探针。
4. 根据权利要求 2 或 3 所述的方法，其特征在于，所述检测探针 5'端标记荧光染料，标记荧光基团为 FAM、VIC 或 HEX 中的任意一种；3'端标记淬灭基团，所述淬灭基团为 BHQ1、BHQ2 或 MGB 中的任意一种。
5. 根据权利要求 4 所述的方法，其特征在于，所述标记荧光基团 VIC 荧光；所述淬灭基团为 BHQ1。
6. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述用于步骤(3)两通道检测的数字 PCR 检测包括检测试剂，还包括微滴生成卡，96 孔反应板、铝箔热封膜和读数油。
7. 根据权利要求 6 所述的方法，其特征在于，步骤(3)包括以下步骤：
 - 1) 提取模板 DNA；
 - 2) 将所述数字 PCR 检测试剂与引物、探针及 DNA 模板混合，配制微滴式数字 PCR 反应混合液；
 - 3) 将所述微滴式数字 PCR 反应混合液和微滴生成油加入微滴生成卡中，与微滴生成仪中生成微滴，转移到 96 孔反应板中进行 PCR 反应；
 - 4) 将 96 孔板置于微滴读取仪中，利用软件直接读取结果，进行分析，计算 HBV 总拷

贝数和突变拷贝数，计算突变比例。

8. 根据权利要求 7 所述的方法,其特征在于,所述的微滴式数字 PCR 扩增反应条件为:95℃作用 5 分钟,然后 95℃作用 15 秒、58℃作用 30 秒,共进行 40 个循环,最后 98℃作用 10 分钟灭活,降温至 4℃。

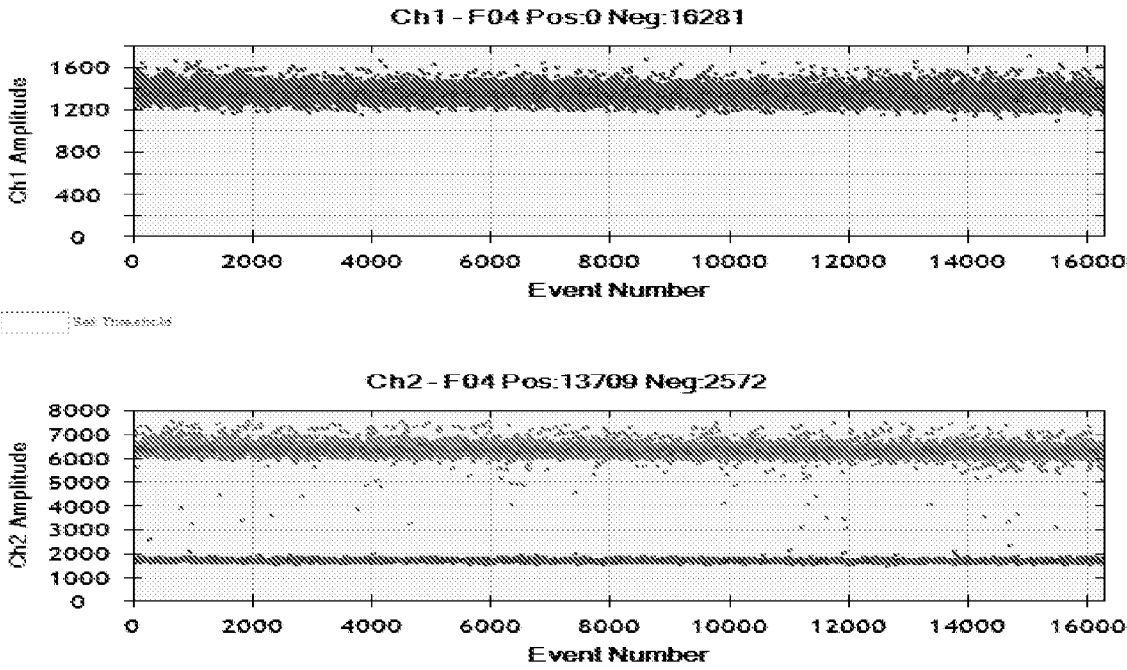


图 1

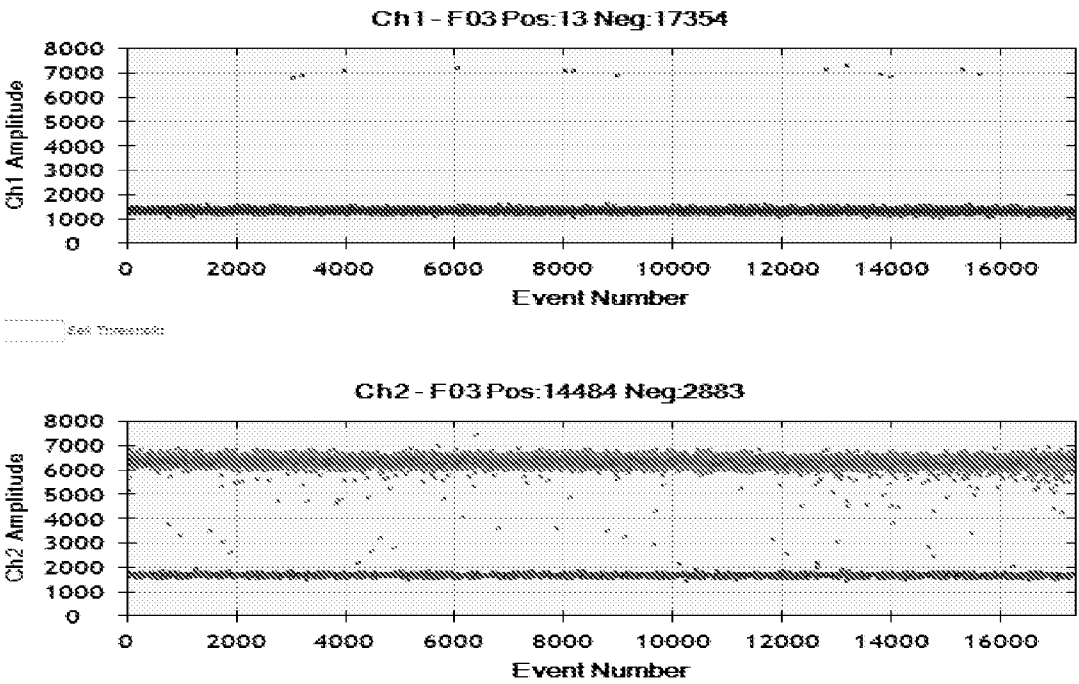


图 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/136277

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/70(2006.01)i; C12N 15/11(2006.01)i; C12Q 1/6858(2018.01)i; C12R 1/93(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)

C12Q,C12N,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)

CNABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, WOTXT, JPTXT, USTXT, EPTXT, 万方, CNKI, PubMed, GenBank, ISI web of knowledge: 微滴式数字PCR, 乙型肝炎病毒, T216C, 突变检测, 方法, 引物, 探针, hepatitis B virus, T216C mutation, droplet digital PCR, amplification primers, probes

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 112280896 A (ZHEJIANG UNIVERSITY) 29 January 2021 (2021-01-29) claims 1-8, description paragraphs 0007-0034	1-8
A	CN 110863054 A (BEIJING XINYI BIOLOGICAL TECHNOLOGY CO., LTD. et al.) 06 March 2020 (2020-03-06) entire document	1-8
A	CN 107604096 A (HANGZHOU DIAN MEDICAL EXAMINATION CENTER CO., LTD.) 19 January 2018 (2018-01-19) entire document	1-8
A	CN 110684862 A (WUHAN BIOTGENE ENGINEERING CO., LTD. et al.) 14 January 2020 (2020-01-14) entire document	1-8
A	CN 106381345 A (THE SECOND AFFILIATED HOSPITAL OF CHONGQING MEDICAL UNIVERSITY) 08 February 2017 (2017-02-08) entire document	1-8



Further documents are listed in the continuation of Box C.



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

12 May 2021

Date of mailing of the international search report

30 June 2021

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/136277**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2016146064 A1 (TOT SHANGHAI R&D CENTER CO., LTD.) 22 September 2016 (2016-09-22) entire document	1-8
A	WO 2018023094 A1 (JUNO THERAPEUTICS, INC.) 01 February 2018 (2018-02-01) entire document	1-8
A	WO 2020033916 A1 (JUNO THERAPEUTICS, INC.) 13 February 2020 (2020-02-13) entire document	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/136277

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 13*ter*.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 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.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/CN2020/136277

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	112280896	A	29 January 2021	None			
CN	110863054	A	06 March 2020	None			
CN	107604096	A	19 January 2018	CN	107604096	B	03 September 2019
CN	110684862	A	14 January 2020	None			
CN	106381345	A	08 February 2017	None			
WO	2016146064	A1	22 September 2016	TW	I710640	B	21 November 2020
				TW	201634700	A	01 October 2016
				CN	106032551	A	19 October 2016
				CN	106032551	B	21 July 2020
WO	2018023094	A1	01 February 2018	CA	3031994	A1	01 February 2018
				EP	3491152	A1	05 June 2019
				MX	2019001186	A	29 August 2019
				CN	109804089	A	24 May 2019
				US	2020056249	A1	20 February 2020
				JP	2019521695	A	08 August 2019
				AU	2017301881	A1	07 February 2019
WO	2020033916	A1	13 February 2020	AU	2019316647	A1	25 February 2021
				CA	3108698	A1	13 February 2020

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/136277

A. 主题的分类 C12Q 1/70(2006.01)i; C12N 15/11(2006.01)i; C12Q 1/6858(2018.01)i; C12R 1/93(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) C12Q, C12N, 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)) CNABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, WOTXT, JPTXT, USTXT, EPTXT, 万方, CNKI, PubMed, GenBank, ISI web of knowledge: 微滴式数字PCR, 乙型肝炎病毒, T216C, 突变检测, 方法, 引物, 探针, hepatitis B virus, T216C mutation, droplet digital PCR, amplification primers, probes																										
C. 相关文件 <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>PX</td> <td>CN 112280896 A (浙江大学) 2021年 1月 29日 (2021 - 01 - 29) 权利要求1-8, 说明书第0007-0034段</td> <td>1-8</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 110863054 A (北京新羿生物科技有限公司 等) 2020年 3月 6日 (2020 - 03 - 06) 全文</td> <td>1-8</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 107604096 A (杭州迪安医学检验中心有限公司) 2018年 1月 19日 (2018 - 01 - 19) 全文</td> <td>1-8</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 110684862 A (武汉百泰基因工程有限公司 等) 2020年 1月 14日 (2020 - 01 - 14) 全文</td> <td>1-8</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 106381345 A (重庆医科大学附属第二医院) 2017年 2月 8日 (2017 - 02 - 08) 全文</td> <td>1-8</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2016146064 A1 (TOT SHANGHAI R&D CENTER CO., LTD.) 2016年 9月 22日 (2016 - 09 - 22) 全文</td> <td>1-8</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2018023094 A1 (JUNO THERAPEUTICS, INC.) 2018年 2月 1日 (2018 - 02 - 01) 全文</td> <td>1-8</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	PX	CN 112280896 A (浙江大学) 2021年 1月 29日 (2021 - 01 - 29) 权利要求1-8, 说明书第0007-0034段	1-8	A	CN 110863054 A (北京新羿生物科技有限公司 等) 2020年 3月 6日 (2020 - 03 - 06) 全文	1-8	A	CN 107604096 A (杭州迪安医学检验中心有限公司) 2018年 1月 19日 (2018 - 01 - 19) 全文	1-8	A	CN 110684862 A (武汉百泰基因工程有限公司 等) 2020年 1月 14日 (2020 - 01 - 14) 全文	1-8	A	CN 106381345 A (重庆医科大学附属第二医院) 2017年 2月 8日 (2017 - 02 - 08) 全文	1-8	A	WO 2016146064 A1 (TOT SHANGHAI R&D CENTER CO., LTD.) 2016年 9月 22日 (2016 - 09 - 22) 全文	1-8	A	WO 2018023094 A1 (JUNO THERAPEUTICS, INC.) 2018年 2月 1日 (2018 - 02 - 01) 全文	1-8
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																								
PX	CN 112280896 A (浙江大学) 2021年 1月 29日 (2021 - 01 - 29) 权利要求1-8, 说明书第0007-0034段	1-8																								
A	CN 110863054 A (北京新羿生物科技有限公司 等) 2020年 3月 6日 (2020 - 03 - 06) 全文	1-8																								
A	CN 107604096 A (杭州迪安医学检验中心有限公司) 2018年 1月 19日 (2018 - 01 - 19) 全文	1-8																								
A	CN 110684862 A (武汉百泰基因工程有限公司 等) 2020年 1月 14日 (2020 - 01 - 14) 全文	1-8																								
A	CN 106381345 A (重庆医科大学附属第二医院) 2017年 2月 8日 (2017 - 02 - 08) 全文	1-8																								
A	WO 2016146064 A1 (TOT SHANGHAI R&D CENTER CO., LTD.) 2016年 9月 22日 (2016 - 09 - 22) 全文	1-8																								
A	WO 2018023094 A1 (JUNO THERAPEUTICS, INC.) 2018年 2月 1日 (2018 - 02 - 01) 全文	1-8																								
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。																										
<table border="0"> <tr> <td> * 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 </td> <td> “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 </td> </tr> </table>			* 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																						
* 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 2021年 5月 12日		国际检索报告邮寄日期 2021年 6月 30日																								
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		授权官员 吕健 电话号码 86-(10)-53962098																								

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
A	WO 2020033916 A1 (JUNO THERAPEUTICS, INC.) 2020年 2月 13日 (2020 - 02 - 13) 全文	1-8

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/CN2020/136277

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	112280896	A	2021年 1月 29日	无			
CN	110863054	A	2020年 3月 6日	无			
CN	107604096	A	2018年 1月 19日	CN	107604096	B	2019年 9月 3日
CN	110684862	A	2020年 1月 14日	无			
CN	106381345	A	2017年 2月 8日	无			
WO	2016146064	A1	2016年 9月 22日	TW	1710640	B	2020年 11月 21日
				TW	201634700	A	2016年 10月 1日
				CN	106032551	A	2016年 10月 19日
				CN	106032551	B	2020年 7月 21日
WO	2018023094	A1	2018年 2月 1日	CA	3031994	A1	2018年 2月 1日
				EP	3491152	A1	2019年 6月 5日
				MX	2019001186	A	2019年 8月 29日
				CN	109804089	A	2019年 5月 24日
				US	2020056249	A1	2020年 2月 20日
				JP	2019521695	A	2019年 8月 8日
				AU	2017301881	A1	2019年 2月 7日
WO	2020033916	A1	2020年 2月 13日	AU	2019316647	A1	2021年 2月 25日
				CA	3108698	A1	2020年 2月 13日