

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12Q 1/68

G01N 33/68



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510004456.6

[43] 公开日 2005 年 10 月 12 日

[11] 公开号 CN 1680592A

[22] 申请日 2001.7.18

[21] 申请号 200510004456.6

分案原申请号 01122929.2

[30] 优先权

[32] 2000.7.18 [33] SG [31] 200004041-0

[71] 申请人 新加坡共和国政府

地址 新加坡学院路 16 号

[72] 发明人 温崇仁 陈维宁

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书 2 页 说明书 28 页 附图 2 页

[54] 发明名称 诊断试验

[57] 摘要

本发明一般涉及基于核酸的分析试验，该试验可用于检测病毒病原体，特别是乙肝病毒的存在。更特别地，本发明提供了检测乙肝病毒核酸序列的一步扩增试验。本发明的试验可以容易地适应自动化操作，并且可以使待测样品快速流通。本发明还提供了试剂和含有所述试剂的试剂盒，所述试剂可用于进行基于核酸的乙肝病毒检测试验。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1.检测样品中 HBV-核酸靶序列的方法,所述方法包括:使样品经受变性条件以产生单链形式的所述靶序列;使该变性样品与一套引物接触,所述引物套含有至少两种引物,其中至少一种引物能与所述靶序列的一条链杂交,其中至少一种其它的引物能与所述第一条链的互补链杂交,其中所述引物能从它们的 3' 末端延伸,形成与每种所述引物所杂交的链互补的延伸产物;使样品经受有利于扩增的条件,产生含有互补延伸产物的扩增产物;然后检测扩增产物的存在,其中所述扩增产物的存在指示所述 HBV-核酸靶序列的存在。

2.权利要求 1 的方法,其中所述引物与以下区域杂交,所述区域对应于或侧翼于编码 HbsAg 之完整或部分核苷酸序列内的核苷酸序列。

3.权利要求 2 的方法,其中所述引物与以下区域杂交,所述区域对应于或侧翼于编码 HbsAg 之核苷酸序列的一部分中的保守核苷酸序列。

4.权利要求 1 或 2 或 3 的方法,其进一步包括首先使样品经受逆转录条件以从 HBV-mRNA 产生单链或双链 cDNA 分子。

5. HBV 变体,通常是分离形式,其可通过检测 HBV-核酸靶序列的方法鉴定,所述方法包括:使样品经受变性条件以产生单链形式的所述靶序列;使该变性样品与一套引物接触,所述引物套含有至少两种引物,其中至少一种引物能与所述靶序列的一条链杂交,其中至少一种其它的引物能与所述第一条链的互补链杂交,其中所述引物能从它们的 3' 末端延伸,形成与每种所述引物所杂交的链互补的延伸产物;使样品经受有利于扩增的条件,产生含有互补延伸产物的扩增产物;然后检测扩增产物的存在,其中所述扩增产物的存在指示所述 HBV-核酸靶序列的存在;然后分离检测到的所述 HBV。

6. HBV 变体,其为选自下列的 HBsAg 变体

(1) 在 HBsAg 中具有 G130D, M133T 和 G145R 突变;

(2) 在 HBsAg 中具有 T131N 和 G145 突变;

(3) 在 HBsAg 中具有 T131N 突变。

7.鉴定表达产物的方法,所述表达产物如肽,多肽或蛋白质,它们可作为免疫标志使用和/或用于产生诊断和/或治疗所用的免疫球蛋白。

8.固定于固体支持物上的两种或多种寡核苷酸引物的一种列阵,所述引物能与 HBV-衍生 DNA 的互补核苷酸序列杂交。

- 9.权利要求 8 的列阵,其中列阵由在基质上坐标为 (x_1y_1) , (x_2y_2) ... (x_ny_n) 的式 $a_1a_2...a_n$ 定义,其中 $a_1a_2...a_n$ 表示相同或不同的寡核苷酸,总共为 n 个寡核苷酸,每个寡核苷酸可由方格坐标 (x_1y_1) , (x_2y_2) ... (x_ny_n) 确定,其中寡核苷酸具有由 $b_1b_2...b_n$ 定义的扩增配对物,从而使寡核苷酸 a_1b_1 , a_2b_2 ... a_nb_n 能与 HBV-DNA 的互补链杂交,其中间插的 DNA 含有在两种或多种 HBV 变体,如 HBsAg 变体之间保守的核苷酸序列,其中所述基质可用于检测特定的 HBV 因子,所述因子的特征在于携有所述 HBV-衍生 DNA 的保守扩增区域。
- 10.权利要求 1 的方法,其中所述引物选自<400>1 和<400>2,或者与其具有至少约 70%相似性的引物,或能在低严谨条件下与<400>1 或<400>2 杂交的引物。

诊断试验

5 本申请是 2001 年 7 月 18 日提交的题为“诊断实验”的中国申请 01122929.2 的分案申请。

技术领域

本发明一般涉及基于核酸的试验，该试验可用于检测病毒病原体，特别是乙肝病毒的存在。更特别地，本发明提供了检测乙肝病毒核酸序列的
10 一步扩增试验。本发明的试验可以容易地适应自动化操作，并且可以使待测样品快速流通。本发明还提供了试剂和含有所述试剂的试剂盒，所述试剂可用于进行基于核酸的乙肝病毒检测试验。

背景技术

说明书的末尾集中列出了说明书中用数字提及的出版物的详细目录。

15 乙肝病毒(下文称之为“HBV”)可导致使人衰弱的疾病状态，并可导致急性肝衰竭，肝硬化性出血和原发性肝癌。HBV 每年感染数百万个体，每年导致至少一百万人死亡。

HBV 是 DNA 病毒，该病毒的复制需借助于 RNA 中间体，其复制策略利用了逆转录。HBV 基因组特性复杂，它具有部分双链 DNA 结构，所述
20 结构具有重叠的编码多种病毒蛋白的开放阅读框。

尽管可以获得 HBV 疫苗，但仍有几亿个体是此病毒的携带者。一般通过检测 HBV 表面抗原(HBsAg)，病毒核心抗原(HBcAg)和抗 HBeAg 的抗体(抗-HBeAg)来鉴定 HBV。

被 HBV 感染或用 HBsAg 免疫接种之后，血清出现抗 HBsAg 的抗体(抗
25 -HBs)。这是免疫检测 HBsAg 的基础。这种检测系统筛选的是 HBsAg 或抗-HBs。该试验已被用于：在输血前筛选血液中的 HBV，检测急性和慢性肝炎，肝硬化和原发性肝癌患者的 HBV-相关肝病，和筛选例如移植受体和供体中的 HBV 携带者。

30 HBsAg 含有被称为“a”决定簇的抗原区域(1)。“a”决定簇构象复杂，并且依赖于高度保守的半胱氨酸残基之间的二硫键。“a”决定簇中的遗传变异导致产生能逃避由常规疫苗所引起之免疫应答的 HBV 突变体(2-6)。一个特别常见的突变是 HBsAg 氨基酸第 145 位的甘氨酸(G)被精氨酸(R)取代

(G145R)。此突变影响“a”表位区域。

HBV 感染的治疗或预防越来越依赖化学和免疫学干预，这导致越来越多地选择出对干预疗法具有抗性的 HBV 变体。由于 HBV 重叠的基因组结构，可通过使用化学试剂或疫苗直接或间接选择 HBV 变体。

5 因此，常规的基于抗体的 HBsAg 分析试验可导致假阴性结果。这会对疾病传播的控制和患者管理产生很严重的影响。

在导致本发明的工作中，发明人想寻找另一种 HBV 测定法。根据本发明，发明人开发出一种一步核酸扩增试验，用于对显示或未显示免疫-可测病毒标记的 HBV 中的 HBV 核酸序列进行筛选。本发明基于核酸的分析试验提供了对 HBV 因子的敏感测定法，尤其当所述 HBV 因子不能被常规的基于免疫的诊断试验检测时，本发明的试验特别有用。另外，本发明的试验允许根据 HBV 变体的保守区域开发特异性的免疫球蛋白(如 IgG)和疫苗。

发明内容

15 纵观本说明书，除非上下文需要，否则术语“含有”应被理解为暗指包括所提及的一个组成要素或整体或一组要素或整体，但不排除任何其它要素或整体或其它组要素或整体。

本发明的一个方面是：提供对样品中 HBV-核酸靶序列进行检测的方法，所述方法包括：使样品经受变性条件以产生单链形式的所述靶序列；使该变性样品与一套引物接触，所述引物套含有至少两种引物，其中至少一种引物能与所述靶序列的一条链杂交，其中至少一种其它的引物能与所述第一条链的互补链杂交，其中所述引物能从它们的 3' 末端延伸，形成与每种所述引物所杂交的链互补的延伸产物；使样品经受有利于扩增的条件，产生含有互补延伸产物的扩增产物；然后检测扩增产物的存在，其中所述扩增产物的存在指示所述 HBV-核酸靶序列的存在。

25 本发明的另一方面是：提供对样品中 HBV-核酸靶序列进行检测的方法，所述方法包括：使样品经受变性条件以产生单链形式的所述靶序列；使该变性样品与一套引物接触，所述引物套含有至少两种引物，其中至少一种引物能与所述靶序列的一条链杂交，其中至少一种其它的引物能与所述第一条链的互补链杂交，其中所述引物能从它们的 3' 末端延伸，形成与每种所述引物所杂交的链互补的延伸产物，其中选择与特定区域杂交的引物，所述区域对应于或侧翼于编码 HBsAg 的完整或部分核苷酸序列内的保守核苷酸序列；使样品经受有利于扩增的条件，产生含有互补延伸产物的

扩增产物；然后检测扩增产物的存在，其中所述扩增产物的存在指示所述 HBV-核酸靶序列的存在。

本发明的另一方面是：提供对样品中 HBV-DNA 靶序列进行检测的方法，所述方法包括：任选使所述样品经受逆转录条件以从 HBV-mRNA 产生
5 单链或双链 cDNA 分子；使样品经受变性条件以产生对应于所述靶序列的单链 DNA 分子；使该变性样品与一套引物接触，所述引物套含有至少两种引物，其中至少一种引物能与所述靶序列的一条 DNA 链杂交，其中至少一种其它的引物能与所述第一条链的互补链杂交，其中所述引物能从它们的 3' 末端延伸，形成与每种所述引物所杂交的链互补的延伸产物；使样品经
10 受有利于扩增的条件，产生含有互补延伸产物的扩增产物；然后检测扩增产物的存在，其中所述扩增产物的存在指示所述 HBV-DNA 靶序列的存在。

本发明的另一方面是：提供对样品中 HBV-DNA 靶序列进行检测的方法，所述方法包括：任选使所述样品经受逆转录条件以从 HBV-mRNA 产生
15 单链或双链 cDNA 分子；使样品经受变性条件以产生对应于所述靶序列的单链 DNA 分子；使该变性样品与一套引物接触，所述引物套含有至少两种引物，其中至少一种引物能与所述靶序列的一条 DNA 链杂交，其中至少一种其它的引物能与所述第一条链的互补链杂交，其中所述引物能从它们的 3' 末端延伸，形成与每种所述引物所杂交的链互补的延伸产物，其中一种
20 所述引物被能给出可鉴定信号的报道分子标记，其它所述引物被可捕获的组分标记；使样品经受有利于扩增的条件，产生含有互补延伸产物的扩增产物，所述扩增产物的一条链上具有能提供可鉴定信号的报道分子，另一条链上具有可被固体支持物捕获的组分；经由其可捕获的组分使扩增产物固定；然后筛选可测信号，其中信号的存在指示扩增产物的存在，即
HBV-DNA 靶序列的存在。

25 本发明的另一方面是：提供对样品中 HBV-DNA 靶序列进行检测的方法，所述方法包括：将所述样品导入反应管中，所述反应管具有一种固定于固体支持物上的引物，和第二种位于溶液相中的引物，其中这两种引物都能与 HBV 基因组中保守区域之内，其邻侧或邻近区中 HBV-DNA 单链上的互补核苷酸序列杂交，其中溶液相引物被能给出可鉴定信号的报道分子
30 标记；使反应管经受有利于扩增的条件；然后检测可鉴定信号的存在，其中所述信号的存在指示 HBV-DNA 的存在。

本发明的另一方面涉及从相同或不同 HBV 毒株或变体中检测一种或

多种 HBV-DNA 靶序列的方法,所述方法包括:使据推测含有单链形式的 HBV-衍生 DNA 的样品与两种或多种引物接触,所述引物单独地,或以阵列的形式固定于反应管中的固体支持物上,其中反应管另外还含有溶液相引物,该引物具有固定于固体支持物上的配对物,其中固定化的引物及其溶液相的配对引物均能在扩增条件下扩增 HBV-DNA 区域,其中溶液相引物携有能给出可鉴定信号的报道分子,使得固体支持物上确定位置处信号的存在能鉴定特定的 HBV 分离株或变体。

本发明的另一方面提供了固定于固体支持物的两种或多种寡核苷酸引物一个阵列,所述引物能与 HBV-DNA 的互补核苷酸序列杂交。

本发明的另一方面提供了含有寡核苷酸阵列的基质的用途,所述寡核苷酸由式 $a_1a_2...a_n$ 定义,它在基质上的坐标为 $(x_1y_1), (x_2y_2)...(x_ny_n)$,其中 $a_1a_2...a_n$ 表示相同或不同的寡核苷酸,总共为 n 个寡核苷酸,每个寡核苷酸可由方格坐标 $(x_1y_1), (x_2y_2)...(x_ny_n)$ 确定,其中寡核苷酸具有由 $b_1b_2...b_n$ 定义的扩增配对物,从而使寡核苷酸 $a_1b_1, a_2b_2...a_nb_n$ 能与 HBV-DNA 的互补链杂交,其中间插的 DNA 含有在两种或多种 HBV 变体(如 HBsAg 变体)之间保守的核苷酸序列,其中所述基质可用于检测特定的 HBV 因子,所述因子的特征在于携有所述 HBV-衍生 DNA 的保守扩增区域。

附图说明

图 1 图解显示了 HBV 表面抗原的结构组织。(A)覆盖保守“a”决定簇的主要亲水环的定位(改编自 Chen 等(7))。显示了以氨基酸残基表示的全长 HBsAg 的大小(1-400)。盒形图下方示出了前 S1(1-118),前 S2(119-174)和主要 HBsAg(175-400)的位置。图中还显示了主要亲水环相对于全长 HBsAg 的位置。主要 HBsAg(SHBsAg)内的主要亲水环的相应位置为从氨基酸 100 至 160,SHBsAg 内保守的“a”决定簇的相应位置为从氨基酸 124 至 147。(B)SHBsAg 编码区的基因组位置。盒形图下方示出了编码区 5'-和 3'-末端的位置(分别为 HBV 基因组核苷酸的 156 和 835 位,第 1 位被定义为 GenBank 登记号为 Z35717 的野生型 HBV EcoRI 位点 - GAATTC(<400>3)的第一个 A 核苷酸。盒形图下方还示出了本发明提供的引物寡核苷酸(<400>1 和 <400>2)的位置(分别从 HBV 基因组的核苷酸第 456 位和 689 位开始)。如盒形图下方所示,利用本发明的引物寡核苷酸(<400>1 和 <400>2)经 PCR 扩增产生的 DNA 片段大小为 233 个碱基对(bp)。

图 2 用照片显示了使用本发明提供的引物寡核苷酸(<400>1 和 <400>2),

PCR-扩增受试样品得到的 HBV 片段的电泳模式, 所述样品经免疫诊断试剂盒测定为 HBsAg 阴性, 抗-HBc 和抗-HBs 阳性。泳道 4 示出分子量标志(100bp 序列梯, MBI Fermentas)的迁移位置。泳道 1 对应于表 1 中的第一个受试样品; 泳道 2 对应于表 1 中的第二个受试样品。泳道 6 和 9 分别对应于表 1 中的第三个和第四个受试样品。泳道 3, 5, 7 和 8 中未见扩增产物, 这些泳道代表呈现类似病毒标记的受试样品(即 HBsAg 阴性, 抗-HBc 和抗-HBs 阳性)。

5 优选实施方案详述

本发明部分基于 HBV 变体中保守核苷酸序列的鉴定, 以及所述序列用于开发扩增引物以对 HBV 进行诊断分析的用途。

10 为了阐明本发明, 下文给出了几个术语的定义。

“扩增混合物”指水溶液, 其中含有扩增靶病毒核酸序列所需的多种试剂。所述试剂包括: 酶, 含水缓冲液, 盐, 靶核酸和脱氧核苷三磷酸。

“扩增系统”指用于扩增核酸靶序列拷贝数的任何体外工具。

“扩增试剂”指扩增所需的多种缓冲液, 酶, 引物和脱氧核苷三磷酸。

15 “核酸”指单链或双链形式的核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸聚合物。

“聚合酶”指能催化由核苷三磷酸前体合成 DNA 的酶。在本发明的 PCR 扩增中, 聚合酶优选需要模板, 具有热稳定性, 且一般在被延长的 DNA 聚合物的 3'-末端添加核苷酸。

“寡核苷酸”指由两或多个核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸组成的分子。

20 “引物”指天然或合成的寡核苷酸, 它能在诱导合成引物延伸产物的条件下用作 DNA 合成的起点, 所述延伸产物与靶核酸链互补。这些条件包括溶于适当缓冲液中, 且处于适当温度下的 4 种不同的核苷三磷酸和聚合酶。优选引物是单链寡脱氧核苷酸。引物的适当长度取决于使用引物的目的和条件(包括靶核酸的序列保守性, PCR 循环条件和引物的组成)。

25 本发明提供了对样品中 HBV-核酸靶序列进行检测的方法, 所述方法包括: 使样品经受变性条件以产生单链形式的所述靶序列; 使该变性样品与一套引物接触, 所述引物套含有至少两种引物, 其中至少一种引物能与所述靶序列的一条链杂交, 其中至少一种其它的引物能与所述第一条链的互补链杂交, 其中所述引物能从它们的 3' 末端延伸, 形成与每种所述引物所杂交的链互补的延伸产物; 使样品经受有利于扩增的条件, 产生含有互补延伸产物的扩增产物; 然后检测扩增产物的存在, 其中所述扩增产物的存在指示所述 HBV-核酸靶序列的存在。

30

在一个实施方案中，靶序列对应于 HBV 基因组上的区域，该区域在各种 HBV 变体，特别是具有经改变的 HBsAg 的 HBV 变体之间是保守的。经改变的 HBsAg 可含有单个或多个氨基酸取代，缺失和/或添加，它们是由在编码 HBsAg 的核苷酸序列中取代，缺失和/或添加单个或多个核苷酸引起的。有人提出尽管 HBsAg 已经有免疫学变化，但 HBV 基因组中的保守区域，特别是编码 HBsAg 的核苷酸序列中的保守区域仍保持相对稳定。因此，本发明认为：用基于免疫的 HBsAg 测定法无法检测的 HBV 变体仍能通过 HBsAg 基因中的保守区域来检测。然而，本发明可延伸至使用本发明的方法鉴定 HBV 基因组的可变区，如导致(例如在 HBsAg 上)经修饰的表位或新表位的那些可变区。

HBsAg 变体也包括其它重叠基因，如 DNA 聚合酶的变体。

本发明的这些和其它方面并不受诸如“编码...的核酸分子”，“编码...的核苷酸序列”和“编码...的基因序列”等术语中所含术语“基因”的限制。

术语“基因”以其最广义的概念被使用，它包括对应于基因外显子的 cDNA。因此，本文所述的“基因”包括：

(i)经典的基因组基因，它由转录和/或翻译调节序列和/或编码区和/或非-翻译序列(即内含子，5' -和 3' -非翻译序列)组成；或

(ii)对应于基因编码区(即外显子)和 5' -和 3' -非翻译序列的 mRNA 或 cDNA。

术语“基因”也用于描述编码所有或部分表达产物的合成的或融合分子。在特定的实施方案中，术语“核酸分子”和“基因”可以互换使用。

因此，本发明的另一方面提供了检测样品中 HBV-核酸靶序列的方法，所述方法包括：使样品经受变性条件以产生单链形式的所述靶序列；使该变性样品与一套引物接触，所述引物套含有至少两种引物，其中至少一种引物能与所述靶序列的一条链杂交，其中至少一种其它的引物能与所述第一条链的互补链杂交，其中所述引物能从它们的 3' 末端延伸，形成与每种所述引物所杂交的链互补的延伸产物，选择与特定区域杂交的引物，所述区域对应于或侧翼于编码 HBsAg 的完整或部分核苷酸序列内的保守核苷酸序列；使样品经受有利于扩增的条件，产生含有互补延伸产物的扩增产物；然后检测扩增产物的存在，其中所述扩增产物的存在指示所述 HBV-核酸靶序列的存在。

样品一般是，但也不只是含有组织或组织提取物，流体如血液等，或排泄物，或任何可能含有 HBV 颗粒或 HBV DNA，mRNA 或 RNA 复制中间体之材料的其它生物样品。因此，第一步一般包括从哺乳动物受试者(在优选实施方案中，包括人受试者)分离样品。样品也可以是环境样品或得自潜在 HBV 污染源的样品。

5 尽管本发明特别地涉及“逃避”型 HBV 变体，即基本上不再与抗至少一种 HBsAg 形式的抗体相互作用的变体，但本发明进一步延及 HBV 基因组的任何区域，所述区域在 HBV 变体，特别是临床相关的 HBV 变体之间是保守的，并可用作有用的靶序列。HBV 基因组上特别有用的区域是编码新的表位或 HBsAg 的区域。这种区域可用于产生诊断所用的重组肽。

10 因此，本发明提供了通过检测 HBV-核酸序列来检测 HBV 的方法。“HBV-”核酸序列包括 HBV 基因组自身，其单链 DNA 形式，RNA 复制中间体以及使用逆转录酶制备的 cDNA 单链或双链分子。关于后者，可对得自 HBV-核苷酸序列的 mRNA 进行逆转录以产生互补 DNA 链。然后对所述 DNA 链和/或其 DNA 互补物进行扩增反应。检测出 RNA 复制中间体和/或对应于 HBV-mRNA 的 cDNA 也是活性病毒复制的指征。

20 在实施本发明时，可以使用任何形式的扩增反应，包括但不限于聚合酶链反应(PCR)，连接链反应，基于核酸序列的扩增，基于 Q 复制酶的扩增，链置换法，滚环扩增和再循环等位基因-特异性引物延伸。然而，优选使用 PCR。

25 因此，本发明的另一方面提供了检测样品中 HBV-DNA 靶序列的方法，所述方法包括：任选使所述样品经受逆转录条件以从 HBV-mRNA 产生单链或双链 cDNA 分子；使样品经受变性条件以产生对应于所述靶序列的单链 DNA 分子；使该变性样品与一套引物接触，所述引物套含有至少两种引物，其中至少一种引物能与所述靶序列的一条 DNA 链杂交，其中至少一种其它的引物能与所述第一条链的互补链杂交，其中所述引物能从它们的 3' 末端延伸，形成与每种所述引物所杂交的链互补的延伸产物；使样品经受有利于扩增的条件，产生含有互补延伸产物的扩增产物；然后检测扩增产物的存在，其中所述扩增产物的存在指示所述 HBV-DNA 靶序列的存在。

30 在特别优选的实施方案中，在编码 HBsAg 的核苷酸序列内选择引物。最优选引物是<400>1[有义引物]和<400>2[反义引物]。本发明还延及与

<400>1 或<400>2 具有至少约 70%相似性的寡核苷酸引物，以及能在低严谨条件下与<400>1 或<400>2 或它们的互补物杂交的引物。

本文所用术语“相似性”包括相比较的序列之间在核苷酸水平上的精确的同一性。当在核苷酸水平上无同一性时，“相似性”包括序列之间的差异，
5 这些差异导致相互不同但在结构，功能，生物化学和/或构象水平上彼此相关的氨基酸。在特别优选的实施方案中，在同一性而不是相似性水平上进行核苷酸序列比较。

用于描述两个或多个多核苷酸或多肽之间的序列关系的术语包括：“参照序列”，“比较窗”，“序列相似性”，“序列同一性”，“序列相似性的百分比”，“序列同一性的百分比”，“基本上相似”和“基本上相同”。“参照序列”包括核苷酸和氨基酸残基，其长度至少为 12 个，但经常至少为 15 至 18
10 个单体单位，经常至少为 25 个，或更多个，如 30 个单体单位。由于两个多核苷酸各含有(1)两个多核苷酸之间相似的序列(即仅为完整多核苷酸序列的一部分)，和(2)两个多核苷酸之间不同的序列，因此两个(或多个)多核苷酸之间的序列比较一般是通过在“比较窗”范围内比较两个多核苷酸的序列，来
15 鉴定和比较局部区域的序列相似性。“比较窗”指与参照序列相比较的，一般为 12 个邻接残基的概念区段。为了使两个序列的对比最佳化，与(不含添加或缺失的)参照序列相比，比较窗可含有约 20%或更少的添加或缺失(即缺口)。可通过用计算机运行的算法(Wisconsin Genetics Software Package
20 Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, USA 中的 GAP, BESTFIT, FASTA 和 TFASTA)，或通过检查和由选定的多种方法中的任一种产生的最佳序列对比(即导致比较窗范围内同源性百分比最高)，来进行比较对比窗中的最佳序列对比。也可参考 BLAST 家族的程序，例如 Altschul 等所公开的程序(8)。有关序列分析的详细讨论可参见 Altschul 等，
25 19.3 单元(9)。

本文所用术语“序列相似性”和“序列同一性”指在比较窗范围内，序列在一个接一个的核苷酸的基础上相同或功能或结构相似的程度。因此，例如，可通过在比较窗范围内比较两个最佳对比的序列，测定在两个序列中出现相同核酸碱基(如 A, T, C, G, I)的位置的数量以产生匹配位置的数量，用匹
30 配位置数除以比较窗内的位置总数(即比较窗大小)，将结果乘以 100 产生序列同一性的百分比，从而计算出“序列同一性的百分比”。为了本发明的目

的，应理解“序列同一性”指通过 DNASIS 计算机程序(对 Windows 而言为版本 2.5；可得自 Hitachi Software 工程有限公司，South San Francisco, California, USA)计算出的“匹配百分比”，所述程序中使用了软件所附参考手册中所用的标准缺省值。关于序列相似性的内容与上述序列同一性的内容相似。

5 本文所述的低严谨度包括和包含杂交所用的从至少约 0 至至少约 15% v/v 甲酰胺，和从至少约 1M 至至少约 2M 盐，和洗涤条件所用的至少约 1M 至至少约 2M 盐。通常，低严谨度是从约 25-30℃ 至约 42℃。温度可以改变，可使用较高的温度替代甲酰胺和/或给出另一种严谨条件。必要时可使用另一种严谨条件，例如中度严谨条件，其包括和包含杂交所用的从至少约 16% v/v 至至少约 30% v/v 甲酰胺，和从至少约 0.5M 至至少约 0.9M 盐，和洗涤条件所用的至少约 0.5M 至至少约 0.9M 盐，或者高严谨条件，其包括和包含杂交所用的从至少约 31% v/v 至至少约 50% v/v 甲酰胺，和从至少约 0.01M 至至少约 0.15M 盐，和洗涤条件所用的至少约 0.01M 至至少约 0.15M 盐。通常，

10 在 $T_m = 69.3 + 0.41(G+C)\%$ 时进行洗涤(10)。然而，双链体 DNA 的 T_m 每降低 1℃，错配碱基对的数目将会增加 1% (11)。在这些杂交条件中，甲酰胺是任选的。因此，特别优选的严谨水平的定义如下：低严谨度是 $6 \times$ SSC 缓冲液，0.1% w/v SDS，25-42℃；中严谨度是 $2 \times$ SSC 缓冲液，0.1% w/v SDS，温度范围为 20℃-65℃；高严谨度是 $0.1 \times$ SSC 缓冲液，0.1% w/v SDS，温度至少

15 20 为 65℃。

本文所述的“引物”在结构，大小或功能上不受任何限制。引物可用作扩增分子，或可用作杂交所用的探针。此分子的优选形式是作为扩增所用的核酸引物。

25 本文所述的“核酸引物”包括含有至少 3 个核苷酸的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸序列。通常，核酸引物含有约 3 个至约 100 个核苷酸，优选为约 5 个至约 50 个核苷酸，甚至更优选为约 5 个至约 25 个核苷酸。本文将含有少于 50 个核苷酸的引物称为“寡核苷酸引物”。可通过例如逐步添加核苷酸来合成本发明的引物，或者，所述引物可以是其它核苷酸分子的片段，部分或延伸产物。术语“引物”以最普通的含义被使用，它包括任何长度的核苷酸，当用于扩增目的时，可提供游离的 3' 羟基以便由 DNA 聚合酶起始 DNA

30 合成。DNA 合成导致引物延伸，产生引物延伸产物，其与引物所杂交的核酸

链互补。

本文所用术语“扩增”的定义中包括杂交的引物延伸产生延伸产物。扩增一般在依次为变性，引物杂交和延伸的循环中发生。本发明包含约1个循环至约120个循环，优选为约2个至约70个循环，甚至更优选为约5个至约40个循环，包括约10, 15, 20, 25和30个循环。

可通过任何便利的方法检测扩增产物(也被称为扩增子)。在一个实施方案中，通过电泳分离扩增产物，进行溴化乙锭染色之后使用例如紫外线观察结果。或者，使用多种形式的层析，如HPLC或光谱学，如MALDI-TOF和质谱分析法分辨扩增产物。或者使用经报道分子标记的引物。关于后者，可以用报道分子标记其中一个引物，而用捕获组分标记其它引物以将扩增子锚着在固体支持物上，然后经由报道分子的信号鉴定扩增子。可以用扩增所用的一套引物，或者用第二套嵌套引物实施此实施方案。然而，在优选的实施方案中，仅使用一套引物以使试验为单步骤扩增试验。

因此，本发明的另一方面提供了检测样品中HBV-DNA靶序列的方法，所述方法包括：任选使所述样品经受逆转录条件以从HBV-mRNA产生单链或双链cDNA分子；使样品经受变性条件以产生对应于所述靶序列的单链DNA分子；使该变性样品与一套引物接触，所述引物套含有至少两种引物，其中至少一种引物能与所述靶序列的一条DNA链杂交，其中至少一种其它的引物能与所述第一条链的互补链杂交，其中所述引物能从它们的3'末端延伸，形成与每种所述引物所杂交的链互补的延伸产物，其中一种所述引物被能给出可鉴定信号的报道分子标记，其它所述引物被可捕获的组分标记；使样品经受有利于扩增的条件，产生含有互补延伸产物的扩增产物，所述扩增产物的一条链上具有能提供可鉴定信号的报道分子，另一条链上具有可被固体支持物捕获的组分；经其可捕获的组分固定化扩增产物；然后筛选可测信号，其中该信号的存在指示扩增产物的存在，即HBV-DNA靶序列的存在。

上述试验的多种变化对本领域技术人员而言是显而易见的。例如，可在具有捕获分子的试管或微滴孔中进行扩增反应，所述捕获分子被固定于试管壁或孔壁上。捕获分子可以是例如能杂交和捕获扩增子内核苷酸序列的引物，或与其中一个引物的可捕获组分上的捕获分子互补的核苷酸序列。或者，捕获分子可以是能特异性识别其中一个引物的可捕获组分的DNA结合

蛋白。捕获分子也可参与扩增反应。

可通过任何便利的方法将捕获分子固定于固相。固相可以是任何结构，其表面可被衍生化以锚着核酸引物或其它捕获分子。优选固相为平面材料，例如微滴孔的侧壁或探头(dipstick)的侧壁。

- 5 本文所希望的固体支持物一般是玻璃或聚合物，例如但不限于纤维素，陶瓷材料，硝酸纤维素，聚丙烯酰胺，尼龙，聚苯乙烯及其衍生物，聚偏二氟乙烯(PVDF)，异丁烯酸酯及其衍生物，聚氯乙烯或聚丙烯。硝酸纤维素特别有用。固体支持物也可以是混合体，例如由玻璃或聚合物基质支持的硝酸纤维素膜。“混合体”包括上述两种或多种玻璃或聚合物表面的分层排列。
- 10 固体支持物也可以采取以下形式：膜或管，珠，盘或微型平板，探头，微滴盘的孔或任何其它适用于所述分析试验的表面。

在一个实施方案中，锚着的核酸通过杂交捕获靶核酸分子，并任选参与扩增反应。或者，锚着的核酸分子捕获扩增的核酸分子。

- 15 使核酸分子与固体支持物相连的方法是本领域众所周知的。使引物与固体支持物相连的方法包括酰胺连接，酰胺化物连接，硫醚连接和在固相上导入氨基。与固相连接的例子可参见国际专利申请 PCT/AU92/00587[WO 93/09250]。

- 20 锚着引物可以与溶液相引物一起参与扩增反应。或者，将“通用(generic)”引物锚着于固体支持物以扩增含有靶序列的核酸分子。然后通过溶液相引物进行靶序列的特异性扩增。

可使用能提供可测信号的一系列标记。标记可以与特定的核酸分子或核苷酸相连接，或者可以与中间体结合，所述中间体随后可以与核酸分子或核苷酸结合。

- 25 标记可以选自：色素原，催化剂，酶，荧光团，发光分子，化学发光分子，镧系元素的离子(如铕(Eu^{3+}))，放射性同位素和肉眼直接可见的标记。关于肉眼直接可见的标记，可以使用胶体金属或非-金属颗粒，染料颗粒，酶或底物，有机聚合物，乳胶颗粒，脂质体，或其它含有能产生信号之物质的载体等等。适于用作标记的多种酶公开于美国专利 4366241, 4843000 和 4849338。可用于本发明的适当酶标记包括碱性磷酸酶，辣根过氧化物酶，30 萤光素酶，半乳糖苷酶，葡萄糖氧化酶，溶菌酶，苹果酸脱氢酶等。酶标记可以单独使用，或者与溶液中的第二种酶联合使用。另外，可用作本发明中

的适当标记的荧光团包括但不限于荧光素，罗丹明，德克萨斯红，萤光黄或R-藻红蛋白。

5 在另一实施方案中，其中一个引物锚着于固体支持物，如管壁或微滴孔的壁上，其它引物位于溶液相中。一般用报道分子标记溶液相引物。扩增反应之后，可测信号的存在表示扩增子的存在。

因此，本发明的另一方面提供了检测样品中 HBV-DNA 靶序列的方法，所述方法包括：将所述样品导入反应管中，所述反应管具有一种固定于固体支持物上的引物，和第二种位于溶液相中的引物，其中这两种引物都能与 HBV 基因组中保守区域之内，其邻侧或邻近区中 HBV-DNA 单链上的互补核苷酸序列杂交，其中溶液相引物被能给出可鉴定信号的报道分子标记；使反应管经受有利于扩增的条件；然后检测可鉴定信号的存在，其中所述信号的存在指示 HBV-DNA 的存在。

10

在另一实施方案中，本发明利用了针对 HBV 基因组不同区域的引物列阵，例如针对 HBV 基因组中的保守区域或保守区域和可变区域的引物列阵。这对“定型”HBV 或鉴定 HBV 可变区特别有用。在一个有用的实施方案中，将针对 HBV 基因组的多个引物固定于固体支持物，例如微型芯片，反应管壁，探头，载玻片或其它基质上。一般在具有特定坐标的列阵中安置引物以鉴定引物。然而，术语“列阵”并不暗指任何特定的次序，“列阵”也可包括整个模式中的随机点。

15

在任何事件中，每个固定化的引物一般都具有第二个溶液相引物，以使 HBV 基因组的特定区域能被靶向扩增。溶液相引物一般携有能给出可鉴定信号的报道分子。通过扩增，利用列阵中确定位置处信号的存在来定型特定的 HBV。

20

因此，本发明的另一方面涉及从相同或不同 HBV 毒株或变体中检测一种或多种 HBV-DNA 靶序列的方法，所述方法包括：使据推测含有单链形式的 HBV-衍生 DNA 的样品与两种或多种引物接触，所述引物单独地，或以列阵的形式固定于反应管中的固体支持物上，其中反应管另外还含有溶液相引物，这些引物具有固定于固体支持物上的配对物，其中固定化的引物及其溶液相的配对引物能在扩增条件下扩增 HBV-DNA 区域，其中溶液相引物携有能给出可鉴定信号的报道分子，使得固体支持物上确定位置处信号的存在能鉴定特定的 HBV 分离株或变体。

25

30

如上所述, 优选引物如<400>1 和<400>2 所示, 或者为与<400>1 或<400>2 具有至少约 70%相似性的引物, 以及能在低严谨条件下与<400>1 或<400>2 或它们的互补物杂交的引物。优选通过化学合成制备这些引物, 然而, 也可以以核酸分子片段(包括但不限于限制性片段)的形式制备引物。可
5 根据已知 HBV 毒株的序列对比结果方便地选择引物, 所述 HBV 毒株包括变体, 如在 HBsAg 的主要亲水环中携有突变的变体。当经证实约有 20 个邻接的核苷酸是保守的时, 可选择这些核苷酸作为 HBV 基因组保守区域的候选引物。

因此, 本发明的另一方面提供了固定于固体支持物上的两个或多个寡核苷酸引物的一个列阵, 所述引物能与 HBV-DNA 的互补核苷酸序列杂交。
10

与引物杂交的区域优选位于或邻近于在两个或多个 HBsAg 变体中保守的, 长度为约 10 至约 50 个核苷酸的核苷酸序列。

优选的列阵形式是生物芯片或其它微型-基质, 微滴孔的壁, 载玻片, 探头或其它适当的基质。

列阵也适于通过计算机程序进行分析, 所述程序能检测提供可测信号的固定化扩增子的存在。
15

因此, 本发明的另一方面提供了借助于计算机程序的, 用于检测或鉴定 HBV-核酸序列的方法, 所述方法包括:

(i)使用一套引物进行扩增反应的方法, 所述的一套引物含有至少两种引物, 其中至少一种引物能与靶序列的一条链杂交, 其中至少一种其它的引物能与所述第一条链的互补链杂交; 和
20

(ii)记录可鉴定信号之存在的数据处理方法。

本发明的另一方面提供了含有寡核苷酸列阵的基质的用途, 所述寡核苷酸由式 $a_1a_2...a_n$ 定义, 它在基质上的坐标为 $(x_1y_1), (x_2y_2)...(x_ny_n)$, 其中 $a_1a_2...a_n$ 表示相同或不同的寡核苷酸, 总共为 n 个寡核苷酸, 每个寡核苷酸可由方格坐标 $(x_1y_1), (x_2y_2)...(x_ny_n)$ 确定, 其中寡核苷酸具有由 $b_1b_2...b_n$ 定义的扩增配对物, 从而使寡核苷酸 $a_1b_1, a_2b_2...a_nb_n$ 能与 HBV-DNA 的互补链杂交, 其中间插的 DNA 含有在两种或多种 HBV 变体(如 HBsAg 变体)之间保守的核苷酸序列, 其中所述基质可用于检测特定的 HBV 因子, 所述因子的特征在于携有
25
30 HBV 基因组的所述保守扩增区域。

本发明的引物寡核苷酸在扩增反应中使用, 所述扩增反应如 PCR 扩增

靶 HBV 核酸。尽管扩增方法是本领域众所周知的，但为了更清楚表达，下文将着重说明本发明所用 PCR 方法的一些一般信息。

5 为了扩增受试样品中的靶 HBV 核酸序列，需要使该序列与扩增系统的组分接触。这可通过在 PCR 扩增之前，从所述样品中分离出 HBV 靶核酸而实现。从生物样品中提取核酸分子的技术是较成熟的，且被广泛使用的技术(12)。

10 每个 PCR 扩增循环的第一步包括通过例如在适当温度，如 95℃ 加热样品来分离 HBV 核酸双链体。一旦分离出链，PCR 的下一步包括使分离的链与侧翼于靶序列的引物杂交。然后延伸引物以形成靶链的互补拷贝。为了进行 PCR 扩增，设计引物，以使每个引物沿着双链体序列杂交的位置能够使由一个引物合成的延伸产物当与模板分开时能用作另一引物延伸的模板。将变性，杂交和延伸的循环重复 1 至约 120 个循环，但一般重复约 35 个循环以使在 PCR 扩增过程中导入扩增产物中的突变数目最小化。

15 在含有适当的盐，金属阳离子和 pH 缓冲系统的反应介质中，在足量的 4 种脱氧核糖核苷三磷酸(一般为 dATP, dGTP, dCTP 和 dTTP)的存在下，通过聚合剂催化 PCR 扩增中依赖于模板的引物延伸。适当的聚合剂是已知能催化依赖于模板的 DNA 合成的酶。所述酶包括 Taq 聚合酶，分离自水生栖热菌(*Thermus aquaticus*)的热-稳定性 DNA 聚合酶，和高保真性的 Pfu 聚合酶。后一种酶被广泛用于高精度度扩增。通常，使用热稳定性酶自动进行 PCR 扩
20 增。在此方法中，反应混合物的温度经变性期，引物退火期和延伸反应期而循环。

25 进行实验测量以免其它反应和非-特异性扩增所得的经扩增核酸污染 PCR 扩增。为了避免被其它反应污染，在 260nm 下用 UV 照射每种反应混合物 5 分钟，所述混合物含有适当的盐，金属阳离子和 pH 缓冲系统，足量的 4 种脱氧核糖核苷三磷酸(一般为 dATP, dGTP, dCTP 和 dTTP)，DNA 聚合酶和引物寡核苷酸，但不含分离自生物样品的病毒靶核酸。这种处理消除了预-扩增的反应混合物中所有潜在的双链 DNA 分子，而保留了单链引物寡核苷酸和完整反应混合物中的其它上述组分。另一方面，对经扩增的病毒核酸所作的测序分析不仅可消除非-特异性扩增的污染，也可测定扩增产物的特性，
30 特别是主要亲水环上潜在的突变，所述突变导致使用目前基于免疫的诊断分析试验检测不到所述病毒。

因此,本发明包括新的 HBV 变体,例如根据本发明的方法鉴定的变体。

因此,本发明的另一方面提供了 HBV 变体,通常是分离形式的 HBV 变体,通过 HBV-核酸靶序列的检测方法可鉴定所述 HBV 变体,所述方法包括:使样品经受变性条件以产生单链形式的所述靶序列;使该变性样品与一套引物接触,所述引物套含有至少两种引物,其中至少一种引物能与所述靶序列的一条链杂交,其中至少一种其它的引物能与所述第一条链的互补链杂交,其中所述引物能从它们的 3' 末端延伸,形成与每种所述引物所杂交的链互补的延伸产物;使样品经受有利于扩增的条件,产生含有互补延伸产物的扩增产物;然后检测扩增产物的存在,其中所述扩增产物的存在指示所述 HBV-核酸靶序列的存在;然后分离检测到的所述 HBV。

本发明的另一方面提供了鉴定表达产物的方法,所述表达产物包括例如可用作免疫标记和/或用于产生诊断和/或治疗所用的免疫球蛋白的肽,多肽或蛋白质。

通过本发明鉴定的 HBV 的核苷酸序列可用于多种重组表达系统。所述核苷酸序列可以是保守的或是可变的。后者的例子是 HBsAg 上经修饰的或新的表位。所述表达系统能充分表达所需基因,特别是编码 HBsAg 的基因或其变体。在原核和/或真核宿主中重组表达核苷酸序列是较成熟的技术,这些经表达的蛋白质可用于产生特异于特定 HBsAg 的免疫球蛋白。然后可将所述免疫球蛋白用于试验中以检测病毒的存在。蛋白质也可用于检测感染 HBV 的患者体内是否存在抗体。

一般将所需病毒序列插入适当载体,然后使用标准技术转化/转染哺乳动物,酵母或昆虫细胞系以进行表达。优选在中间克隆步骤中使用原核生物,但原核生物可有效地用于所需病毒序列的高水平诱导型表达。

对将经改变的遗传物质导入宿主细胞以表达病毒序列所用的特定方法没有特别严格的要求。可以使用任何众所周知的将外源核苷酸序列导入宿主细胞的方法。这些方法包括使用磷酸钙转染,电穿孔,脂质体,质粒载体,病毒载体的方法,和任何导入克隆的病毒 DNA,特别是导入由本发明从受试样品中鉴定出的病毒 DNA 的其它成熟方法,所述样品显示或未显示出病毒标记,所述病毒标记可以或不能被基于免疫的诊断试验检测到。

对将遗传信息运送至细胞所用的特定载体没有特别严格的要求。可以使用任何常规的用于在真核细胞中表达重组蛋白的载体。

表达载体含有真核转录单位或表达盒，其中含有在真核细胞中表达病毒核酸序列所需的所有元件。典型的表达盒含有与编码病毒蛋白的 DNA 序列可操作相连的启动子，和使转录的 mRNA 有效聚腺苷酸化所需的信号。

5 本发明的表达载体一般含有便于将载体克隆至细菌(如大肠杆菌)的原核序列，以及一个或多个仅在真核细胞，如哺乳动物细胞中表达的真核转录单位。载体可以含有或不含真核复制子。如果存在复制子，使用适当的选择标记就可以在真核细胞中复制载体。如果载体不含有真核复制子，就无法进行附加型扩增。在这种条件下，转染的 DNA 整合至宿主细胞基因组，由表达载体上共整合的哺乳动物启动子驱动病毒基因的表达。

10 表达载体导入细胞之后，在有利于表达病毒蛋白的条件下培养经转染的细胞，使用标准技术从培养物中纯化蛋白质。可以使用多种用于纯化蛋白质的标准方法，例如亲和层析，大小排阻层析和离子交换层析。

除了使用由所需病毒基因组编码的蛋白质外，也可以使用模拟病毒特异性表位的肽来产生病毒特异性抗体。

15 然后，使用标准方法，用上述纯化的多肽或合成肽产生抗体。免疫球蛋白有多种用途。例如，可用于检测受试样品中病毒的存在，或者利用例如亲和层析来纯化病毒抗原。也可用于中和相应的病毒蛋白，包括抑制完整病毒的感染性。因此，可以容易地使用多种用于产生和操作各种免疫球蛋白的技术，来产生可用于诊断和检测受试样品中的特定 HBV 毒株的分子，所述样品
20 品显示或未显示出病毒标记，所述病毒标记可以或不能被基于免疫的诊断试验检测到。

可通过多种方法产生能与目标 HBV 毒株的特异性表位结合的抗体。非-人单克隆抗体(如鼠)的产生是众所周知的，通过用含有病毒或其片段的制品免疫动物即可实现此目的。使得自经免疫动物的抗体生产细胞无限增殖化，
25 并使用标准技术筛选所述细胞。

然后，可在多种诊断试验中使用按上述方法产生的免疫球蛋白，所述试验能检测受试样品中 HBV 毒株的存在，所述样品显示或未显示出病毒标记，所述病毒标记可以或不能被基于免疫的诊断试验检测到。例如，可在包括下列步骤的试验中使用经标记的免疫球蛋白，所述步骤是：使免疫球蛋白与怀疑含有 HBV 毒株的受试样品接触，所述样品显示或未显示出病毒标记，所
30 述病毒标记可以或不能被基于免疫的诊断试验检测到；检测是否形成复合

物。可以使用多种标记与免疫球蛋白偶联。常用的检测方法是使用 ^{125}I 或 ^{35}S 进行放射自显影。也可使用非放射性的标记。这类标记包括化学发光剂和酶。这些非放射性的标记经常通过间接的方式结合。通常，配体分子(如生物素)与所述分子共价结合。然后，配体与抗-配体(如链霉抗生物素蛋白)分子结合，所述抗配体分子要么本来就是可测的，要么与信号系统，如可测的酶，荧光化合物或化学发光化合物共价结合。

所述分子也可以通过与酶偶联而直接与产生信号的化合物偶联。可用作标记的目的酶是磷酸酶或过氧化物酶。

为了检测复合物的存在，应将混合物与能结合免疫球蛋白 Fc 区域的蛋白质接触，所述蛋白质如第二抗体，A 蛋白或 G 蛋白。优选将蛋白质固定于固体表面，洗涤固体表面以除去未结合的特异于所需病毒的免疫球蛋白。可使用多种固定化生物分子的方法。例如，固体表面可以是膜(如硝酸纤维素)，微滴盘(如聚苯乙烯)或珠。所需组分可以共价结合或通过非特异性连键非-共价结合。然后使用标准技术导入标记。

重组表达并纯化的病毒蛋白或病毒裂解物也可在诊断方法中使用。这些方法一般包括接触怀疑含有抗 HBV 抗体的生物样品(如血清)，并检测免疫反应。优选使用上述标记蛋白检测所述反应。

因此，本发明的方法可用于鉴定 HBV 基因组的保守区域，所述区域对应于 HBV 蛋白质(如 HBsAg)的保守区域。所述方法也可鉴定可变区。因此，对应于所述保守区域的肽，多肽和蛋白质可用作疫苗组分和用于诊断检验。类似地，覆盖可变区的肽，多肽和蛋白质可用于针对特定 HBV 变体的特异性疫苗，或者可用作诊断试剂。

因此，本发明提供了重组或化学合成的肽，多肽和蛋白质或其衍生物，同系物或类似物，它们含有的氨基酸序列中包含两个或多个 HBV 分离株或与 HBV 野生型不同的 HBV 分离株之间保守的氨基酸序列。据认为 HBV 野生型含有源自 HBV 基因型 E 和 A 至 F 的复合物或共有的核苷酸或氨基酸序列(13)。

“衍生物”包括多肽的部分，片段，节段或区域，其中包括含有单个或多个氨基酸取代，添加和/或缺失的多肽。为了简明起见，将肽和蛋白质包含在术语“多肽”中。

本发明延伸至所述多肽的化学类似物，包括侧链具有修饰的和/或掺入了

非天然氨基酸的多肽类似物。这种经化学修饰或合成的多肽类似物能更加稳定地用作诊断试剂或用于治疗。

- 5 本发明所涉及的侧链修饰有：对氨基的修饰，如通过与醛反应再用 NaBH_4 还原而还原烷基化；用甲基乙酰亚胺(methylacetimidate)进行的脒化反应；用乙酸酐进行的酰化反应；用氰酸盐使氨基甲酰化；用 2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)使氨基三硝基苯化；用琥珀酸酐和四氢邻苯二甲酸酐使氨基酰化；和用吡哆醛-5-磷酸使赖氨酸吡哆醛化再用 NaBH_4 还原。

精氨酸残基的胍基可通过与诸如 2,3-丁二酮，苯基乙二醛和乙二醛等试剂形成杂环缩合物来修饰。

- 10 羧基可通过 O-酰基异脲的形成反应激活碳二亚胺，再衍生为例如相应的酰胺而修饰。

- 15 巯基(sulphydryl)可通过下列方法修饰，如：用碘乙酸或碘乙酰胺进行的羧甲基化；用过甲酸使半胱磺酸氧化；与其它硫醇类化合物形成混合的二硫化物；与马来酰亚胺，马来酐或其它取代的马来酰亚胺反应；使用 4-氯汞苯甲酸盐，4-氯汞苯磺酸，苯基氯化汞，2-氯汞-4-硝基苯酚和其它汞化合物形成汞化合物的衍生物；在碱性 pH 下用氰酸盐进行的甲酰化。

色氨酸残基可通过例如用 N-溴琥珀酰亚胺进行的氧化或用 2-羟基-5-硝基苄基溴化物或烃硫基卤化物使吲哚环烷基化而修饰。另一方面，酪氨酸残基可通过用四硝基甲烷进行的硝化反应形成 3-硝基酪氨酸衍生物来改变。

- 20 组氨酸残基的咪唑环可通过碘乙酸衍生物的烷基化或焦碳酸二乙酯的 N-乙酯基化来修饰。

- 25 在合成肽的过程中掺入的非天然氨基酸和衍生物的例子包括但不限于：使用正亮氨酸，4-氨基丁酸，4-氨基-3-羟基-5-苯基戊酸，6-氨基己酸，叔丁基甘氨酸，正缬氨酸，苯基甘氨酸，鸟氨酸，肌氨酸，4-氨基-3-羟基-6-甲基庚酸，2-噻吩基丙氨酸和/或氨基酸的 D-异构体。表 1 示出了本文涉及的非天然氨基酸。

表 1

非-常规氨基酸	代码	非-常规氨基酸	代码
α -氨基丁酸	Abu	L-N-甲基丙氨酸	Nmala
α -氨基--甲基丁酸酯	Mgabu	L-N-甲基精氨酸	Nmarg
氨基环丙烷羧酸酯	Cpro	L-N-甲基天冬酰胺	Nmasn

		L-N-甲基天冬氨酸	Nmasp
氨基异丁酸	Aib	L-N-甲基半胱氨酸	Nmcys
氨基降冰片基羧酸酯	Norb	L-N-甲基谷氨酰胺	Nmgln
		L-N-甲基谷氨酸	Nmglu
环己基丙氨酸	Chexa	L-N-甲基组氨酸	Nmhis
环戊基丙氨酸	Cpen	L-N-甲基异亮氨酸	Nmile
D-丙氨酸	Dal	L-N-甲基亮氨酸	Nmleu
D-精氨酸	Darg	L-N-甲基赖氨酸	Nmlys
D-天冬氨酸	Dasp	L-N-甲基甲硫氨酸	Nmmet
D-半胱氨酸	Dcys	L-N-甲基正亮氨酸	Nmnle
D-谷氨酰胺	Dgln	L-N-甲基正缬氨酸	Nmnva
D-谷氨酸	Dglu	L-N-甲基鸟氨酸	Nmorn
D-组氨酸	Dhis	L-N-甲基苯丙氨酸	Nmphe
D-异亮氨酸	Dile	L-N-甲基脯氨酸	Nmpro
D-亮氨酸	Dleu	L-N-甲基丝氨酸	Nmser
D-赖氨酸	Dlys	L-N-甲基苏氨酸	Nmthr
D-甲硫氨酸	Dmet	L-N-甲基色氨酸	Nmtrp
D-鸟氨酸	Dorn	L-N-甲基酪氨酸	Nmtyr
D-苯丙氨酸	Dphe	L-N-甲基缬氨酸	Nmval
D-脯氨酸	Dpro	L-N-甲基乙基甘氨酸	Nmetg
D-丝氨酸	Dser	L-N-甲基-叔丁基甘氨酸	Nmtbug
D-苏氨酸	Dthr	L-正亮氨酸	Nle
D-色氨酸	Dtrp	L-正缬氨酸	Nva
D-酪氨酸	Dtyr	α -甲基-氨基异丁酸酯	Maib
D-缬氨酸	Dval	α -甲基- γ -氨基丁酸酯	Mgabv
D- α -甲基丙氨酸	Dmala	α -甲基环己基丙氨酸	Mchexa
D- α -甲基精氨酸	Dmarg	α -甲基环戊基丙氨酸	Mcpen
D- α -甲基天冬酰胺	Dmasn	α -甲基- α -萘基丙氨酸	Manap
D- α -甲基天冬氨酸	Dmasp	α -甲基青霉胺	Mpen
D- α -甲基半胱氨酸	Dmcys	N-(4-氨基丁基)甘氨酸	Nglu
D- α -甲基谷氨酰胺	Dmgln	N-(2-氨基乙基)甘氨酸	Naeg
D- α -甲基组氨酸	Dmhis	N-(3-氨基丙基)甘氨酸	Norn
D- α -甲基异亮氨酸	Dmile	N-氨基- α -甲基丁酸	Nmaabu
D- α -甲基亮氨酸	Dmleu	α -萘基丙氨酸	Anap
D- α -甲基赖氨酸	Dmlys	N-苄基甘氨酸	Nphe
D- α -甲基甲硫氨酸	Dmmet	N-(2-氨甲酰基乙基)甘氨酸	Ngln

D- α -甲基鸟氨酸	Dmorn	N-(氨甲酰基甲基)甘氨酸	Nasn
D- α -甲基苯丙氨酸	Dmphe	N-(2-羧乙基)甘氨酸	Nglu
D- α -甲基脯氨酸	Dmpro	N-(羧甲基)甘氨酸	Nasp
D- α -甲基丝氨酸	Dmser	N-环丁基甘氨酸	Ncbut
D- α -甲基苏氨酸	Dmthr	N-环庚基甘氨酸	Nchep
D- α -甲基色氨酸	Dmtrp	N-环己基甘氨酸	Nchex
D- α -甲基酪氨酸	Dmty	N-环癸基甘氨酸	Ncdec
D- α -甲基缬氨酸	Dmval	N-环十二烷基甘氨酸	Ncdod
D-N-甲基丙氨酸	Dnmala	N-环辛基甘氨酸	Ncoct
D-N-甲基精氨酸	Dnmarg	N-环丙基甘氨酸	Ncpro
D-N-甲基天冬酰胺	Dnmasn	N-环十一烷基甘氨酸	Ncund
D-N-甲基天冬氨酸	Dnmasp	N-(2,2-二苯基乙基)甘氨酸	Nbhm
D-N-甲基半胱氨酸	Dnmcys	N-(3,3-二苯基丙基)甘氨酸	Nbhe
D-N-甲基谷氨酰胺	Dnmglu	N-(3-胍基丙基)甘氨酸	Narg
D-N-甲基谷氨酸	Dnmglu	N-(1-羟基乙基)甘氨酸	Nthr
D-N-甲基组氨酸	Dnmhis	N-(羟基乙基)甘氨酸	Nser
D-N-甲基异亮氨酸	Dnmile	N-(咪唑基乙基)甘氨酸	Nhis
D-N-甲基亮氨酸	Dnmleu	N-(3-吡啶基乙基)甘氨酸	Nhtrp
D-N-甲基赖氨酸	Dnmlys	N-甲基- γ -氨基丁酸酯	Nmgabu
N-甲基环己基丙氨酸	Nmchexa	D-N-甲基甲硫氨酸	Dnmmet
D-N-甲基鸟氨酸	Dnmorn	N-甲基环戊基甘氨酸	Nmcpen
N-甲基甘氨酸	Nala	D-N-甲基苯丙氨酸	Dmphe
N-甲基氨基异丁酸酯	Nmaib	D-N-甲基脯氨酸	Dmpro
N-(1-甲基丙基)甘氨酸	Nile	D-N-甲基丝氨酸	Dmser
N-(2-甲基丙基)甘氨酸	Nleu	D-N-甲基苏氨酸	Dmthr
D-N-甲基色氨酸	Dnmtrp	N-(1-甲基乙基)甘氨酸	Nval
D-N-甲基酪氨酸	Dnmtyr	N-甲基-萘基甘氨酸	Nmanap
D-N-甲基缬氨酸	Dnmval	N-甲基青霉胺	Nmpen
γ -氨基丁酸	Gabu	N-(对羟基苯基)甘氨酸	Nhtyr
L-叔丁基甘氨酸	Tbug	N-(硫代甲基)甘氨酸	Ncys
L-乙基甘氨酸	Etg	青霉胺	Pen
L-同型苯丙氨酸	Hphe	L- α -甲基丙氨酸	Mala
L- α -甲基精氨酸	Marg	L- α -甲基天冬酰胺	Masn
L- α -甲基天冬氨酸	Masp	L- α -甲基-叔丁基甘氨酸	Mtbug
L- α -甲基半胱氨酸	Mcys	L-甲基乙基甘氨酸	Metg
L- α -甲基谷氨酰胺	Mglu	L- α -甲基谷氨酸	Mglu

L- α -甲基组氨酸	Mhis	L- α -甲基同型苯丙氨酸	Mhphe
L- α -甲基异亮氨酸	Mile	N-(2-甲基硫代乙基)甘氨酸	Nmet
L- α -甲基亮氨酸	Mleu	L- α -甲基赖氨酸	Mlys
L- α -甲基甲硫氨酸	Mmet	L- α -甲基正亮氨酸	Mnle
L- α -甲基正缬氨酸	Mnva	L- α -甲基鸟氨酸	Morn
L- α -甲基苯丙氨酸	Mphe	L- α -甲基脯氨酸	Mpro
L- α -甲基丝氨酸	Mser	L- α -甲基苏氨酸	Mthr
L- α -甲基色氨酸	Mtrp	L- α -甲基酪氨酸	Mtyr
L- α -甲基缬氨酸	Mval	L-N-甲基同型苯丙氨酸	Nmhphe
N-(N-(2,2-二苯基乙基)氨基甲酰基甲基)甘氨酸	Nnbhm	N-(N-(3,3-二苯基丙基)氨基甲酰基甲基)甘氨酸	Nnbhe
1-羧基-1-(2,2-二苯基乙基氨基)环丙烷	Nmbc		

本发明的多肽可用于药物组合物,以针对抗 HBV 或 HBV 变体进行免疫接种。所述药物组合物含有本发明的多肽以及一种或多种可药用载体和/或稀释剂。

可药用载体和/或稀释剂包括任何和所有溶剂,分散介质,包被剂,抗菌剂 5 和抗真菌剂,等渗剂和吸收延迟剂等。所述介质和试剂作为药物活性物质的用途是本领域众所周知的。除了不能与所述活性成分相容的介质或试剂以外,治疗性组合物中可以使用任何常规的介质或试剂。也可将补加的活性成分掺入组合物中。

药物组合物也可含有遗传分子,例如能转染靶细胞的载体,其中所述载体 10 携有编码本发明多肽或编码核酶的核酸分子或 HBV-基因序列的反义分子。载体可以是例如病毒,细菌或真核载体。

如上所述,本发明进一步延及抗本发明多肽的抗体。所述抗体可以是单克隆或多克隆抗体。所述抗体可用于治疗和诊断试验。

本发明的另一方面提供了检测受试者生物样品中 HBV 的方法,所述方法 15 包括:在足以形成抗体-HBV 复合物的条件下,使所述生物样品与特异于 HBV 或其变体的抗体接触一段时间;然后检测所述复合物。

可以用任意多种方法,例如 Western 印迹和 ELISA 法测定 HBV 的存在。可以使用多种免疫分析技术,可参见美国专利 4016043, 4424279 和 4018653。这些技术包括非-竞争型的单点和两点试验或“夹心”试验,以及

传统的竞争结合试验。这些试验也包括使标记抗体与靶直接结合。

夹心试验是最有效的，也是最常用的试验，本发明使用该试验较为有利。夹心试验技术有多个变化的版本，本发明欲包括所有夹心试验技术。简单地说，在典型的早期试验中，将未经标记的抗体固定于固体底物上，使待
5 试样品与固相分子接触。保温适当的一段时间以充分形成抗体-抗原复合物，
然后，加入抗原特异性的第二抗体，所述抗体已被能产生可测信号的报告分子
10 标记，保温一段时间以充分形成另一种抗体-抗原-经标记抗体复合物。洗去任何未反应的物质，通过观察报告分子产生的信号来测定抗原的存在。可以通过简单地观察可见信号来定性结果，也可以通过与含有已知量半抗原的
15 对照样品相比较来定量结果。对早期试验所作的改变包括同时试验，其中将样品和经标记的抗体同时加入固相抗体中。这些技术是本领域技术人员众所周知的，它包括对本领域技术人员而言显而易见的任何微小改变。根据本发明，样品可以是含有 HBV 或 HBV-多肽的样品，包括细胞提取物，组织活检标本或可能为血清，唾液，粘膜分泌物，淋巴，组织液和呼吸液体。因此，
20 样品一般是含有生物液体的生物样品，但也延及发酵液和得自例如细胞培养的上清液。

在典型的早期试验中，对 HBV 或其抗原性部分具有特异性的第一抗体与固体表面共价结合或被动结合。固体表面一般是玻璃或聚合物，最常用的聚合物是纤维素，聚丙烯酰胺，尼龙，聚苯乙烯，聚氯乙烯或聚丙烯。固体
20 支持物也可以采取以下形式：试管，珠，微型平板，或任何其它适用于进行免疫分析试验的表面。结合方法是本领域众所周知的，一般由交联共价结合或物理吸附组成，用受试样品制品洗涤聚合物-抗体复合物。然后在该固相复合物中加入待试样品的等分试样，在允许结合抗体中任何亚单位的适当条件下(如从室温至约 37℃，如约 25℃)保温足够的一段时间(如 2-40 分钟，或如
25 果方便的话保温过夜)。保温之后，洗涤抗体亚单位固相，干燥，并与特异于所述半抗原部分的第二抗体保温。第二抗体与报告分子相连，所述报告分子可用于指示第二抗体与半抗原的结合。

另一种方法包括固定生物样品中的靶分子，然后将固定化的靶暴露于能或不能被报告分子标记的特异性抗体。根据靶的量和报告分子信号的强度，
30 通过直接用抗体标记即可检测到结合的靶。

或者，将特异于第一抗体的第二标记抗体暴露于靶-第一抗体复合物以形

成靶-第一抗体-第二抗体三重复合物。通过报道分子发出的信号可检测该复合物。

本说明书中所用的“报道分子”指其化学特性能提供可分析鉴定的信号的分子，通过所述信号能检测到与抗原结合的抗体。检测可以是定性的或定量的。在这种类型的试验中，最常用的报道分子是酶，荧光团或含放射性核素的分子(即放射性同位素)和化学发光分子。

在酶免疫分析试验中，酶一般通过戊二醛或过碘酸与第二抗体偶联。然而，人们会容易地认为，本领域技术人员可以容易地获得多种不同的偶联技术。常用的酶包括辣根过氧化物酶，葡萄糖氧化酶，-半乳糖苷酶和碱性磷酸酶等。选择与特定的酶一起使用的底物，使得所述底物通过被相应的酶水解可产生可测的颜色变化。适当酶的例子包括碱性磷酸酶和过氧化物酶。也可以使用能产生荧光的底物，所述底物产生荧光产物而不是上述生色底物。在所有的情况下，在第一抗体半抗原复合物中加入酶-标抗体，使它们结合，然后洗去过量的试剂。在抗体-抗原-抗体复合物中加入含适当底物的溶液。底物与第二抗体所偶联的酶反应，产生定性的可见信号，通常用分光光度计进一步定量该信号，以指示样品中存在的半抗原的量。“报道分子”还可用于细胞凝集或凝集抑制，如乳胶珠上的红细胞等。

或者，使诸如荧光素和罗丹明等荧光化合物与抗体通过化学方法偶联，而不改变抗体的结合能力。当通过用特定波长的光照射而被激活时，被荧光染料标记的抗体吸收光能，诱导分子的激发态，接着发出用光学显微镜肉眼可测的具有特征性颜色的光。在 EIA 中，使荧光标记抗体与第一抗体-半抗原复合物结合，洗去未结合的试剂之后，将残留的三重复合物暴露于适当波长的光，观察到的荧光指示目的半抗原的存在。免疫荧光和 EIA 技术都是本领域中很成熟的技术，本发明特别优选使用这两种技术。然而，也可使用其它报道分子，例如放射性同位素，化学发光或生物发光分子。

下列非-限制性的实施例将进一步描述本发明。

实施例 1

在具有高抗-HBs 水平但表面抗原为阴性的新加坡成人和经接种的未成年人中检测和鉴定 HBV 表面抗原突变体

使用本发明提供的引物寡核苷酸，通过聚合酶链反应(PCR)扩增来研究

HBsAg 阴性的新加坡成人和经接种未成年人体内是否存在 HBV DNA。选择来自不同少数民族组的 63 个成人和 15 个经接种的未成年人(小于 15 岁, 用重组疫苗接种), 通过 4 种独立的基于免疫的商用诊断试剂盒检测, 皆为 HBsAg 阴性(表 2)。他们均为 HBV 核心抗原之总抗体(抗-HBc)(Corzyme, 5 Abbott Laboratories, USA)阳性。所有人也都是抗-HBs(Ausab, Abbott Laboratories, USA)阳性(表 2)。通过蛋白酶 K 处理, 接着用氯仿/苯酚提取和乙醇沉淀, 从 100 μ l 血清中提取 DNA。在聚合酶链反应(PCR)扩增中使用本发明提供的寡核苷酸和 *Pfu* DNA 聚合酶(Stratagene, USA)。进行 35 个扩增循环, 每个循环由 94 $^{\circ}$ C 变性(1 分钟), 50 $^{\circ}$ C 退火(2 分钟)和 73 $^{\circ}$ C 延伸(3 分钟)组成。10 结果表明使用本发明提供的引物寡核苷酸, 在 15 个未成年人的 3 个(20%)和 63 个成年人中的 8 个(13%)中扩增出 HBV DNA。在这组 HBsAg 阴性的未成年人中鉴定出 HBsAg 突变体, 这与我们以前所报道的, 在经检测为 HBsAg 阳性的经接种新加坡未成年人中检测到 HBsAg 突变体的情况有所不同。使用本发明提供的引物寡核苷酸扩增这组经接种的未成年人的所有样品中的 15 HBV DNA。

对扩增的 DNA 片段直接测序, 结果表明在这些样品中多个 MHR 位置上具有突变(表 2)。这些包括在 6 例中最常见的疫苗逃避 G145R。还有 3 例具有 G130D 突变(表 2), 该突变最近刚在一例中报道与拉米夫啉(lamivudine) 20 疗法有关。另外, 在 4 例中鉴定出 T131N 突变。与所报道的, 在 HBsAg 上总是同时携带 T114S 与 T131N 的基因型-相关突变不同的是, 使用本发明提供的引物寡核苷酸鉴定出的 T131N 突变在残基 114 处具有野生型 S(丝氨酸)。这反过来表明它可能是能逃避检测的变体。

本领域技术人员应理解本文所述的发明并不仅是具体描述的那样, 可以 25 对其进行改动和修饰。应理解本发明包括所有这种改动和修饰。本发明还包括本说明书中单独或集中所指或所述的所有步骤, 特征, 组合物和化合物, 以及任何两个或多个所述步骤或特征的任何和所有组合。

表 2 HBsAg 阴性/抗-HBc 阳性的 HBV 新加坡成人和经接种的未成年人中的 HBsAg 突变体

患者	性别/年龄/人种	商购 HBsAg 试验				抗 HBs	抗 HAV IgG	抗 HCF	抗 HEV IgG	HBsAg 突变
		A	B	C	D					
1	男性/10 月龄/马来人	-	-	-	-	6.0	-	-	-	G130D, M133T, G145R
2	女性/3 岁/中国人	-	-	-	-	14.0	-	-	-	T131N, G145
3	男性/9 月龄/中国人	-	-	-	-	3150.0	-	-	-	G145
4	女性/60 岁/中国人	-	-	-	-	72.0	-	-	-	T131N

文献目录

- 1.Carman 等, 胃肠学, 102:711-719, 1992
- 2.Carman 等, 柳叶刀, 336:325-329, 1990
- 3.Okamoto 等, 儿科学研究, 32:264-26, 1992
- 5 4.McMahon 等, 肝脏学, 15:757-766, 1992
- 5.Fuji 等, Biochem. Biophys. Res. Commun, 184:1152-1157, 1992
- 6.Harrison 等, 肝脏学杂志, 13:5105-5107, 1991
- 7.Chen 等, FEBS Lett, 453:237-242, 1999
- 8.Altschul 等, 核酸研究, 25:3389, 1997
- 10 9.Ausubel 等, “最新分子生物学方法”, John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, 第 15 章
- 10.Bonner 和 Laskey, 欧洲生物化学杂志, 46:83, 1974
- 11.Marmur 和 Doty, 分子生物学杂志, 5:109, 1962
- 12.Oon 等, 疫苗, 13:699-702, 1999

15

序列表

<110> 温崇仁

<120> 诊断试验

<130> 2269257/EJH

<140>

<141>

<160> 3

<170> PatentIn version 2.1

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 引物

<400> 1

caaggtatgt tgccgtttg t

21

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 引物

<400> 2

tggctcagtt tactagtgcc att

23

<210> 3

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 引物

<400> 3

gaattc

6

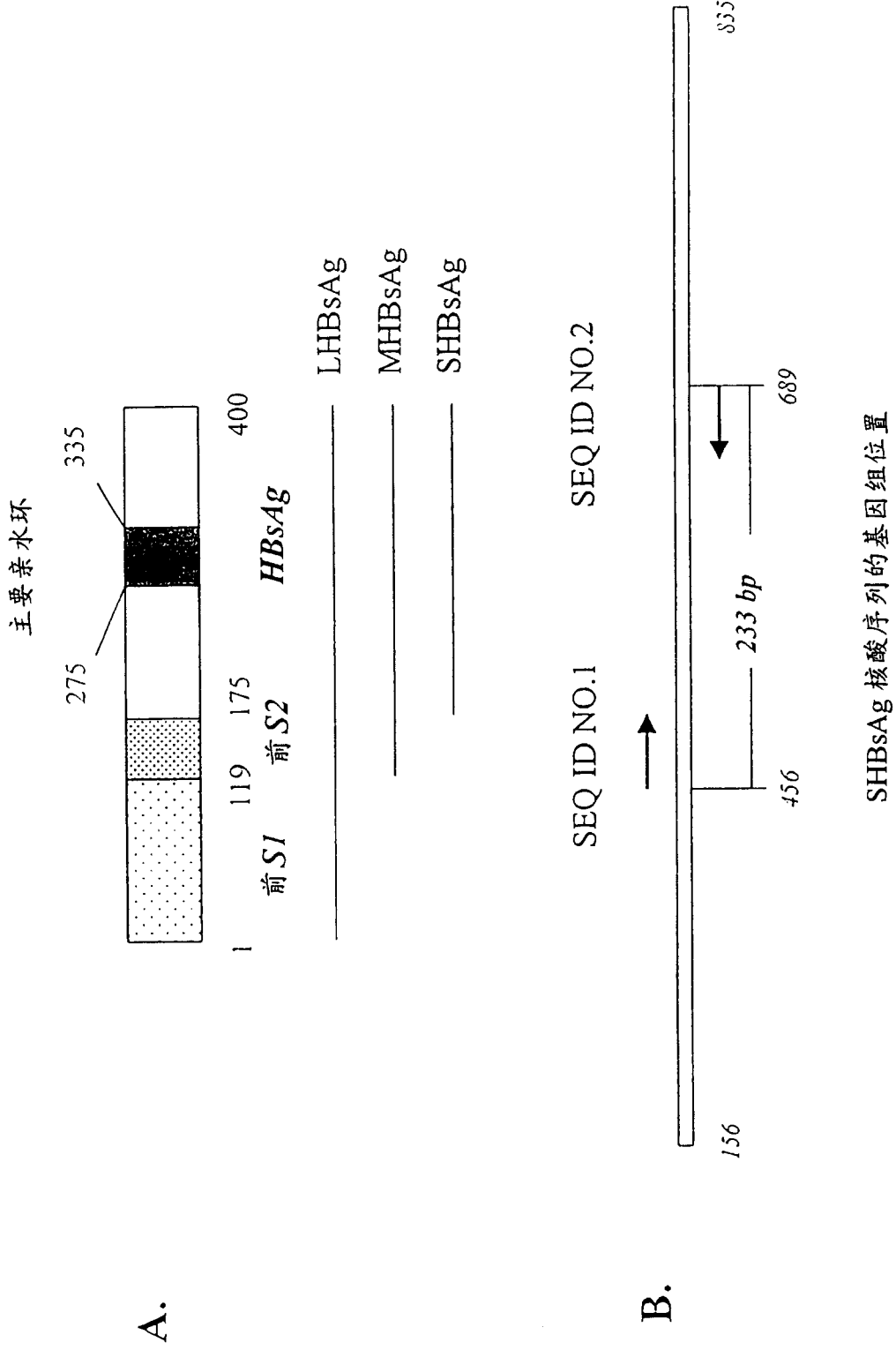


图 1

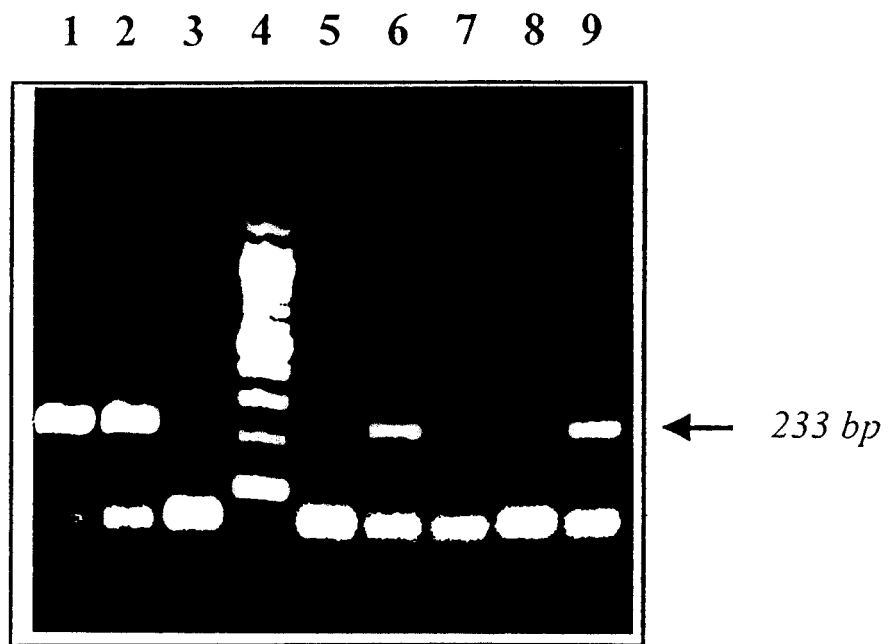


图 2

专利名称(译)	诊断试验		
公开(公告)号	CN1680592A	公开(公告)日	2005-10-12
申请号	CN200510004456.6	申请日	2001-07-18
[标]发明人	温崇仁 陈维宁		
发明人	温崇仁 陈维宁		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/395 A61P31/12 C07K16/08 C12N7/00 C12N7/01 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/70 C12R1/93 G01N33/566 G01N33/569 G01N33/576 G01N33/68		
CPC分类号	C12Q1/706 C12Q1/6837 A61P31/12		
优先权	200004041 2000-07-18 SG		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明一般涉及基于核酸的分析试验，该试验可用于检测病毒病原体，特别是乙肝病毒的存在。更特别地，本发明提供了检测乙肝病毒核酸序列的一步扩增试验。本发明的试验可以容易地适应自动化操作，并且可以使待测样品快速流通。本发明还提供了试剂和含有所述试剂的试剂盒，所述试剂可用于进行基于核酸的乙肝病毒检测试验。

