

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ****(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**(21)(22) Заявка: **2008108517/10, 04.08.2006**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
04.08.2006

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
05.08.2005 GB 0516145.0(43) Дата публикации заявки: **10.09.2009** Бюл. № 25(45) Опубликовано: **10.02.2012** Бюл. № 4(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **US 2003165821, 04.09.2003. AMBRETTI ET AL., High-throughput polymerase chain reaction chemiluminescent enzyme immunoassay for typing and quantifying human papillomavirus DNAs, Anal Biochem., 2004, v.332, n.2, pp.349-357. WO 9522626 A1, 24.08.1995. KR 20040078506 A, 10.09.2004.**(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: **05.03.2008**(86) Заявка РСТ:
GB 2006/050231 (04.08.2006)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2007/017699 (15.02.2007)

Адрес для переписки:

**129010, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной, рег. № 517**

(72) Автор(ы):

**ГАСКОН ЭСКОБАР Ирене (ES),
ВИЛЛЬЯЭРМОСА ХАЭН Мария
Луиса (ES)**

(73) Патентообладатель(и):

ХЕНОМИКА С.А.У (ES)**(54) IN VITRO ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ НАБОР ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ
ПАПИЛЛОМАВИРУСА ЧЕЛОВЕКА В КЛИНИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, а именно к способу детектирования и типирования папилломавируса человека (HPV) в образце, а также к реакционному сосуду, набору и зонду для детектирования и типирования HPV. Способ включает проведение реакции амплификации нуклеиновых кислот в образце,

причем реакция амплификации предназначена для амплификации мишени последовательности HPV неспецифическим для типа образом. Получают одноцепочечные олигонуклеотиды из любых продуктов амплификации. Осуществляют гибридизацию одноцепочечных олигонуклеотидов с множеством HPV-типоспецифических зондов, выбранных из группы, содержащей SEQ ID NO:

1 - SEQ ID NO:133 и отобранных по типу, как указано в таблице 1, находящихся на твердом носителе, причем носитель расположен в реакционном сосуде, подходящем для этого образца. Детектируют гибридизованные

олигонуклеотиды, если HPV присутствует в образце. Предложенное изобретение позволяет осуществлять специфическую идентификацию типов HPV, если HPV присутствует в образце. 4 н. и 59 з.п. ф-лы, 7 ил., 2 табл.

RU 2 4 4 1 9 1 8 C 2

RU 2 4 4 1 9 1 8 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 441 918** (13) **C2**

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2008108517/10, 04.08.2006**

(24) Effective date for property rights:
04.08.2006

Priority:

(30) Priority:
05.08.2005 GB 0516145.0

(43) Application published: **10.09.2009 Bull. 25**

(45) Date of publication: **10.02.2012 Bull. 4**

(85) Commencement of national phase: **05.03.2008**

(86) PCT application:
GB 2006/050231 (04.08.2006)

(87) PCT publication:
WO 2007/017699 (15.02.2007)

Mail address:

**129010, Moskva, ul. B.Spaskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. E.E.Nazinoj, reg. № 517**

(72) Inventor(s):

**GASKON EhSKOBAR Irene (ES),
VILL'JaEhRMOSA KhAEhN Marija Luisa (ES)**

(73) Proprietor(s):

KhENOMIKA S.A.U (ES)

(54) VITRO DIAGNOSTIC KIT FOR IDENTIFICATION OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS IN CLINICAL SAMPLES

(57) Abstract:

FIELD: medical technology.

SUBSTANCE: invention relates to the area of biotechnology, namely to the method for detection and typing of human papillomavirus (HPV) in a sample, as is a reaction vessel. The invention also relates to apparatus for use in the kit and the HPV detection and typing method. The assay comprises: performing a nucleic acid amplification reaction on a sample, the amplification reaction being intended to amplify an HPV target sequence in a non-type specific manner; obtaining single stranded oligonucleotides from any amplification products;

allowing single stranded oligonucleotides to hybridise where possible with the HPV type-specific probes chosen from the group containing SEQ ID NO:1 - SEQ ID NO:133 and chosen according to their type, as given in table 1, provided on a solid support, the support being located within a reaction vessel suitable for containing the sample; and detecting hybridised oligonucleotides if HPV is present in the sample.

EFFECT: specific identification of the HPV types if HPV is present in a sample.

63 cl, 7 dwg, 2 tbl, 3 ex

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к *in vitro* диагностическому набору и к способу для идентификации папилломавируса человека (HPV) в клинических образцах.

Настоящее изобретение также относится к устройству для применения этого набора и способа.

Более конкретно, в предпочтительных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к *in vitro* диагностическому набору для специфического детектирования генотипов папилломавируса человека в клинических образцах с использованием зондов для генотипирования HPV, к платформе, на которой объединены матрицы нуклеиновых кислот, включая зонды, и стандартный лабораторный реакционный сосуд, к устройству для автоматической обработки результатов и к способу диагностики инфекции HPV с использованием этого *in vitro* диагностического набора.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

До настоящего времени было описано приблизительно 100 типов папилломавируса человека (HPV). Тип HPV считается новым типом, когда по меньшей мере 10% последовательностей генов в областях E6, E7 и L1 HPV отличаются от ранее известного типа. Подтипы, или варианты, отличаются от первичного типа менее чем на 2-5%. Эти вирусы имеют тропизм к эпителию человека и связаны с серьезными заболеваниями человека, в частности с карциномой слизистой оболочки половых органов и полости рта.

Приблизительно 50 типов HPV были выделены из аногенитальной слизистой оболочки. Они были подразделены на типы низкого риска (например, тип HPV 6, 11, 42, 43 и 44) и типы высокого риска (например, тип 16, 18, 31, 33 и 45) в зависимости от их связи с раком шейки матки. Детектирование и идентификация типов HPV является крайне важной, так как персистирующая инфекция типов HPV высокого риска является главным этиологическим фактором рака шейки матки.

Детектирование и идентификацию генотипов HPV проводят тестированием ДНК HPV. Эти способы могут выполняться прямым детектированием ДНК HPV или детектированием амплифицированной ДНК HPV. Способы прямого детектирования ДНК HPV включают способ захвата гибридов (НС) от Digene Corp., Gaithersburg, Md., USA и способы гибридизации *in situ*. Способ НС одобрен FDA и основан на способе усиления сигнала гибридизации. Использующиеся гибридизационные зонды представляют собой HPV-специфические РНК-последовательности. После инкубирования этих зондов с денатурированной ДНК HPV из клинического образца образуются гибриды РНК/ДНК, которые могут быть детектированы с помощью специфического антитела. Способ НС позволяет провести различия типов HPV высокого и низкого риска, но не может идентифицировать тип HPV. Еще одним недостатком этого тест-способа является то, что применение коктейля (смеси) зондов часто приводит к перекрестным реакциям между типами HPV этих двух классов.

Способы идентификации типа HPV посредством амплификации вирусного генома проводили в основном с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Генотипирование HPV может быть выполнено типоспецифической ПЦР с использованием праймеров, которые распознают только один конкретный тип.

Альтернативным подходом является применение ПЦР с универсальными праймерами для амплификации всех типов HPV. Папилломавирусы типизируют последующим анализом последовательности амплифицированного фрагмента гена. Анализ этой последовательности может проводиться различными способами, такими как

секвенирование ДНК, полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (RFLP) или гибридизация нуклеиновых кислот. Способы гибридизации, такие как обращенная блот-гибридизация, считаются наиболее подходящими для диагностических целей (Kleter et al., J Clin Microbiol. 1999, 37: 2508-21517; Van den Brule et al., J Clin Microbiol. 2002, 40: 779-787).

Недавно была разработана технология анализа микроматриц (см., например, патент США No. 5445934). Термин микроматриц обозначает анализ многих малых пятен для облегчения крупномасштабного анализа нуклеиновых кислот, позволяющий проводить одновременно анализ тысяч последовательностей ДНК. Как известно в данной области, обращенный блоттинг обычно проводят на мембранах, тогда как анализ микроматрицы обычно проводят на твердом носителе, и его, кроме того, можно проводить в небольшом масштабе. Технология микроматриц успешно применялась в области диагностики HPV (см. патентные публикации WO0168915 и № CA2484681).

Однако существует отрицательная сторона в применении технологии микроматриц, заключающаяся в том, что требуется дорогостоящее оборудование и трудоемкое манипулирование. Это неудобство было устранено благодаря Заявке на патент № US2005064469, в которой предложена «пробирка-микроматрица». Термин «пробирка-микроматрица» относится к реакционному сосуду, который имеет форму и размер, обычные для реакционного сосуда (например, пробирки Эппендорф по 1,5 мл), с микроматрицей, размещенным на его основании, в которой могут проводиться тесты, основанные на микроматрицах.

ЦЕЛИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В соответствии с описанным выше, целью настоящего изобретения является создание надежного способа для специфической идентификации типов HPV, возможно, присутствующих в клиническом образце.

Более конкретно, целью настоящего изобретения является создание способа специфической идентификации типов HPV с использованием платформы «пробирки-микроматрицы».

Целью настоящего изобретения также является создание зондов для специфического детектирования и/или идентификации различных типов HPV.

Кроме того, целью настоящего изобретения является создание набора для детектирования и/или идентификации типов HPV, содержащего реагенты, протоколы и HPV-специфические зонды, размещенные на «пробирке-микроматрице», позволяющие надежное специфическое детектирование и/или идентификацию типов HPV, возможно, присутствующих в клиническом образце.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Согласно первому аспекту изобретение относится к анализу детектирования и типирования папилломавируса человека (HPV) в образце, причем этот анализ включает: проведение реакции амплификации нуклеиновых кислот в образце, причем эта реакция амплификации предназначена для амплификации мишени последовательности HPV неспецифическим для типа образом; получение одноцепочечных олигонуклеотидов из любых продуктов амплификации; гибридизацию одноцепочечного олигонуклеотида, если возможно, со множеством HPV-типоспецифических зондов, обеспеченных на твердом носителе, причем этот носитель расположен в реакционном сосуде, подходящем для содержания этого образца; и детектирование гибридизованных олигонуклеотидов.

К аспектам изобретения также относятся анализ детектирования и типирования

папилломавируса человека (HPV) в образце, включающий проведение реакции амплификации нуклеиновых кислот в образце, причем этот образец находится в контакте с твердым носителем, с иммобилизированным на нем множеством HPV-типоспецифических зондов, причем реакция амплификации предназначена для амплификации мишени последовательности HPV неспецифическим для типа образом; получение одноцепочечных олигонуклеотидов из любых продуктов амплификации; гибридизацию одноцепочечных олигонуклеотидов, если возможно, со множеством типоспецифических зондов HPV и детектирование гибридизованных олигонуклеотидов.

Реакцией амплификации является предпочтительно ПЦР. Одноцепочечные олигонуклеотиды могут быть получены денатурацией любых присутствующих двухцепочечных олигонуклеотидов, например, путем нагревания. Гибридизацию одноцепочечных олигонуклеотидов, предпочтительно, проводят при строгих условиях; такие условия будут известны специалистам в данной области, и, предпочтительно, включают в себя инкубирование денатурированных олигонуклеотидов с мишенью при 55°C в буфере, содержащем 1xSSC.

В предпочтительных вариантах осуществления, образец и твердый носитель находятся внутри реакционного сосуда; например, сосуда, описанного в US 2005064469.

Предпочтительно, используют зонды, специфические по меньшей мере для типов HPV 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 или 42, которые, предпочтительно, выбраны из типов HPV 6, 11, 16, 18, 26, 30, 31, 32, 33, 34/64, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 57, 58, 59, 61, 62, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 81, 82, 83, 84, 85 и 89. Эти зонды предпочтительно имеют длину 20-40 нт, предпочтительно 25-35 нт, более предпочтительно 28-32 нт и наиболее предпочтительно приблизительно 30 нт. Все зонды не обязательно должны быть одной и той же длины. Эти зонды предпочтительно являются специфическими в отношении L1-области HPV. Каждый типоспецифический зонд может отличаться от зондов, специфических в отношении другого типа HPV по меньшей мере 1, 2, 3 или предпочтительно более чем 3 нуклеотидами. Предпочтительные зонды выбраны из группы, содержащей SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO:133; несколько из этих зондов детектируют один и тот же тип HPV, как описано ниже. Предпочтительно, множество зондов являются специфическими для одного и того же типа HPV и, более предпочтительно, используют по меньшей мере два зонда, специфических для каждого типа HPV. Смеси этих зондов могут быть иммобилизованы в одном и том же местоположении на твердом носителе или каждый типоспецифический зонд может быть иммобилизован в отличающемся положении. Каждый зонд, специфический в отношении одного и того же типа HPV, детектирует отличающуюся часть мишени последовательности этого HPV.

Зонды могут находиться на двух повторностях твердого носителя для обеспечения множественных местоположений детектирования на избыточность.

Могут также детектироваться одна или несколько контрольных последовательностей; например, зонд, иммобилизованный на твердом носителе, который не гибридизуется ни с какой мишени последовательностью из типов HPV. Этим зондом может быть геномная мишени последовательность человека; кроме того, этот анализ может включать амплификацию мишени последовательности человека из этого образца и детектирование, произошла ли гибридизация. Дополнительный контроль может быть введен с использованием неспецифически меченных последовательностей, иммобилизованных на этом твердом носителе;

детектирование этой метки может гарантировать, что метка работает правильным образом. Еще один контроль может быть обеспечен включением контрольной последовательности амплификации, которая может быть амплифицирована с теми же самыми праймерами, что и мишень человека, но которая будет детектироваться

5 отличающимся олигонуклеотидом на этом твердом носителе. Этот контроль гарантирует, что амплификация работает корректно.

Настоящее изобретение также относится к реакционному сосуду, включающему твердый носитель, имеющий множество HPV-типоспецифических зондов,

10 иммобилизованных на нем. Также изобретение относится к набору для детектирования и типирования HPV, содержащему такой реакционный сосуд вместе со смесью для амплификации нуклеиновых кислот. Эта смесь может содержать HPV-консенсусные праймеры, такие как MY09 и MY11; и, необязательно, HMB01;

15 праймеры для амплификации мишени последовательности человека и контрольную мишеневую последовательность амплификации, включающую последовательности, соответствующие фланкирующим частям последовательности-мишени человека, так что амплификация обеих мишеневых последовательностей будет происходить с использованием одних и тех же праймеров. Этот набор может также

20 включать в себя инструкции для его применения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На фиг.1 показано расположение зондов на поверхности микроматрицы с $12 \times 11 = 132$ положениями. Номера соответствуют номеру SEQ ID NO из списка последовательностей. Отдельные зонды фиксировали в двух разных положениях для

25 детектирования 21 различного типа HPV, контроль качества образца ДНК и контроль амплификации. LR = зонды для стандарта местоположения (SEQ ID NO:140 + SEQ ID NO:141).

На фиг.2 показано расположение зондов на поверхности микроматрицы с $12 \times 11 = 132$ положениями. Номера соответствуют номеру SEQ ID NO из списка последовательностей. Отдельные зонды фиксировали в двух разных местоположениях для детектирования 23 различных типов HPV, контроль качества образца ДНК и

30 контроль амплификации. LR = зонды для стандарта местоположения (SEQ ID NO:140 + SEQ ID NO:141).

На Фиг.3 показано расположение зондов на поверхности микроматрицы с $12 \times 11 = 132$ местоположениями. Номера соответствуют номеру SEQ ID NO: из списка последовательностей. Смеси зондов фиксировали в двух разных местоположениях для детектирования 42 различных типов HPV и контроль качества образца ДНК. LR =

40 зонды для стандарта местоположения (SEQ ID NO:140 + SEQ ID NO:141); M1 = SEQ ID NO:76 + SEQ ID NO:77 + SEQ ID NO:78; M2 = SEQ ID NO:122 + SEQ ID NO:123 + SEQ ID NO:124; M3 = SEQ ID NO:116 + SEQ ID NO:117 + SEQ ID NO:118 + SEQ ID NO:119.

На Фиг. 4 показано расположение зондов на поверхности микроматрицы с $12 \times 10 = 120$ положениями. Номера соответствуют номеру SEQ ID NO из списка последовательностей. Отдельные зонды или смеси зондов фиксировали в трех разных местоположениях для детектирования 35 различных типов HPV, контроль качества

45 образца ДНК и контроль амплификации. LR = зонды для стандарта местоположения (SEQ ID NO:140 + SEQ ID NO:141); M1 = SEQ ID NO:76 + SEQ ID NO:77 + SEQ ID NO:78; M2 = SEQ ID NO:122 + SEQ ID NO:123 + SEQ ID NO:124.

50

На фиг. 5 показано расположение зондов на поверхности микроматрицы с $12 \times 10 = 120$ положениями. Номера соответствуют номеру SEQ ID NO из списка последовательностей. Отдельные зонды фиксировали в двух разных положениях для

детектирования 14 различных типов HPV, контроль качества образца ДНК и контроль амплификации. LR = зонды для стандарта местоположения (SEQ ID NO:140 + SEQ ID NO:141); M4 = SEQ ID NO:100 + SEQ ID NO:101 + SEQ ID NO:102.

На фиг. 6 схематически показана рекомбинантная плазмида рPG44, используемая в реакции ПЦР в качестве положительного контроля амплификации.

На фиг. 7 показана фотография «пробирки-матрицы», используемой в настоящем изобретении.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ специфического детектирования и/или идентификации типов HPV предусматривает стадии:

(i) Амплификацию ДНК-образца: ДНК, полученную из клинических образцов, амплифицируют, предпочтительно при помощи ПЦР, с использованием универсальных праймеров для всех известных типов HPV, которые фланкируют геномный район, достаточно разнообразных для возможности дальнейшего генотипирования. Хотя ПЦР является предпочтительным способом амплификации, амплификация мишеневых последовательностей может быть выполнена любым другим способом, известным в данной области (лигазной цепной реакцией, системой амплификации на основе транскрипции, амплификацией замещения цепи и т.д.). В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, использовали праймеры MY11 и MY09 (Manos et al., Molecular Diagnostics of Human Cancer; Furth M, Greaves MF, eds.; Cold Spring Harbor Press, 1989, vol. 7: 209-214), которые амплифицируют переменный район L1.

Метку вводят в амплифицированную ДНК во время ее амплификации для создания возможности дальнейшего детектирования, предпочтительно метку, которая обеспечивает сигнал, который может быть детектирован колориметрическими способами. В предпочтительном варианте осуществления, по меньшей мере один из используемых праймеров метят на его 5'-конце биотином. Однако может быть использован любой другой тип метки, известный в данной области (например, дигоксигенин). Кроме того, мечение амплифицированной ДНК может альтернативно достигаться добавлением модифицированных нуклеотидов, несущих метку (например, биотинилированных или содержащих дигоксигенин производных dUTP) в ПЦР-смеси. Могут быть использованы радиоактивные метки или флуорофоры в некоторых вариантах осуществления.

(ii) Гибридизацию: амплифицированную ДНК из стадии (I) денатурируют (например, нагреванием) и наносят в «пробирку-матрицу» с одним или несколькими зондами из зондов, показанных в таблице 1 (SEQ ID NO:1-133). Могут быть также использованы другие способы получения одноцепочечной ДНК после амплификации. Каждый зонд, показанный в таблице 1 (SEQ ID NO:1-133), способен к специфической гибридизации с амплифицированным L1-районом из стадии (I) только одного типа HPV и, следовательно, позволяет специфически идентифицировать этот тип HPV, когда этот тип присутствует в биологическом образце. Другие типы HPV в образце могут быть идентифицированы гибридизацией амплифицированной ДНК из указанных типов HPV по меньшей мере с одним, но предпочтительно с несколькими зондами.

(iii) Детектирование: ДНК-гибриды могут быть детектированы узнаванием этой метки по специфическому связыванию с лигандом или посредством иммунодетектирования. В предпочтительном варианте осуществления, метку биотин детектируют по специфическому связыванию со стрептавидином, конъюгированным с

пероксидазой хрена (HRP), и последующему превращению тетраметилбензидина (ТМВ) в синий пигмент, который осаждается в конкретном местоположении, где связан соответствующий специфический зонд. Конъюгаты другого типа, хорошо известные в данной области, могут быть также пригодными для целей настоящего изобретения (например, конъюгат стрептавидин-Au). Вместо этого могут использоваться флуоресцентно меченные системы детектирования, меченные опосредованно или непосредственно. Альтернативно, могут быть использованы другие системы на основе ферментов.

(iv) Анализ и обработка результатов: «пробирки-микроматрицы», обработанные таким образом, могут считываться с использованием простых оптических устройств, таких как оптический микроскоп или ATR01- и ATS-ридеры, изготавливаемые CLONDIAC chip technologies GmbH (Jena, Germany).

В альтернативном варианте осуществления стадии амплификации и гибридизации могут выполняться в одной и той же пробирке-микроматрице; то есть, образец добавляют в пробирку-микроматрицу и затем этот образец амплифицируют и гибридизуют с зондами внутри этой пробирки.

Один из способов получения «пробирки-микроматрицы» описан в заявке на патент US2005064469. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, 5'-амино-связанные олигонуклеотидные зонды связывают с поверхностью твердого носителя в известных отдельных местоположениях. Указанные зонды могут быть иммобилизованы по отдельности или в виде смесей с очерченными местоположениями на этом твердом носителе. В предпочтительном варианте осуществления, используют два типоспецифических зонда для каждого типа HPV, что обеспечивает дополнительную гарантию того, что все HPV будут типированы правильно, в том числе варианты, в которых произошли замены нуклеотидов в районе одного типоспецифического зонда. Предпочтительно, используют два типоспецифических зонда, которые способны гибридизоваться в отдельных районах амплифицированного продукта.

Указанные зонды или смеси зондов могут быть иммобилизованы в единственном местоположении твердого носителя, предпочтительно в двух отдельных местоположениях твердого носителя. Фиг. 1-5 в качестве примеров показывают схематические представления различных расположений зондов на поверхности этой микроматрицы.

«Пробирка-микроматрица», используемая в настоящем изобретении, может содержать один или несколько зондов HPV, выбранных из нуклеотидных последовательностей из списка последовательностей (SEQ ID NO:1-133). Кроме того, она может содержать один или несколько зондов для специфического детектирования контролей, таких как контроль реакции ПЦР или адекватности ДНК из этого образца контроля. Кроме того, он может также содержать один или несколько меченых олигонуклеотидов (например, модифицированных биотином олигонуклеотидов) для положительного контроля реакции детектирования и для позиционирования стандарта, так что могут быть определены местоположения всех остальных зондов.

Специфические зонды для идентификации типов HPV были сконструированы следующим образом. Последовательности для всех ссылочных HPV (стандартов), депонированных в GenBank, в том числе известных вариантов, для амплифицированного L1-района сопоставляли с использованием общепринятой программы сопоставления нуклеиновых кислот, такой как BloEdit (4.8.6 version; Hall. Nucl. Acids Symp Ser. 1999, 41: 95-98), и определили местоположение районов наиболее

вариабельных последовательностей среди различных типов HPV. Для использования в качестве специфических зондов из этих вариабельных последовательностей отбирали потенциальные последовательности олигонуклеотидов, имеющие следующие признаки: длина 20-40 оснований, предпочтительно приблизительно длина 30 оснований; предпочтительно без вторичных структур или нитей последовательного одного и того же нуклеотида, более длинных чем 4 нуклеотида; предпочтительно с отношением G+C 50% и T_m , как можно более сходной среди всех отобранных зондов; и предпочтительно с ошибочно спаренными нуклеотидами среди последовательностей разных типов HPV, находящимися как можно более в центре последовательности олигонуклеотида.

Каждую потенциальную последовательность зонда, отобранную, как описано выше, сравнивали со всеми известными последовательностями HPV в амплифицированном L1-районе с использованием программы BLAST из NCBI webpage (Altschul et al., Nucleic Acid Res. 1997, 25: 3389-3402). Наконец, зонды, имеющие по меньшей мере три ошибочно спаренных нуклеотида при сравнении со всеми известными типами HPV (за исключением случая, когда их сравнивали с типом HPV, в отношении которого этот олигонуклеотидный зонд был специфическим), отбирали с предпочтением в отношении зондов, имеющих более трех ошибочных спариваний.

Настоящее изобретение относится к зондам для специфического детектирования наиболее клинически важных типов HPV: 6, 11, 16, 18, 26, 30, 31, 32, 33, 34/64, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 57, 58, 59, 61, 62, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 81, 82, 83, 84, 85 и 89 (таблица 1; SEQ ID NO:1-133). Последовательности зондов представлены в виде одноцепочечных ДНК-олигонуклеотидов от 5'-конца к 3'-концу. В предпочтительном варианте осуществления этого изобретения, последовательности зондов соответствуют антисмысловой цепи, но любому специалисту с квалификацией в данной области очевидно, что любой из этих зондов может быть использован как таковой или в его комплементарной форме, или в форме его РНК (где Т заменен на U). Зонды по изобретению также могут быть получены путем добавления или изменения одного или нескольких нуклеотидов их последовательностей без значительного влияния на функциональность.

Таблица 1

SEQ ID NO	Название зонда	Тип HPV	Последовательность (5'→3')
-----------	----------------	---------	----------------------------

	1	6A1-AS	6	TGTATGTGGAAGATGTAGTTACGGATGCAC
	2	6B4	6	CATGACGCATGTACTCTTTATAATCAGAATT
	3	11A1-AS	11	TGTATGTAGCAGATTTAGACACAGATGCAC
	4	11B1	11	CATGGCGCATGTATTCCCTTATAATCTGAAT
5	5	16A	16	GTAGATATGGCAGCACATAATGACATATTT
	6	16E-AS	16	TTCTGAAGTAGATATGGCAGCACATAATGA
	7	16C3	16	CGTCTGCAGTTAAGGTTATTTTGCACAGTT
	8	16C4	16	CAAAATAGTGGAAATTCATAGAATGTATGTAT
	9	16C5	16	CTATAAGTATCTTCTAGTGTGCCCTCCTGGG
10	10	18A1-AS	18	ATCATATTGCCCAGGTACAGGAGACTGTGT
	11	18B3	18	CTTATTTTTCAGCCGGTGCAGCATCCTTTT
	12	18C2	18	AAGTTCCAATCCTCTAAAATACTGCTATTC
	13	18C3	18	TCCTTTAAATCCACATTCCAAAACCTTAACT
	14	26A1-AS	26	TGGTTTAAATGGAGTGGATGCAGATGCTGC
15	15	26B2	26	ATCTTCCCTTTGGCACAGGAGGGGCGTTACG
	16	26C1	26	CATATTCTTCGCCATGTCTTATAAATTGTT
	17	26C3	26	TCCTCCAATATGGAGGCATTCAATAAATGT
	18	26C4	26	GATCTTCCCTTTGGCACAGGAGGGGCGTTAC
	19	30A1	30	CTTGTGGCAGCTGGGGGTGACAAATCCAATA
	20	30B1	30	GATAACGTTTGTGTGGTTGCAGATATAGTC
20	21	30C1	30	TTCCAGCCCTCAAGTAAAGTGGAGTTCATA
	22	31A-AS	31	TGTAGTATCACTGTTTGC AATTGCAGCACA
	23	31B5	31	AGAACCTGAGGGAGGTGTGGTCAATCCAAA
	24	31C2	31	TCAAATTCCTCACCATGTCTTAAATACTCTTTA
	25	31C5	31	AAAATAGCAGGATTCATACTGTGAATATATG
25	26	32A1	32	AGTTAGTAGACTTGTATGTGTCTTCAGTTGTT
	27	32B1	32	TTCCCAAATGAATAGTCAGAAAAAGGATC
	28	33A2	33	TACTGTCACTAGTTACTTGTGTGCATAAAG
	29	33B1-AS	33	GTATATTTACCTAAGGGGTCTTCCCTTTTCC
	30	33C1	33	AATGTATATTTACCTAAGGGGTCTTCCCTTT
30	31	33C3	33	TTCTGCAGTTAAGGTAACCTTGCATAGTTG
	32	34/64A1	34/64	ATATGGTGGAGTTGTACTTGTGGATTGTGT
	33	34/64B1	34/64	TCCTTAGGAGGTTGCGGACGCTGACATGTA
	34	35A1-AS	35	GTCACTAGAAGACACAGCAGAACACACAGA
	35	35B1	35	AATGGATCATCTTTAGGTTTTGGTGCAGT
	36	35C4	35	TTACATAGCGATATGTGTCCTCTAAGGTAC
35	37	35C7	35	TTTGACAAGTTACAGCCTGTGATGTTACAT
	38	39A1-AS	39	GGTATGGAAGACTCTATAGAGGTAGATAATG
	39	39B1	39	GTATCTGTAAGTGTCTACCAAACCTGGCAGA
	40	39C2	39	TAGAGGTAGATAATGTAAAGTTGGTACTAC
40				
45				
50				

	41	39C3d	39	GTAAATCATACTCCTCCACGTGCCTGRTAT
	42	39C4	39	CATCAGTTGTTAATGTGACAGTACACAGTT
	43	39C4d	39	CATCAGTTGTTAATGTGACAGTACACAGTT
5	44	40A1-AS	40	CTTGAAATTACTGTTATTATATGGGGTTGG
	45	40B1	40	CCTCCAACAACGTAGGATCCATTGCATGAA
	46	42A1	42	GTATATGTATCACCAGATGTTGCAGTGGCA
	47	42B1-AS	42	TAGCCTGACAGCGAATAGCTTCTGATTGTA
	48	42C1	42	TGACAGCGAATAGCTTCTGATTGTACATAC
10	49	42C5	42	TCCTCTAATATGTTAGGATTCATATTGTGTA
	50	42C6	42	TTCTAAAGTTCTCTGAAGGTGGTGGTGCAAC
	51	43A1	43	ATATGTACTGGGCACAGTAGGGTCAGTAGA
	52	43B1-AS	43	AAGCAGAGGCAGGTGGGGACACACCAAAAT
	53	44A1	44	TATATGTAGACGGAGGGGACTGTGTAGTGG
	54	44B1-AS	44	CGCATGTATTGCTTATATTGTTCACTAGTAT
15	55	45B1	45	CTGCTTTTCTGGAGGTGTAGTATCCTTTT
	56	45B4-AS	45	GGCACAGGATTTTGTGTAGAGGCACATAAT
	57	45C1d	45	TACTATASTGCTTAAACTTAGTAGGRTCAT
	58	45C3d	45	CCACYAAACTTGTAGTAGGTGGTGGAGGKA
	59	45C4	45	CAGGTAACAGCAACTGATTGCACAAAACGA
20	60	51A1-AS	51	TAAATGTTGGGGAAACCGCAGCAGTGGCAG
	61	51B1	51	TGGAGGGGTGTCCTTTTGACAGCTAGTAGC
	62	51C3	51	ATGGTAGGATCCATTGTGTGTAAATAAGCC
	63	51C4	51	CCACTGTTCAAGAATGGTAGGATCCATTGT
	64	51C5	51	CCAAACTAGCAGACGGAGGTAATGTTAATC
25	65	52A1-AS	52	TTATATGTGCTTTCCTTTTAACTCAGCA
	66	52B2	52	GTGTCTCTCAAAGATGCAGACGGTGGTGG
	67	53A1	53	AACCTCAGCAGACAGGGATATTTTACATAG
	68	53B1	53	AAGCTAGTGGCAACAGGAGGCGACAAACCT
	69	54A1	54	GCTATCCTGCGTGGATGCTGTAGCACACAA
	70	54B1	54	AACTACTTGTAGCTGGGGGGGTTATACCAA
30	71	54C1	54	ATCTGCTGTAAGGGTTATGGTACATAACTG
	72	56A1	56	TGTCTAAGGTAAGTATTAATTTTTCGTGCA
	73	56B1	56	TTTATCTTCTAGGCTGGTGGCCACTGGCGG
	74	57A1d	57	TATAATTAGTTTCTGTGKTTACAGTGGCAC
	75	57B1	57	AGTCCTCTAGCAACCGCGCATCCATGTTAT
35	76	58A1	58	ATATTCTTCAACATGACGTACATATTCCTT
	77	58B1a	58	TCTTCTTTAGTTACTTCAGTGCATAATGTC
	78	58B1b	58	CCTTCCTTAGTTACTTCAGTGCATAATGTC
	79	59A2	59	CTGGCATATTCTTTAAACTGGTAGGTGTG
	80	59B1-AS	59	TCCTGTTTAACTGGCGGTGCGGTGTCCTTT
40	81	59C3_3d	59	GAAGVAGTAGTAGAAGCACACAGAAAGA
	82	59C4	59	TTCTCCACATGTCTGGCATATTCTTTAAA
	83	59C6	59	GTGGTATTCATATTATGAATGTATGACATT
	84	61A1	61	TATATTCAGATACAGGGGGGGATGTAGCAG
	85	61B1	61	ATAACTTGGCATAGCGATCCTCCTTGGGCG
	86	61B2	61	ATATTCCCTAAAGCTTGTGGCTTTATATTC
45	87	62A1	62	GTGGAAGGGGGAGGTAAAAACCCCAAAGTTC
	88	62B1	62	ATACGGGTCCACCTTGGGACGGGTAGGCAG
	89	62B2	62	AAATGTCATTTGCGCATACGGGTCCACCTT
	90	66A1	66	GTTAATGTGCTTTTAGCTGCATTAATAGTC
	91	66B1	66	TGGCGAAGGTATTGATTGATTTACCGKCA
50	92	66B2	66	CACATGGCGAAGGTATTGATTGATTTACG

	93	66C3d	66	CCAATRTTCCAATCGTCTAATAAAGTATTA
	94	66C4	66	CTGTGCTTTTAATATACCTATATTTATCCT
	95	67A1	67	TCTTCCTTTGCTGTTGGAGGGGATGTTTTT
	96	67B1	67	TGGTGTGTATGTATTGCATAACATTTGCAG
5	97	67B2	67	GTTTTCATTTTTGTATGTAGCCTCTGATTT
	98	68A1-AS	68	AGGTGCAGGGGCGTCTTTTGTACATGTAAT
	99	68B1	68	AGCGGTATGTATCTACAAGACTAGCAGATG
	100	68C4b	68	TACATCAGTTGACAATGTTATAGTACACAAC
	101	68C4c	68	TACATCAGTGGATAATGTTATAGTACACAAC
10	102	68C7	68	CAAGACTAGCAGATGGTGGAGGGGCAACAC
	103	69A1	69	ATGGTTTAAAAAGTGGCAGATGCAGATTGTG
	104	69B1	69	TGTGCAGGGGCATCGCGTTGACATGTAGTA
	105	70A1-AS	70	AAACTTTGTAGGGCTATATACAGCAGGTAT
	106	70B1	70	TGGTGGAGGGGTAACCTCTATATTTCCAATT
	107	71A1	71	AATATTCATGAAACTAGAGGCTTTATATG
15	108	71B1	71	TTTTTCTGCAGGAGGAGGACTGTTTTCTG
	109	72A1	72	TCTGATACAGAGGACGCTGTGGCAGTACAA
	110	72B1	72	GTGGCGAAGATACTCACGAAAAATTAGAAGC
	111	73A1	73	TAGAGTTGGCATAACGTTGTAGTAGAGCTAC
	112	73A2	73	GAGTTGGCATAACGTTGTAGTAGAGCTACTA
20	113	73B1	73	AGGAGGTTGAGGACGTTGGCAACTAATAGC
	114	73C3	73	TCCACTCTTCCAATATAGTAGAATTCATAG
	115	73C4	73	TTCTCTAAAGTACCTGACGGTGGTGGGGT
	116	74A1a	74	TTAAATTTGCATAGGGATTGGGCTTTGCTT
	117	74A1b	74	TTAAATTTGCATAGGGATTAGGCTTTGCTT
25	118	74B1a	74	AGCAGAAGGCGATTGTGAGGTAGGAGCACA
	119	74B1b	74	AGCAGGAGGGGATTGTGTAGTAGGCGCACA
	120	81A1	81	TTCTGCAGCAGCAGATGTAGCTGTGCAAAT
	121	81B1	81	CTGTCCAAAAATGACATGTCGGCATAAGGGT
	122	82A2a-AS	82	TGCAACAGATGGAGTAACAGCAGTGCTAAT
	123	82A2b-AS	82	TGCAACTGATGGAGTAGCAGCAGTGCTAAT
30	124	82B1	82	TGTAGAATCCATGGTGTGCAGGTAAGCCAT
	125	83A1	83	TTCATTAGCCTGTGTAGCAGCAGCTGAAAT
	126	83B1d	83	CACTCATCYAATAAATGTTTCATTACATACTAT
	127	84A1	84	ATATTCTGATTTCGGTGTGGTAGCAGCACT
	128	84B1	84	AAATAGGACATGACCTCTGGAGTCAGACGG
35	129	85A1	85	ATATAGATGGAACCTGGATTAGTAGTTGCAG
	130	85B1	85	CCTTTTTTTGTGGAACAACCACATCCTTCT
	131	89A1	89	TCCTTAAAGCGTGTAGAACTGTATTCTGTG
	132	89B1	89	ATCTCAGGCGTTAGGTGTATCTTACATAGT
	133	89C1	89	AATGGCCCCGAGAGGTAAGAAAGCGATAGGT

40

Нуклеотиды этих последовательностей имеют следующие обозначения: G=гуанин, A=аденин, T=тимин, C=цитозин, R=G или A, Y=E или C, M=A или C, K=G или T, S=G или C, W=A или T, H=A или C или T, B=G или T или C, V=G или C или A, D=G или T и, наконец, N=G или A или T или C. Нуклеотиды, используемые в изобретении, могут быть рибонуклеотидами, дезоксирибонуклеотидами и модифицированными нуклеотидами, такими как инозин, или нуклеотидами, содержащими модифицированные группы, которые по существу не изменяют их гибридизационных свойств.

50

Зонды по настоящему изобретению могут быть получены различными способами, такими как химический синтез (например, общепринятым фосфотриэфирным способом), или способами генетической инженерии, например, молекулярным

клонированием рекомбинантных плазмид, в которых были встроены соответствующие нуклеотидные последовательности, и последние могут быть получены расщеплением нуклеазами.

Для некоторых типов HPV зонды конструировали из района последовательности, который содержал отличающиеся нуклеотиды в конкретном положении для различных вариантов указанного типа HPV. В этих случаях, использовали вырожденные зонды, то есть смесь олигонуклеотидов, каждый из которых содержал альтернативные нуклеотиды в указанном положении. Это имеет место для зондов 39C3d [SEQ ID NO:41], 39C4d [SEQ ID NO:43], 45C1d [SEQ ID NO:57], 45C3d [SEQ ID NO:58] 57A1d [SEQ ID NO:74] 59C3_3d [SEQ ID NO:81], 66B1 [SEQ ID NO:91], 66C3d [SEQ ID NO:93] и 83B1d [SEQ ID NO:126]. Альтернативно, эквимолекулярные смеси двух олигонуклеотидов, содержащие точно один и тот же район последовательности, но отличающиеся в нуклеотидном составе для определенных положений, использовали в виде единого зонда (смесь олигонуклеотида 58B1a [SEQ ID NO:77] и 58B1b [SEQ ID NO:78]; 68C4b [SEQ ID NO:100] и 68C4c [SEQ ID NO:101]; 74A1a [SEQ ID NO:116] и 74A1b [SEQ ID NO:117]; 74B1a [SEQ ID NO:118] и 74B1b [SEQ ID NO:119] и смесь олигонуклеотида 82A2a-AS [SEQ ID NO:122] и 82A2b-AS [SEQ ID NO:123]).

Все зонды, описанные в изобретении, испытывали на специфическую гибридизацию с их мишеневыми последовательностями при тех же самых условиях гибридизации в платформе (позиции) «пробирки-микроматрицы». Этот факт делает возможным применение этих зондов для одновременной идентификации 42 различных типов с использованием этой платформы (позиции) микроматрицы. Высокое число типов HPV, идентифицированных с использованием «пробирки-микроматрицы», развитой в данном изобретении, позволяет рассматривать эту методологию также как прямой способ детектирования, так как остальные типы HPV являются клинически нерелевантными.

Одним из слабых моментов диагностических способов являются ложноотрицательные результаты. В случае данного способа ложные отрицательные результаты могут быть обусловлены образцами ДНК плохого качества или присутствием ингибиторов ДНК-полимеразы в анализируемых образцах. Настоящее изобретение иллюстрирует способ устранения этих ложных отрицательных результатов посредством использования двух типов контролей.

Один контроль, состоящий из амплификации собственной ДНК пациента, используют предпочтительно для гарантии хорошего качества образца ДНК. Любой фрагмент последовательности из ДНК человека может быть использован в качестве мишени для этой цели. Фрагмент из однокопийного гена, такого как ген CFTR, считают особенно подходящей мишенью для положительного контроля качества ДНК в данном изобретении. Были сконструированы праймеры CFTR-F4 (SEQ ID NO: 134) и CFTR-R5 (SEQ ID NO:135) для амплификации фрагмента 892 п.н. из гена CFTR. Использование однокопийной против многокопийной мишени и большего размера амплифицированного продукта контроля качества ДНК в сравнении с амплифицированным продуктом HPV, который имеет величину 892 п.н. против 450 п.н., позволило включать праймеры для амплификации CFTR в ту же реакционную смесь, которую использовали для амплификации L1-района генома HPV, с минимальными эффектами конкуренции. Таким образом, контроль качества ДНК может быть выполнен одновременно в той же самой реакционной пробирке, в которой анализируют образец, без влияния на чувствительность детектирования HPV.

Второй контроль может быть использован в качестве положительного контроля

амплификации, который детектирует неуспешность ПЦР-реакции, обусловленную, например, присутствием ингибиторов ДНК-полимеразы. В предпочтительном варианте осуществления, положительный контроль амплификации состоит из рекомбинантной плазмиды, которая может быть амплифицирована с использованием тех же праймеров и тех же условий ПЦР, которые используют для амплификации фрагмента гена CFTR. Как размер, так и внутренняя последовательность относительно этих праймеров являются различными между ПЦР-продуктами, происходящими из амплификации гена CFTR и из амплификации рекомбинантной плазмиды. Таким образом, оба типа продуктов амплификации могут быть легко различены при помощи гель-электрофореза или гибридизации со специфическими зондами. Фиг. 6 показывает схематическое представление рекомбинантной плазмиды pPG44, имеющей эти характеристики.

Плазмиду pPG44 конструировали способами молекулярного клонирования. Коротко, ДНК-инсерт, состоящий из фрагмента 1162 п.н. от положения 124 до положения 1285 вектора pBlueScript® II SK + (Stratagene, La Jolla, CA, USA), фланкированный праймерами CFTR, CFTR-F4 и CFTR-R5, клонировали в pGEM®-T Easy Vector с использованием коммерчески доступного набора из Promega Corporation, Madison, WI, USA. Очищенный препарат полученной рекомбинантной плазмиды pPG44 дополнительно характеризовали с использованием рестрикционных ферментов и анализа последовательности. Плазмиду pPG44 использовали в качестве положительного контроля процесса амплификации в линейаризованной форме.

Присутствие положительного контроля в виде указанной рекомбинантной плазмиды в той же смеси для ПЦР-амплификации, в которой анализируют образец, предотвращает появление ложных отрицательных результатов, т.е. это предотвращает появление отрицательного результата даже в присутствии генома HPV-мишени в этом образце, так как в случае отсутствия генерирования продуктов амплификации следует предположить, что ПЦР-амплификация не работала правильно, и невозможно сделать вывод о присутствии или отсутствии генома HPV в данном образце.

Зонды для специфического детектирования описанных двух типов положительных контролей, то есть контроля качества ДНК и контроля реакции амплификации, обеспечены в таблице 2 (SEQ ID NO:136-139 и SEQ ID NO:145-147). Олигонуклеотидные последовательности без значимой гомологии с любым из амплифицированных продуктов настоящего изобретения также обеспечены в этой таблице 2 (SEQ ID NO: 140-141). При иммобилизации на поверхности этой микроматрицы модифицированные биотином олигонуклеотиды SEQ ID NO:140 и SEQ ID NO:141 служат в качестве положительного контроля реакции детектирования ПЦР-продуктов и в качестве стандарта позиционирования, так что может быть определено местоположение всех остальных зондов.

Таблица 2

SEQ ID NO	Название зонда	Тип контроля	Последовательность (5'→3')
136	CFTR-A1-AS	Качество ДНК образца	TTCTCCACCCCACTACGCACCCCGCCAGCA
137	CFTR-B3	Качество ДНК образца	GGGCTCAAGCTCCTAATGCCAAAGACCTACTACTCTG
145	CFTR-B1-AS	Качество ДНК образца	CAAGCTCCTAATGCCAAAGACCTACTACTC
146	CFTR-B2	Качество ДНК образца	GGGCTCAAGCTCCTAATGCCAAAGACCTACTACTC
138	CIA1-AS	ПЦР-реакция	CTCATTTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTAT
139	CIA2-AS	ПЦР-реакция	TCACTCATTTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATG
147	CIA3-AS	ПЦР-реакция	GAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGAC

140	Маркер-1	Детектирование & местоположение	GCAGTATAAGATTATTGATGCCGGAAC
141	Маркер-2	Детектирование & местоположение	GTCAAAACCTGGGATAGTAGTTTТАСС

Данное изобретение относится также к *in vitro* диагностическому набору для специфического детектирования типов HPV в клинических образцах.

Предпочтительно, указанный набор может включать в себя любой из следующих компонентов или все следующие компоненты: смесь для амплификации, в том числе буфер для амплификации, dNTP, праймеры и контрольную плазмиду; промывочный буфер; реагенты детектирования; пробирку-микроматрицу, включающую в себя твердый носитель, включающий в себя HPV-типоспецифические зонды; реагенты для получения и приготовления образца. Конкретные компоненты будут зависеть от точных условий, при которых должен быть использован этот набор, хотя квалифицированный в данной области специалист сможет определить подходящие компоненты набора и буферные композиции.

ПРИМЕРЫ

Примеры, представленные ниже, даны только для иллюстрации изобретения и никаким образом не ограничивают объем сопроводительной формулы изобретения.

ПРИМЕР 1: получение «пробирок-микроматриц»

«Пробирки-микроматрицы» по изобретению были получены в CLONDIAG chip Technologies GmbH (Jena, Germany) следующим образом. Стандартную реакционную тест-пробирку Eppendorf из полипропилена и имеющую номинальный вмещаемый объем 1,5 мл, модифицировали переплавкой, создавая открытое углубление для носителя микроматрицы с адгезивным краем в пробирке.

Микроматрицы, которые вставляли в эти пробирки, получали с использованием MicroGrid II Arrayer (BioRobotics, Cambridge, Great Britain). Зонды, состоящие из модифицированных на 5'-амино-конце олигонуклеотидов, имеющих последовательность из списка последовательностей, помещали в определенных участках на поверхности эпоксицированного предметного стекла (размер предметного стекла: 75 мм × 25 мм) и ковалентно иммобилизовали. Единая микроматрица включала в себя 12×10=120 или 12×11=132 конкретных положений, в которые могли быть помещены олигонуклеотиды. Эти положения имеют промежутки 0,2 мм, так что ДНК-библиотека, включенная в каждую микроматрицу, покрывала площадь 2,4 мм × 2,4 мм, и, в целом, более 100 идентичных ДНК-библиотек могли бы быть получены таким образом на одном предметном стекле. В зависимости от типа эксперимента, либо единственный зонд, либо смесь зондов могли быть помещены в каждое из этих положений. Обычно, единственные зонды помещали в каждое местоположение при проведении экспериментов по специфичности и чувствительности для отбора зондов. После валидации этих зондов смеси зондов, способных гибридизоваться в отдельных районах амплифицированного продукта конкретного типа HPV, могли быть помещены в то же самое местоположение при выполнении анализов идентификации генотипов HPV. На фиг. 1-5 показано различное положение зондов в микроматрицах, используемое в настоящем изобретении. В каждую микроматрицу включали два или три повтора для каждого зонда или каждой смеси зондов.

Кроме специфических зондов для генотипирования HPV и для контроля детектирования амплификации и контроля адекватности ДНК, микроматрицы включали в себя ссылочные маркеры в нескольких местоположениях, состоящие из модифицированных на 5'-конце биотином олигонуклеотидов (Маркер-1 [SEQ ID NO:

140] и Маркер-2 [SEQ ID NO:141]) без значимой гомологии с любой из амплифицированных последовательностей из этого изобретения. Эти ссылочные маркеры служили как для подтверждения правильного осуществления реакции детектирования, так и для оптической ориентации изображения ридером, так чтобы местоположение всех остальных зондов могли быть определены и данные могли быть анализированы.

Все олигонуклеотиды были помещены на предметное стекло от 1× QMT Spotting Solution I (Quantifoil Micro Tools GmbH, Jena, Germany). Общая концентрация олигонуклеотидов в каждом растворе для нанесения пятен находится в диапазоне от 2,5 мкМ для ссылочных маркеров до 20 мкМ для специфических зондов. Затем олигонуклеотиды ковалентно связывали с эпоксигруппами на поверхности стекла термообработкой при 60°C в течение 30 минут с последующим многостадийным процессом промывки. Высушенные предметные стекла нарезают на кусочки стекла 3,15 мм × 3,15 мм, которые, строго говоря, и являются тем, что авторы называют микроматрицами. Затем, в конечной стадии изготовления «пробирок-микроматриц» эти микроматрицы вставляют в вышеуказанные модифицированные пробирки Эппендорфа и приклеивают к адгезивному краю. Фиг.7 показывает фотографию «пробирки-матрицы», изготовленной, как описано в данном примере.

ПРИМЕР 2: получение образцов ДНК

2.1. ДНК-стандарты HPV

ДНК HPV, используемыми для оценки специфичности и чувствительности типоспецифических зондов, были либо рекомбинантные плазмиды, содержащие амплифицированный L1-район (типы HPV 6, 11, 13, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 61, 62, 66, 68, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, 85 и 89), либо ДНК, экстрагированные из клинических образцов, которые амплифицировали L1-район и были дополнительно охарактеризованы секвенированием ДНК. Рекомбинантные плазмиды конструировали способами молекулярного клонирования. Коротко, амплифицированный L1-район из каждого типа HPV клонировали в pGEM®-T Easy Vector с использованием коммерчески доступного набора из Promega Corporation, Madison, WI, USA. Очищенный препарат, полученный из каждой рекомбинантной плазмиды, дополнительно характеризовали анализом последовательности. 1-10 пг плазмидной ДНК использовали в оценке экспериментов по специфичности.

ДНК клеточной линии K562 (Catalogue No. DD2011, Promega Corporation, Madison, WI, USA) использовали для оценки специфичности и чувствительности CFTR-специфических зондов.

2.2. Клинические образцы

Для детектирования HPV необходимо прежде всего отделить ДНК от остального биологического материала. Процедуры получения ДНК изменяются в зависимости от источника образцы. Конкретные примеры представлены для получения ДНК из образцов из различных источников:

А. Мазки: образцы брали чистым, сухим хлопчатобумажным тампоном. Клетки из клинических мазков извлекали добавлением 1,5 мл солевого раствора непосредственно в контейнер с образцом и интенсивным встряхиванием на вортексе. Материал образца переносили в пробирку Эппендорф на 1,5 мл и осаждали центрифугированием. Супернатант отбрасывали и осажденные клетки суспендировали в 100 мкл лизисного буфера, содержащего 10 мМ Трис-HCl (pH 9,0 при 25°C) 50 мМ KCl, 0,15 мМ MgCl₂, 0,1% Тритон® X-100, 0,5% Твин 20 и 0,25 мг/мл протеиназы К. Смесь инкубировали при 56°C в течение приблизительно 2 часов и протеиназу К

инактивировали нагреванием инкубированием этой смеси при 100°C в течение 10 минут. Детрит осаждали центрифугированием и супернатант переносили в чистую и стерильную пробирку. В ПЦР-реакции использовали аликвоту 5 мкл.

В. Суспензии клеток: этот тип образца относится к образцам, используемым в цитологических тестах на основе мочеочно-влагалищной жидкости. Мочечные пробы брали кистью или шпателем и ресуспендировали в растворе PreservCyt (Cytus Corp., Marlborough, MA, USA). Аликвоту 1 мл центрифугировали и осадок ресуспендировали в 100 мкл лизисного буфера, такого же, какой использовали с образцами мазков в параграфе А, и протокол продолжали таким же образом, как описано в указанном разделе.

С. Фиксированные формалином и залитые в парафин биопсии: несколько срезов тканей шириной 5 мкм использовали в данном способе, обычно 2-5 срезов, в зависимости от площади поверхности из этой биопсии. Срезы помещали в стерильную пробирку на 1,5 мл и добавляли 100 мкл лизисного буфера, такого же, какой использовали с образцами мазков в параграфе А. Протокол продолжали таким же образом, как описано в указанном разделе, за исключением того, что обработку протеиназой К проводили в течение 3 часов.

Альтернативно, коммерческий набор (NucleoSpin® Tissue kit Catalogue No. 635966 из BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA, USA), предназначенный для выделения ДНК из образцов из различных источников, использовали для обработки мазков, суспензий клеток или фиксированных формалином или залитых в парафин образцов биопсий. В этом случае, начало протокола выделения ДНК было таким же, какое описано в разделах А, В и С. Вместо 100 мкл лизисного буфера к образцу добавляли 180 мкл Буфера Т1. Протокол продолжали в соответствии с указаниями изготовителя для выделения геномной ДНК из клеток и ткани.

Независимо от того, использовали ли этот тип клинического образца или этот способ получения ДНК, отрицательные контроли обрабатывали параллельно с каждой серией образцов. Эти отрицательные контроли, состоящие из 1 мл солевого раствора, обрабатывали таким же образом, какой описан в разделе А.

ПРИМЕР 3: ПЦР-амплификация

ПЦР-амплификацию выполняли с использованием консенсусных праймеров MY11 и MY09 (Manos et al., Molecular Diagnostics of Human Cancer; Furth M, Greaves MF, eds.; Cold Spring Harbor Press, 1989, vol. 7: 209-214). Третий праймер, HMB01, который часто используют в комбинации с MY09 и MY11 для амплификации типа 51 HPV, который не амплифицируется эффективно только с MY09 и MY11 (Hildesheim et al., J Infect Dis. 1994, 169: 235-240), также включали в ПЦР-реакцию. Коротко, ПЦР-реакцию проводили в конечном объеме реакции 50 мкл, содержащем 10 mM Трис-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0,3 мкМ каждый праймер MY09 и MY11 (SEQ ID NO:142 и 143), 0,03 мкМ праймер HMB01 (SEQ ID NO:144) 200 мкМ каждый dNTP, 4 единицы AmpliTaq Gold ДНК-полимеразы (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) и 5 мкл каждого стандарта ДНК HPV из примера 2.1 или ДНК клинического образца из примера 2.2. Для тестирования пригодности ДНК образца 0,08 мкМ каждого праймера CFTR-F4 и CGTR-R5 (SEQ ID NO:134 и 135) также добавляли к реакционной смеси. Дополнительно, для проверки процесса амплификации и элиминации ложных отрицательных результатов вследствие неуспешности реакции 20 фг внутреннего контроля pPG44 включали в ту же самую реакционную пробирку, в которой анализировали эти образцы. Все прямые праймеры, использованные в ПЦР-реакции (MY11 [SEQ ID NO:143] и CFTR-F4 [SEQ ID NO:134]), были модифицированы

биотином на 5'-конце таким образом, что любая амплифицированная ДНК могла быть затем детектирована.

Отрицательные контроли, состоящие из 5 мкл слепых образцов из примера 2.2, или 5 мкл деионизованной воды, обрабатывали параллельно с ДНК образцов.

Применение этих типов отрицательных контролей служит для подтверждения, что загрязнения нет ни в одной точке манипулирования с образцом или в установке ПЦР-реакции и что все положительные результаты представляют истинное присутствие ДНК в конкретном образце.

ПЦР-реакции проводили в термоциклере Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany), программируемом со следующим профилем циклов: один начальный цикл денатурации при 95°C в течение 9 минут, 45 циклов 30 секунд при 94°C, 60 секунд при 55°C и 90 секунд при 72°C, и один конечный цикл удлинения при 72°C в течение 8 минут. После амплификации 5 мкл каждой реакционной смеси использовали для последующего детектирования со специфическими зондами.

ПРИМЕР 4: одновременная идентификация генотипов HPV с использованием «пробирок-микроматриц»

«Пробирки-микроматрицы» предварительно промывали непосредственно перед использованием добавлением 300 мкл 0,5х ЗФР-Твин 20-буфера в каждую пробирку и перевертыванием пробирок несколько раз. Всю жидкость изнутри каждой пробирки удаляли с использованием пастеровской пипетки с вакуумной системой.

Реакции амплификации из примера 3 денатурировали нагреванием их до 95°C в течение 10 минут и, сразу же после этого, охлаждением их в течение 5 минут на льду. Пять микролитров денатурированной реакции амплификации вносили в «пробирку-микроматрицу», приготовленную в примере 1, вместе с 100 мкл раствора для гибридизации (200 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 7,2; 1х SSC; 0,2% Тритон® X-100; 1 мМ ЭДТА, pH 8,0). Реакцию гибридизации проводили в Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg, Germany) инкубированием «пробирок-микроматриц» при 55°C в течение одного часа при встряхивании при 550 об/мин. После периода инкубирования реакцию гибридизации удаляли Пастеровской пипеткой, присоединенной к вакуумной системе, и проводили стадию промывания 300 мкл 0,5х ЗФР-Твин 20-буфера.

Гибридизованную ДНК детектировали инкубированием в 100 мкл раствора 0,075 мкг/мл Поли-HRP-стрептавидина (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, USA) при 30°C в течение 15 минут со встряхиванием при 550 об/мин. Затем всю жидкость из «пробирки-микроматрицы» быстро удаляли и проводили две стадии промывки, как указано выше. Реакцию развития окраски выполняли в 100 мкл субстрата пероксидазы True Blue™ (KPL, Gaithersburg, MD, USA), который состоит из забуференного раствора, содержащего 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (TMB) и H₂O₂, инкубированием при 25°C в течение 10 минут. Окрашенные осадки, полученные таким образом, вызывают изменения в прозрачности для света в конкретных местоположениях микроматрицы, которые могут быть считаны с использованием ATR01- или ATS-ридера, изготавливаемого CLONDIAG chip technologies GmbH (Jena, Germany). Необязательно, ATS-ридер может иметь специальную программу, установленную для автоматической обработки результата анализа образцов, полученного с использованием «пробирки-микроматрицы», разработанной в данном изобретении.

Формула изобретения

1. Способ детектирования и типирования папилломавируса человека (HPV) в

образце, включающий:

осуществление реакции амплификации нуклеиновых кислот в образце, причем реакция амплификации предназначена для амплификации мишени последовательности HPV неспецифическим для типа образом;

получение одноцепочечных олигонуклеотидов из любых продуктов амплификации; осуществление гибридизации одноцепочечных олигонуклеотидов с множеством HPV-типоспецифических зондов, выбранных из группы, содержащей SEQ ID NO:1 - SEQ ID NO:133, и отобранных по типу, как указано в таблице 1, находящихся на твердом носителе, причем носитель расположен в реакционном сосуде, подходящем для этого образца; и детектирование гибридизованных олигонуклеотидов, если HPV присутствует в образце.

2. Способ по п.1, где указанные HPV-типоспецифические зонды содержат ДНК.

3. Способ по п.1, где стадию амплификации нуклеиновых кислот осуществляют в образце в реакционном сосуде в контакте с HPV-типоспецифическими зондами на твердом носителе.

4. Способ по п.1 или 2, где стадию амплификации нуклеиновых кислот осуществляют в образце перед введением амплифицированного образца в реакционный сосуд для контакта с HPV-типоспецифическими зондами на твердом носителе.

5. Способ по п.1 или 3, где зонды выбраны для специфического связывания с мишени последовательностью HPV при одних и тех же условиях гибридизации для всех зондов.

6. Способ по п.1 или 3, где используют зонды, специфические по меньшей мере для 20 типов HPV.

7. Способ по п.1 или 3, где используют зонды, специфические по меньшей мере для 20 типов HPV 6, 11, 16, 18, 26, 30, 31, 32, 33, 34/64, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 57, 58, 59, 61, 62, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 81, 82, 83, 84, 85 и 89.

8. Способ по п.1 или 3, где длина зондов выбрана из группы, состоящей 20-40 нуклеотидов, длину 25-35 нуклеотидов, длину 28-32 нуклеотида или длину приблизительно 30 нуклеотидов.

9. Способ по п.1 или 3, где множество зондов выбрано из одного или нескольких следующих групп SEQ ID NO: 1 или 2; 3 или 4; 5-9; 10-13; 14-18; 19, 20 или 21; 22-25; 26 или 27; 28-31; 32 или 33; 34-37; 38-43; 44 или 45; 46-50; 51 или 52; 53 или 54; 55-59; 60-64; 65 или 66; 67 или 68; 69, 70 или 71; 72 или 73; 74 или 75; 76, 77 или 78; 79-83; 84, 85 или 86; 87, 88 или 89; 90-94; 95, 96 или 97; 98-102; 103 или 104; 105 или 106; 107 или 108; 109 или 110; 111-115; 116-119; 120 или 121; 122, 123 или 124; 125 или 126; 127 или 128; 129 или 130; 131, 132 или 133.

10. Способ по п.9, где зонд выбран из каждой указанной группы.

11. Способ по п.9, где каждый зонд выбран из указанных групп и по меньшей мере один зонд выбран из каждой указанной группы.

12. Способ по п.9, где два или более зондов выбраны из каждой из указанных групп.

13. Способ по п.1 или 3, где эти зонды выбраны из следующих SEQ ID NO:2, 4, 7, 8, 9, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 25, 26, 27, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 40, 41, 42, 43, 45, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 57, 58, 59, 61, 62, 63, 64, 66, 67, 68, 70, 71, 73, 74, 75, 76, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 112, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 124, 126, 128, 129, 130, 131, 132, 133.

14. Способ по п.1 или 3, где множество зондов специфично в отношении одного и того же типа HPV.

15. Способ по п.1 или 3, где множество зондов специфично в отношении каждого подлежащего детектированию типа HPV.

16. Способ по п.1 или 3, где каждый из указанного множества зондов иммобилизован в одном и том же участке твердого носителя.

17. Способ по п.1 или 3, где каждый из указанного множества зондов иммобилизован в отличающемся участке твердого носителя.

18. Способ по п.1 или 3, где каждый зонд, специфический в отношении одного и того же типа HPV, детектирует отличающуюся часть мишени последовательности HPV.

19. Способ по п.1 или 3, где по меньшей мере один зонд присутствует на твердом носителе по меньшей мере в двух разных местоположениях.

20. Способ по п.1 или 3, где все зонды присутствуют на твердом носителе по меньшей мере в двух разных местоположениях.

21. Способ по п.1, дополнительно предусматривающий детектирование одной или нескольких контрольных последовательностей.

22. Способ по п.1, дополнительно предусматривающий амплификацию известной контрольной последовательности и детектирование продукта амплификации.

23. Способ по п.1 или 22, предусматривающий объединение смеси реакции амплификации с образцом для выполнения реакции амплификации.

24. Способ по п.1, где одноцепочечные олигонуклеотиды получают денатурацией любых присутствующих двухцепочечных олигонуклеотидов.

25. Способ по п.24, где указанную стадию денатурации проводят в образце, содержащемся в реакционном сосуде.

26. Способ по п.24, где одноцепочечные олигонуклеотиды гибридизируют в жестких условиях.

27. Реакционный сосуд для осуществления анализа детектирования и типирования HPV в образце, отличающийся тем, что сосуд содержит твердый носитель, имеющий множество HPV-типоспецифических зондов, выбранных из группы, содержащей SEQ ID NO:1 - SEQ ID NO:133, иммобилизованных на нем, и подходит для приведения образца в контакт с твердым носителем.

28. Сосуд по п.27, где сосуд подходит для проведения реакции амплификации нуклеиновых кислот образца при контакте с твердым носителем.

29. Сосуд по п.27 или 28, где зонды выбраны для специфического связывания мишеневых последовательностей HPV при одних и тех же условиях гибридизации для всех зондов.

30. Сосуд по п.27 или 28, где зонды выбраны для специфического связывания мишеневых последовательностей HPV в образце, содержащем реакционную смесь, подходящую для проведения реакции амплификации нуклеиновых кислот.

31. Сосуд по п.27 или 28, где указанные HPV-типоспецифические зонды содержат ДНК.

32. Сосуд по п.27 или 28, содержащий зонды, специфические по меньшей мере для 20 типов HPV.

33. Сосуд по п.27, содержащий зонды, специфические по меньшей мере для 20 типов HPV 6, 11, 16, 18, 26, 30, 31, 32, 33, 34/64, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 57, 58, 59, 61, 62, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 81, 82, 83, 84, 85 и 89.

34. Сосуд по п.27 или 33, где эти зонды имеют длину 20-40 нуклеотидов, длину 25-35

нуклеотидов, длину 28-32 нуклеотида или длину приблизительно 30 нуклеотидов.

35. Сосуд по п.27, где множество зондов выбрано из одного или нескольких из следующих групп SEQ ID NO:1 или 2; 3 или 4; 5-9; 10-13; 14-18; 19, 20 или 21; 22-25; 26 или 27; 28-31; 32 или 33; 34-37; 38-43; 44 или 45; 46-50; 51 или 52; 53 или 54; 55-59; 60-64; 65 или 66; 67 или 68; 70 или 71; 72 или 73; 74 или 75; 76, 77 или 78; 79-83; 84, 85 или 86; 87, 88 или 89; 90-94; 95, 96 или 97; 98-102; 103 или 104; 105 или 106; 107 или 108; 109 или 110; 111-115; 116-119; 120 или 121; 122, 123 или 124; 125 или 126; 127 или 128; 129 или 130; 131, 132 или 133.

36. Сосуд по п.27 или 35, где зонд выбран из каждой из указанных групп.

37. Сосуд по п.27 или 35, где каждый зонд выбран из указанных групп и по меньшей мере один зонд выбран из каждой из указанных групп.

38. Сосуд по п.27 или 35, где два или более зондов выбраны из каждой из указанных групп.

39. Сосуд по п.27, где эти зонды выбраны из следующих SEQ ID NO: 2, 4, 7, 8, 9, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 25, 26, 27, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 40, 41, 42, 43, 45, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 57, 58, 59, 61, 62, 63, 64, 66, 67, 68, 70, 71, 73, 74, 75, 76, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 112, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 124, 126, 128, 129, 130, 131, 132, 133.

40. Сосуд по п.27 или 39, где множество зондов специфично в отношении одного и того же типа HPV.

41. Сосуд по п.27 или 39, где множество зондов специфично в отношении каждого подлежащего детектированию типа HPV.

42. Сосуд по п.27 или 39, где каждый из указанного множества зондов иммобилизован в одном и том же участке твердого носителя.

43. Сосуд по п.27 или 39, где каждый из указанного множества зондов иммобилизован в отличающемся участке твердого носителя.

44. Сосуд по п.27 или 39, где каждый зонд, специфический в отношении одного и того же типа HPV, детектирует отличающуюся часть последовательности-мишени HPV.

45. Сосуд по п.27 или 39, где по меньшей мере один зонд присутствует на твердом носителе по меньшей мере в двух разных местоположениях.

46. Сосуд по п.27 или 39, где все зонды присутствуют на твердом носителе по меньшей мере в двух разных местоположениях.

47. Сосуд по п.27, дополнительно содержащий одну или несколько контрольных последовательностей на твердом носителе.

48. Сосуд по п.47, где контрольная последовательность содержит зонд, иммобилизованный на твердом носителе, который не гибридизуется с мишенивой последовательностью из любого типа HPV.

49. Набор для детектирования и типирования HPV, содержащий реакционный сосуд по п.27, вместе с одним или несколькими из следующих компонентов:

- i) реагенты для экстракции и/или очистки ДНК;
- ii) смесь для амплификации нуклеиновых кислот;
- iii) реагенты для визуализации гибридизации нуклеиновых кислот с зондами реакционного сосуда.

50. Набор по п.49, где смесь для амплификации находится в реакционном сосуде, отдельном от реакционного сосуда, содержащего твердый носитель с HPV-типоспецифическими зондами.

51. Набор по п.49, где смесь для амплификации находится в реакционном сосуде,

содержащем твердый носитель с HPV-типоспецифическими зондами.

52. Набор по п.49, где смесь для амплификации содержит меченые dNTP.

53. Набор по п.49, где смесь для амплификации содержит консенсусные праймеры HPV, которые гибридизуются с частями мишени

последовательности HPV.

54. Набор по п.53, где консенсусные праймеры HPV включают в себя MY09 и MY11 и, необязательно, HMB01.

55. Набор по п.50, где смесь для амплификации содержит праймеры для амплификации мишени последовательности человека.

56. Набор по п.55, где мишени последовательности человека имеют другую длину, чем длина мишени последовательности HPV.

57. Набор по п.55, где мишени последовательности человека являются по меньшей мере частью гена CFTR.

58. Набор по п.55, где эти праймеры содержат по меньшей мере один из CFTR-F4 (SEQ ID NO:134) и CFTR-R5 (SEQ ID NO:135).

59. Набор по п.53, где эти праймеры являются мечеными праймерами.

60. Набор по п.50, содержащий контрольную мишени последовательности амплификации.

61. Набор по п.60, где контрольная мишени последовательности амплификации включает в себя последовательности, соответствующие фланкирующим частям мишени последовательности человека, так что амплификация обеих мишени последовательностей будет происходить с использованием одних и тех же праймеров.

62. Зонд для детектирования и типирования HPV, причем зонд выбран из SEQ ID NO:1-133.

63. Зонд по п.62, выбранный из следующих SEQ ID NO: 2, 4, 7, 8, 9, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 25, 26, 27, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 40, 41, 42, 43, 45, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 57, 58, 59, 61, 62, 63, 64, 66, 67, 68, 70, 71, 73, 74, 75, 76, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 112, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 124, 126, 128, 129, 130, 131, 132, 133.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> GENOMICA S.A.U.
 <120> IN VITRO ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ НАБОР ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ
 ПАПИЛЛОМАВИРУСА ЧЕЛОВЕКА В КЛИНИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ
 <130> GBP290470
 <160> 141
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> Зонд
 <400> 1
 tgtatgtgga agatgtagtt acggatgcac 30
 <210> 2
 <211> 31
 <212> ДНК
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Зонд
 <400> 2
 catgacgcac gtactcttta taatcagaat t 31
 <210> 3
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> Зонд
 <400> 3
 tgtatgtagc agatttagac acagatgcac 30
 <210> 4
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> Зонд
 <400> 4
 catggcgcat gtattcctta taatctgaat 30
 <210> 5
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Зонд

 <400> 5
 gtagatatgg cagcacataa tgacatatat 30

 <210> 6
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 6
 ttctgaagta gatatggcag cacataatga 30

 <210> 7
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 7
 aactgtgcaa aataacctta actgcagacg 30

 <210> 8
 <211> 31
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 8
 atacatacat tctatgaatt ccactatttt g 31

 <210> 9
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 9
 cccaggaggc acactagaag atacttatag 30

 <210> 10
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 10

atcatattgc ccaggtagag gagactgtgt 30

<210> 11
 <211> 29
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Зонд

<400> 11
 cttattttca gccggtgcag catcctttt 29

<210> 12
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Зонд

<400> 12
 gaatagcagt attttagagg attggaactt 30

<210> 13
 <211> 31
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Зонды

<400> 13
 agtttaaagtt ttggaatgtg gatttaaagg a 31

<210> 14
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Зонд

<400> 14
 tggtttaaat ggaagtggatg sagatgctgc 30

<210> 15
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Зонд

<400> 15
 atcttccttt ggcacaggag gggcgttacg 30

<210> 16
 <211> 30

<212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 16
 аасааттат аагасатггс гаагаататг 30

 <210> 17
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 17
 асатттаатг аатгсстгсса таттггггга 30

 <210> 18
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 18
 гтаасгсссс тсстгтгсса аaggаagatc 30

 <210> 19
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 19
 сттгтггсag ctgggggtga саатссаата 30

 <210> 20
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 20
 gataacgttt gtgtggttgc agatatagtc 30

 <210> 21
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

<400> 21
 ttccagccct caagtaaagt ggagttcata 30

<210> 22
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Зонд

<400> 22
 tgtagtatca ctgtttgcaa ttgcagcaca 30

<210> 23
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Зонд

<400> 23
 agaacctgag ggagggtgtg tcaatccaaa 30

<210> 24
 <211> 33
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Зонд

<400> 24
 taaagagtat ttaagacatg gtgaggaatt tga 33

<210> 25
 <211> 31
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Зонд

<400> 25
 catatattca cagtatgaat cctgctattt t 31

<210> 26
 <211> 32
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Зонд

<400> 26
 agttagtaga cttgtatgtg tcttcagttg tt 32

<210> 27
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 27
 ttccsaaaat gaatagtcag aaaaaggatc 30

<210> 28
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 28
 tactgtcact agttacttgt gtgcataaag 30

<210> 29
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 29
 gtatatattac ctaagggggtc ttccttttcc 30

<210> 30
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 30
 aaaggaagac cccttaggta aatatacatt 30

<210> 31
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 31
 caactatgca aagttacctt aactgcagaa 30

<210> 32
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Зонд

 <400> 32
 atatggtgga gttgtacttg tggatttgtt 30

 <210> 33
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 33
 tccttaggag gttgcggacg ctgacatgta 30

 <210> 34
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 34
 gtcactagaа gacacagcag aacacacaga 30

 <210> 35
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 35
 aatggatcat ctttaggttt tgggtgactg 30

 <210> 36
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 36
 gtaccttaga ggacacatat cgctatgtaa 30

 <210> 37
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 37
 atgiaacatc acaggctgta acttgtaaaa 30

<210> 38
 <211> 31
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 38
 ggtatggaag actctataga ggtagataat g 31

<210> 39
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 39
 gtatctgtaa gtgtctacca aactggcaga 30

<210> 40
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 40
 gtagtaccaa ctttacatta tctacctcta 30

<210> 41
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 41
 ataucaggca cgtggaggag tatgatttac 30

<210> 42
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 42
 aactgtgtac tgtcacatta acaactgatg 30

<210> 43
 <211> 30
 <212> ДНК

<213> Искусственная
 <220>
 <223> Зонд
 <400> 43
 aactgtgtac tgtmacatta acaactgatg 30
 <210> 44
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> Зонд
 <400> 44
 cttgaaatta ctgttattat atggggttgg 30
 <210> 45
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> Зонд
 <400> 45
 cctccaaca cgtaggatcc attgcatgaa 30
 <210> 46
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> Probe
 <400> 46
 gtatatgtat caccagatgt tgcagtgga 30
 <210> 47
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> Зонд
 <400> 47
 tagcctgaca gcgaatagct tctgattgta 30
 <210> 48
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> Зонд

<400> 48
gtatgtacaa tcagaagcta ttcgctgtca 30

<210> 49
<211> 31
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Зонд

<400> 49
tacacaatat gaatcctaac atattagagg a 31

<210> 50
<211> 30
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Зонд

<400> 50
gttgcaccac caccctcagg aactttagaa 30

<210> 51
<211> 30
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Зонд

<400> 51
atatgtactg ggcacagtag ggtcagtaga 30

<210> 52
<211> 30
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Зонд

<400> 52
aacacagaggc aggtggggac acaccaaaat 30

<210> 53
<211> 30
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Зонд

<400> 53
tatatgtaga cggaggggac tgtgtagtgg 30

<210> 54

<211> 31
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 54
 cgcacgtatt gcttatattg ttcactagta t 31

 <210> 55
 <211> 29
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 55
 ctgccttttct ggagggtgtag taccctttt 29

 <210> 56
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 56
 ggacacaggat ttgtgtaga ggcacataat 30

 <210> 57
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 57
 atgaucctac taagtttaag cactatagta 30

 <210> 58
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 58
 tmcctccacc acctactaca agtttrgtgg 30

 <210> 59
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>

<223> Зонд
 <400> 59
 tcgttttgtg caatcagttg ctgttacctg 30

 <210> 60
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> Зонд
 <400> 60
 taaatgttgg ggaaccgca gcagtggcag 30

 <210> 61
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> Зонд
 <400> 61
 tggagggtg tccttttgac agctagtagc 30

 <210> 62
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> Зонд
 <400> 62
 ggcttattca cacacaatgg atcctaccat 30

 <210> 63
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> Зонд
 <400> 63
 acaatggatc ctaccattct tgaacagtgg 30

 <210> 64
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> Зонд
 <400> 64
 gattaacatt acctccgtct gctagtgttg 30

<210> 65
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223>

 <400> 65
 ttatatgtgc ttctcttttt aacctcagca 30

 <210> 66
 <211> 29
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 66
 gtgtctctcca aagatgcaga cggcgggtgg 29

 <210> 67
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 67
 aacctcagca gacagggata tttacatag 30

 <210> 68
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 68
 aagctagtgg caacaggagg cgcacaacct 30

 <210> 69
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 69
 gctatcctgc gtggatgctg tagcacaca 30

 <210> 70
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Зонд

 <400> 70
 aactacttgt agctgggggg gttataccaa 30

 <210> 71
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 71
 atctgctgta agggttatgg tacataactg 30

 <210> 72
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 72
 tgtctaagggt actgattaat ttttcgtgca 30

 <210> 73
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 73
 tttatcttct aggcgtgtgg ccactggcgg 30

 <210> 74
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 74
 tataattagt ttctgtgktt acagtggcac 30

 <210> 75
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 75

agtcctcttag caaccgcgca tccatgttat 30

<210> 76
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Зонд

<400> 76
 atattcttca acatgacgta catattcctt 30

<210> 77
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Зонд

<400> 77
 tcttctttag ttacttcagt gcataatgtc 30

<210> 78
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Зонд

<400> 78
 ccttccttag ttacttcagt gcataatgtc 30

<210> 79
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Зонд

<400> 79
 ctggcatatt ctttaaaact ggtaggtgtg 30

<210> 80
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Зонд

<400> 80
 tccctgtttaa ctggcgggtgc ggtgtccttt 30

<210> 81
 <211> 30

<212> ДНК
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> Зонд
 <400> 81
 tctttctgtg tgtgcttcta ctactbcttc 30

<210> 82
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> Зонд
 <400> 82
 tttaaagaat atgccaagaca tgtggaggaa 30

<210> 83
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> Зонд
 <400> 83
 aatgtcatac attcataata tgaataccac 30

<210> 84
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> Зонд
 <400> 84
 tatattcaga tacaagggggg gatgtagcag 30

<210> 85
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> Зонд
 <400> 85
 ataacttgge atagcgatcc tccttgggag 30

<210> 86
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> Зонд

<400> 86
 atattcccta aagcttgtgg ctttatattc 30

<210> 87
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Зонд

<400> 87
 gtggaagggg gaggtaaaac cccaaagttc 30

<210> 88
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Зонд

<400> 88
 atacgggtcc accttgggac gggtaggcag 30

<210> 89
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Зонд

<400> 89
 aaatgtcatt tgcgcatacg ggtccacctt 30

<210> 90
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Зонд

<400> 90
 gttaatgtgc ttttagctgc attaatagtc 30

<210> 91
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Зонд

<400> 91
 tggcgaagggt attgattgat ttcacgkgsa 30

<210> 92
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 92
 cacatggcga aggtattgat tgatttcacg 30

 <210> 93
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 93
 taataacttta ttagacgatt ggaayattgg 30

 <210> 94
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 94
 aggataaata taggtatatt aaaagcacag 30

 <210> 95
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 95
 tcttcctttg ctgttgagg ggaatgtttt 30

 <210> 96
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 96
 tgggtgtgtat gtattgcata acatttgcag 30

 <210> 97
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Зонд

 <400> 97
 gtttttcattt ttgtatgtag cctctgattt 30

 <210> 98
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 98
 aggtgcaggg gcgtctttt gacatgtaat 30

 <210> 99
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 99
 agcggtatgt atctacaaga ctacagatg 30

 <210> 100
 <211> 31
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 100
 gttgtgtact ataacattgt caactgatgt a 31

 <210> 101
 <211> 31
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 101
 gttgtgtact ataacattat caactgatgt a 31

 <210> 102
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 102
 gtgttgccc tccaccatct gctagtcttg 30

<210> 103
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 103
 atggttttaa agtggcagat gcagattgtg 30

<210> 104
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 104
 tgtgcagggg catcgcggtg acatgtagta 30

<210> 105
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 105
 aaactttgta gggctatata cagcaggat 30

<210> 106
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 106
 tgggtggagg gtaactccta tattccaatt 30

<210> 107
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 107
 aatattccat gaaactagag gctttatatg 30

<210> 108
 <211> 30
 <212> ДНК

<213> Искусственная
 <220>
 <223> Зонд
 <400> 108
 tttttctgca ggaggaggac tgtttttctg 30

<210> 109
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> Зонд
 <400> 109
 tctgatacag aggacgctgt ggcagtacaa 30

<210> 110
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> Зонд
 <400> 110
 gtggcgaaга tactcacgaa aattagaagc 30

<210> 111
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> Зонд
 <400> 111
 tagagtgggc atacgttgta gtagagctac 30

<210> 112
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> Зонд
 <400> 112
 gagtggcat acgttgtagt agagctacta 30

<210> 113
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> Зонд

<400> 113
 aggaggttga ggacgttggc aactaatagc 30

<210> 114
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Зонд

<400> 114
 ctatgaattc tactatattg gaagagtggc 30

<210> 115
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Зонд

<400> 115
 accccaccac cgtcaggtac tttagaggaa 30

<210> 116
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Probe

<400> 116
 ttaaatttgc atagggattg ggctttgctt 30

<210> 117
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Зонд

<400> 117
 ttaaattggc atagggatta ggctttgctt 30

<210> 118
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Зонд

<400> 118
 agcagaaggc gattgtgagg taggagcaca 30

<210> 119

	<211> 30		
	<212> ДНК		
	<213> Искусственная		
5	<220>		
	<223> Зонд		
	<400> 119		
10	agcaggaggg gattgtgtag taggcgcaca	30	
	<210> 120		
	<211> 30		
	<212> ДНК		
15	<213> Искусственная		
	<220>		
	<223> Зонд		
20	<400> 120		
	ttctgcagca gcagatgtag ctgtgcaaat	30	
	<210> 121		
25	<211> 30		
	<212> ДНК		
	<213> Искусственная		
	<220>		
30	<223> Зонд		
	<400> 121		
	ctgtccaaaa tgacatgtcg gcataagggt	30	
35	<210> 122		
	<211> 30		
	<212> ДНК		
	<213> Искусственная		
40	<220>		
	<223> Зонд		
	<400> 122		
45	tgcaacagat ggagtaacag cagtgcctaat	30	
	<210> 123		
	<211> 30		
50	<212> ДНК		
	<213> Искусственная		
	<220>		
	<223> Зонд		
55	<400> 123		
	tgcaactgat ggagtagcag cagtgcctaat	30	
	<210> 124		
60	<211> 30		
	<212> ДНК		
	<213> Искусственная		
65	<220>		

<223> Зонд
 <400> 124
 tgtagaatcc atggtgtgca ggtaaagccat 30

<210> 125
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Зонд
 <400> 125
 ttcattagcc tgtgtagcag cagctgaaat 30

<210> 126
 <211> 31
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Зонд
 <400> 126
 cactcatcya ataaatgttc attcatacta t 31

<210> 127
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Зонд
 <400> 127
 atattctgat tcggtgttgg tagcagcact 30

<210> 128
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Зонд
 <400> 128
 aaataggaca tgacctctgg agtcagacgg 30

<210> 129
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Зонд
 <400> 129
 atatagatgg aactggatta gtagttgcag 30

<210> 130
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 130
 ccttttttttg tggaacaacc acatccttct 30

 <210> 131
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 131
 tccttaaaagc gtgtagaact gtattctgtg 30

 <210> 132
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 132
 atctcaggcg ttaggtgtat cttacatagt 30

 <210> 133
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 133
 aatggccscg gaggtacaga agcgataggt 30

 <210> 134
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Праймер

 <400> 134
 actaggatca tcgggaaaaag 20

 <210> 135
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Зонд

 <400> 135
 tggctctcta tcaatcagc 20

 <210> 136
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 136
 ttctccaccc actacgcacc cccgccagca 30

 <210> 137
 <211> 37
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 137
 gggctcaagc tctaatgcc aaagacctac tactctg 37

 <210> 138
 <211> 31
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 138
 ctcattaggc accccaggct ttacacttta t 31

 <210> 139
 <211> 35
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 139
 tcaactatta ggcacccag gctttacact ttatg 35

 <210> 140
 <211> 27
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Зонд

 <400> 140

gcagttataag attattgatg ccggaac 27

<210> 141
 <211> 27
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Зонд

<400> 141
 gtcaaaaacct gggaatagtag tttacc 27

<210> 142
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Праймер

<400> 142
 cgtccatarrg gawactgatc 20

<210> 143
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Праймер

<400> 143
 gctcagggwc ataayaatgg 20

<210> 144
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Праймер

<400> 144
 gcgacccaat gcaaatgggt 20

<210> 145
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Зонд

<400> 145
 caagctccta atgcacaaga cctactactc 30

<210> 146
 <211> 35

<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Зонд

<400> 146
ggggtcaagc tcctaattgcc aaagacctac tactc

35

<210> 147
<211> 35
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Зонд

<400> 147
gagtgagctg ataccgctcg ccgcagccga acgac

35

<210> 148
<211> 30
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Зонд

<400> 148
gtagatatgg cagcacatat tgacatatatt

30

<210> 149
<211> 30
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Зонд

<400> 149
gtagatatgg cagctcataa tgtcatattt

LR											LR
	122	122	123	123							
LR	14	14	44	44	47	47	52	52	60	60	LR
LR	98	98	105	105	136	136	145	145	138	138	LR
	38	38	54	54	56	56	65	65	80	80	LR
	6	6	10	10	22	22	29	29	34	34	LR
	51	51	61	61	124	124	1	1	3	3	LR
	148	148	149	149	15	15	45	45	46	46	LR
	66	66	79	79	76	76	99	99	106	106	
	28	28	35	35	39	39	53	53	55	55	
LR	2	2	4	4	5	5	11	11	23	23	LR

ФИГ. 1

LR	116 117	116 117	118 119	118 119	129	129	130	130	77 78	77 78	LR
	21	21	26	26	27	27	103	103	104	104	
LR	147	147	146	146	137	137	19	19	20	20	LR
LR	97	97	107	107	108	108	61	61	139	139	LR
	87	87	88	88	89	89	95	95	96	96	LR
	113	113	32	32	33	33	74	74	75	75	LR
	125	126	126	127	127	128	128	111	111	112	LR
	120	120	121	121	131	131	132	132	133	133	LR
112	90	90	91	91	92	92	109	109	110	110	
125	72	72	73	73	84	84	85	85	86	86	
LR	67	67	68	68	69	69	70	70	71	71	LR

ФИГ. 2

LR	M3	M3	129 130	129 130	136 145	136 145	136 146	136 146	136 137	136 137	LR
	19 20	19 20	19 21	19 21	20 21	20 21	26 27	26 27	103 104	103 104	
LR	87 88	87 88	87 89	87 89	95 96	95 96	95 97	95 97	107 108	107 108	LR
LR	127 128	127 128	111 113	111 113	112 113	112 113	32 33	32 33	74 75	74 75	LR
	120 121	120 121	131 132	131 132	131 133	131 133	132 133	132 133	125 126	125 126	LR
	84 85	84 85	84 86	84 86	90 91	90 91	90 92	90 92	109 110	109 110	LR
	M2	67 68	67 68	69 70	69 70	69 71	69 71	70 71	70 71	72 73	LR
72 73	44 45	44 45	46 47	46 47	51 52	51 52	60 61	60 61	122 123	122 123	LR
M2	65 66	79 80	79 80	M1	M1	98 99	98 99	105 106	105 106	14 15	14 15
65 66	28 29	28 29	34 35	34 35	38 39	38 39	53 54	53 54	55 56	55 56	
LR	1 2	1 2	3 4	3 4	5 6	5 6	10 11	10 11	22 23	22 23	LR

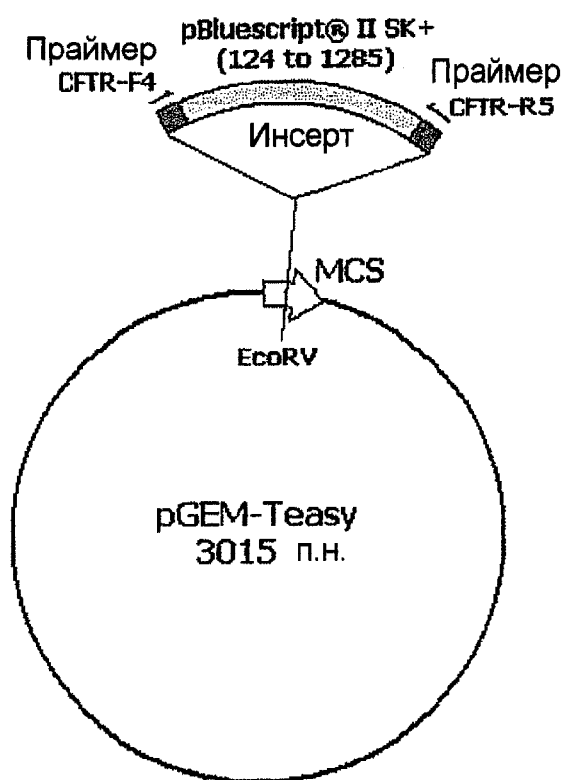
ФИГ. 3

LR	105 106	107 108	109 110	111 113	120 121	M2	125 126	127 128	129 130	131 132	LR
60 61	65 66	67 68	69 71	72 73	M1	79 80	84 85	87 88	90	98 99	
LR	10 11	14 15	22 23	28 29	34 35	38 39	44 45	46 47	51 52	53 54	55 56
	120 121	M2	125 126	127 128	129 130	131 132	138 139	136 137	1 2	3 4	5 6
69 71	72 73	M1	79 80	84 85	87 88	90	98 99	105 106	107 108	109 110	111 113
22 23	28 29	34 35	38 39	44 45	46 47	51 52	53 54	55 56	60 61	65 66	67 68
M2	125 126	127 128	129 130	131 132	138 139	136 137	1 2	3 4	5 6	10 11	14 15
72 73	M1	79 80	84 85	87 88	90	98 99	105 106	107 108	109 110	111 113	120 121
	38 39	44 45	46 47	51 52	53 54	55 56	60 61	65 66	67 68	69 71	
LR	138 139	136 137	1 2	3 4	5 6	10 11	14 15	22 23	28 29	34 35	LR

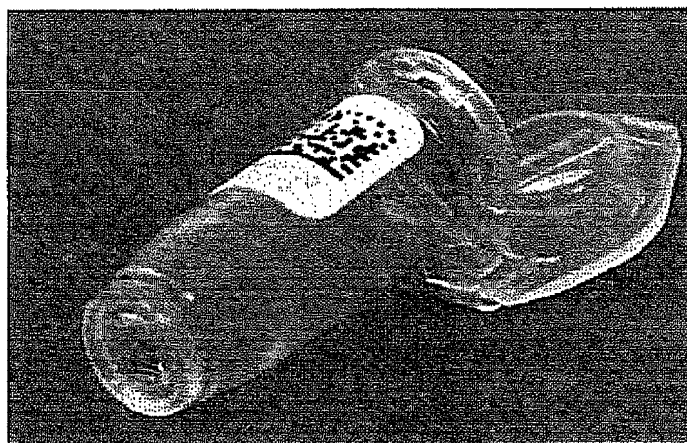
ФИГ. 4

LR	63 64	63 64	93 94	93 94	114 115	114 115	100 101	100 101	M4	M4	LR
	17 18	17 18	24 25	24 25	30 31	30 31	36 37	36 37	62 64	62 64	
LR	7 8	7 9	7 9	8 9	8 9	12 13	12 13	16 17	16 17	16 18	16 18
	100	100	101	101	102	102	114	114	115	115	7 8
64	64	81	81	82	82	83	83	93	93	94	94
50	50	57	57	58	58	59	59	62	62	63	63
40	40	41	41	42	42	43	43	48	48	49	49
24	24	25	25	30	30	31	31	36	36	37	37
	12	12	13	13	16	16	17	17	18	18	
LR	138 139	138 139	136 137	136 137	7	7	8	8	9	9	LR

ФИГ. 5



ФИГ. 6



ФИГ. 7