



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03823091.7

[43] 公开日 2005 年 10 月 19 日

[11] 公开号 CN 1685065A

[22] 申请日 2003.9.26 [21] 申请号 03823091.7
[30] 优先权
[32] 2002.9.26 [33] EP [31] 02078992.1
[86] 国际申请 PCT/NL2003/000661 2003.9.26
[87] 国际公布 WO2004/029302 英 2004.4.8
[85] 进入国家阶段日期 2005.3.28
[71] 申请人 斯蒂汀病理学研究基金会
地址 丹麦阿姆斯特丹
[72] 发明人 克里斯托弗若斯·约安内斯·兰波特
斯·玛芮亚·迈耶尔
派绰斯·约瑟福斯·弗蒂南德斯·斯
尼德斯

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任
公司
代理人 杨 青 樊卫民

权利要求书 4 页 说明书 23 页 附图 6 页

[54] 发明名称 检测和定型皮肤 HPV 的方法及其采
用的引物和探针

[57] 摘要

本发明涉及检测和定型人乳头瘤病毒 (HPV) 的
方法。具体而言,本发明涉及检测和定型超组 B 的
皮肤 HPV 的方法,以及用于本发明方法中的引物和
探针。本发明的显著优势在于,大量 HPV 型可在
单个分析中进行检测,适用于固定的和保存差的材
料,以及检测方法和定型方法可偶联在一起。

ISSN 1008-4274

1. 检测皮肤超组 B HPV 的方法，包括下列步骤：
 - (a) 提供怀疑藏有皮肤超组 B HPV 的样品；
 - 5 (b) 提供多个双向引物对，基本上全体互补于所有皮肤超组 B HPV 的 DNA；
 - (c) 利用所述多个引物进行反应以扩增衍生自所述样品的 DNA；以及
 - (d) 从所述样品中检测皮肤超组 B HPV 的 DNA 扩增产物。
- 10 2. 权利要求 1 的方法，其中步骤(d)的实施是使所述 DNA 扩增反应的反应产物与多个属类皮肤超组 B HPV 探针杂交。
- 15 3. 权利要求 1 或 2 的方法，其中所述多个双向引物对包括基本上全体互补于所有皮肤超组 B HPV 的 DNA 中的第一共有区域的引物，以及其中多个双向引物进一步包括基本上全体互补于所有皮肤超组 B HPV 的 DNA 中的第二共有区域的引物。
- 20 4. 权利要求 3 的方法，其中所述第一和第二共有区域位于皮肤超组 B HPV 的 L1 ORF。
- 25 5. 权利要求 4 的方法，其中所述第一和第二共有区域基本上如图 2 中所定义。
6. 权利要求 5 的方法，其中所述多个引物对包括图 1 的引物。
7. 权利要求 6 的方法，其中在所述多个双向引物对中，各个引物对之一包括生物素标记。
- 30 8. 前述权利要求任一项的方法，其中所述扩增 DNA 的反应在降

低的严格条件下进行。

5 9. 权利要求 2-8 任一项的方法，其中所述多个超组 B HPV 探针基本上互补于来自所有超组 B HPV 的所述 DNA 扩增产物的核酸序列。

10 10. 权利要求 2-9 任一项的方法，其中所述超组 B HPV 探针包括图 3 的探针。

11. 权利要求 10 的方法，其中所述探针包括 DIG 标记。

12. 定型皮肤超组 B HPV 的方法，包括下列步骤：

(a) 利用多个双向引物对，通过扩增皮肤超组 B HPV 的 DNA，提供 DNA 扩增产物；以及

15 (b) 通过使所述扩增产物与至少一个皮肤超组 B HPV 探针杂交从一个或多个超组 B HPV 型中检测 DNA 扩增产物，所述探针基本上互补于至少一个但不是全部皮肤超组 B HPV 型的 DNA。

20 13. 权利要求 12 的方法，其中所述多个双向引物对包括基本上全体互补于所有皮肤超组 B HPV 的 DNA 中的第一共有区域的引物，以及其中多个双向引物对进一步包括基本上全体互补于所有皮肤超组 B HPV 的 DNA 中的第二共有区域的引物。

25 14. 权利要求 13 的方法，其中所述第一和第二共有区域位于皮肤超组 B HPV 的 L1 ORF 中。

15. 权利要求 14 的方法，其中所述第一和第二共有区域基本上如图 2 中所定义。

30 16. 权利要求 15 的方法，其中所述多个双向引物对包括图 1 的

引物。

17. 权利要求 16 的方法，其中在所述多个双向引物对中，各个引物对之一包括生物素标记。

5

18. 权利要求 12-17 任一项的方法，其中所述至少一个探针基本上互补于实际一种超组 B HPV 型的 DNA。

10

19. 权利要求 12-18 任一项的方法，其中所述至少一个探针选自图 5 的探针。

20. 权利要求 12-19 任一项的方法，其中检测包括使用反系印迹。

15

21. 用于前述权利要求任一项的方法中的双向引物，其中引物基本上全体互补于所有超组 B HPV 的 L1 ORF 中的第一和第二共有区域。

22. 图 1 的双向引物。

20

23. 用于检测皮肤超组 B HPV 的属类检测探针，其中探针基本上全体互补于在 HPV 4 的核苷酸位置 6539-6610 之间的所有超组 B HPV 的 L1 ORF 中的区域以及其他皮肤超组 B HPV 型的对应区域。

24. 图 3 的属类检测探针。

25

25. 用于检测皮肤超组 B HPV 型的检测探针，其中探针基本上互补于在 HPV 4 的核苷酸位置 6539-6610 之间的至少一个但不是全部皮肤超组 B HPV 型的 L1 ORF 中的区域以及其他皮肤超组 B HPV 型的对应区域。

30

26. 用于检测皮肤超组 B HPV 型的种类特异性检测探针，其中探针基本上互补于在 HPV 4 的核苷酸位置 6539-6610 之间的实际一种皮肤超组 B HPV 型的 L1 ORF 中的区域以及其他皮肤超组 B HPV 型的对应区域。

5

27. 图 5 的种类特异性检测探针。

检测和定型皮肤 HPV 的方法及其采用的引物和探针

5 发明领域

本发明涉及检测和定型人乳头瘤病毒(HPV)的方法。具体而言，本发明涉及检测和定型超组 B 的皮肤 HPV 的方法。本发明还涉及用于本发明方法中的引物和探针。

10 发明背景

所有疣的病源因子是称作人乳头瘤病毒(HPV)的多种不同组的病毒，其总共构成一组 100 种以上的病毒型，正如由 DNA 序列变异所确定。不同的 HPV 引起多种皮肤病和粘膜病。某些类型可带来疣，或乳头瘤，这是良性(非癌性)肿瘤。已发现其他类型导致侵入性宫颈

15

癌。在所有 HPV 类型中，有 30 种以上可通过性接触在人际间传播。因此，HPV 感染是最普遍的性传播疾病(STDs)之一。损害可能在与携带 HPV 的人性接触后数周到数月内出现，也可能从不出现，这是因为 HPV 感染经常不会造成任何症状。目前，虽然损害和疣本身能被

20

治疗，但还没有药物治疗可消除乳头瘤病毒感染。乳头瘤病毒和多瘤病毒都属于乳多空病毒科，这是带有双链 DNA 基因组的小的非包膜肿瘤病毒家族。个别分离株是高度宿主特异的。

25

特异于人(HPV)，牛(BPV)，鸟类(例如，FPV)，鹿(DPV)，棉尾兔(CRPV)，欧洲麋鹿(EEPV)和众多其他动物的乳头瘤病毒已得以鉴定。

30

与其他主要通过血清型分组的病毒不同的是，乳头瘤病毒的分类采用同一宿主的基因型，并且以鉴定顺序编号(例如，HPV1-HPV83 和 BPV1-BPV4)。

HPV 基于其诱导感染细胞恶性变化的能力，被广泛分成低风险和高风险类型。诸如 1, 2, 4, 6, 11, 13 和 32 的低风险 HPV 类型主要与良性损害或普通疣相关，而诸如 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 和 69 的高风险类型主要与前恶性和恶性上皮损害相关。与由低风险类型，例如 HPV-6 和 HPV-11，引起的疣相比，HPV 的这些高风险类型引起的生长一般是扁平的并且几乎看不见。

根据组织向性，乳头瘤病毒一般也可加以分类。尽管所有已知的人乳头瘤病毒严格感染上皮来源的细胞(角化细胞)以及诱导上皮肿瘤，但是根据组织向性，它们可分组成粘膜 HPV 型或皮肤 HPV 型。

粘膜型(例如，HPV6 和 HPV16)包括那些感染生殖器和呼吸道的粘膜的 HPV。皮肤型(例如，HPV1 和 HPV8)包括那些一般感染外部皮肤的 HPV，例如那些引起皮肤疣的 HPV，和那些引起患有疣状表皮发育不良(EV；罕见的遗传病，特征在于孩提时代为散布的平疣和斑点损害，以及生命后期有 HPV-诱导的皮肤癌的倾向)的病人皮肤癌的 HPV。

已显示与 EV 有关的 HPV 类型构成了一组分类成 EV-型的皮肤 HPV(例如，5, 8, 17, 20 和 36 型)。在这些病毒中，有些仅在遗传性诱因的个体中引起癌症。基于它们的系统发生关系，EV-型 HPV 和 EV-型相关的 HPV 以及 4 型 HPV 在分类中统称为超组 B-型，并且形成最大的一组皮肤 HPV 类型。

上文清楚地表明，HPV 的类型一般可预测感染位点及其临床过程。

最新数据显示，超组 B-型皮肤人乳头瘤病毒可能参与非黑素瘤

皮肤癌(NMSC)的发病机理,尤其是在免疫抑制(例如,肾移植受体)病人中。此外,皮肤 HPV DNA,具体为 5, 36 和 38 型的皮肤 HPV DNA,可在高达 90%的牛皮癣损害中得以检测,表明有病源学关系。然而,对皮肤 HPV 的研究受到下列事实阻碍: 这些研究包括大量和高度异源的病毒组,为此,需要平行采用多个基于 PCR 的检测体系。

现有技术中,皮肤 HPV 检测和定型体系有诸多限制。现有技术的 HPV 检测和定型体系的一个缺点为,在单个分析中只能检测数目有限的 HPV 型。因此,为了覆盖大范围的不同类型,需要进行若干单独的 PCR 分析(参见,例如,Shamanin 等, 1996, J. Natl. Cancer Inst. 88: 802-811; Meijer 等, 2001, Cancer Detect. Prev. 25: 533-547)。

此外,现有技术分析要求相对大的 DNA 片段(Shamanin 等, 1996, J. Natl. Cancer Inst. 88: 802-811; Berkhout 等, 1995, J. Clin. Microbiol. 33: 690-695; Forslund 等, 1999, J. Gen. Virol. 80: 2437-2443; Meijer 等, 2001, Cancer Detect. Prev. 25: 533-547)。由于材料的适当保存(例如,福尔马林固定)以及临床材料保存差可能生成降解的 DNA,因此,这类分析仅适用于对相对新鲜的未固定材料进行分析。这就妨碍了其应用,并且阻止了方法的标准化。

而且,迄今为止,现有技术仅公开了单对引物(例如, Forslund 等, 同上的简并引物)或嵌套 PCR 引物(例如, Berkhout 等, 同上)。虽然 Forslund 的方法显示有可能检测各种不同类型的 HPV,但它们仍未表明所有的超组 B-型 HPV 可从临床样本中加以检测。

而且,当今适用于检测皮肤 HPV 的分析体系没有与其偶联的定型体系。结果,为了定型 HPV,需要对 DNA 扩增产物进行繁琐的重扩增,克隆和测序(Shamani 等, 1996, J. Natl. Cancer Inst. 88: 802-811; Berkhout 等, 1995, J. Clin. Microbiol. 33: 690-695)。

现有技术中，有些方法以相当的灵敏度检测多个 HPV 类型，另一个问题是所谓的嵌套-PCR 形式(Berkhout 等, 1995, J. Clin. Microbiol. 33: 690-695)。这类方法对污染极其敏感，非常少量的污染模板 DNA 就会生成假阳性结果。此外，这样的形式还很费力。

5

发明概述

为了克服这些困难，本发明人现已发现一种检测属于超组 B 的各种不同的任何皮肤 HPV 类型的方法。此外，在本发明的其他方面，本发明人发现了一种与检测方法相容、用于超组 B 内 HPV 类型的有效定型体系的方法。

10

根据本发明，检测皮肤超组 B HPV 的方法包括下列步骤：提供怀疑藏有皮肤超组 B HPV 的样品，提供多个双向引物对，所述引物基本上全体互补于所有皮肤超组 B HPV 的 DNA，利用所述多个引物进行反应以扩增衍生自所述样品的 DNA，以及通过所述 DNA 扩增反应的反应产物与多个属类皮肤超组 B HPV 探针杂交，从皮肤超组 B HPV 中检测 DNA 扩增产物。

15

在另一方面，本发明提供了定型皮肤超组 B HPV 的方法，包括下列步骤：通过扩增多个双向引物对之间的皮肤超组 B HPV 的 DNA 提供 DNA 扩增产物，以及通过所述扩增产物与至少一个皮肤超组 B HPV 探针杂交从一个或多个超组 B HPV 型中检测 DNA 扩增产物，所述探针基本上互补于至少一个但不是全部皮肤超组 B HPV 型的 DNA。

20

在进一步方面，本发明提供一组双向扩增引物，用于扩增超组 B HPV-DNA。

25

在另一方面，本发明提供属类寡核苷酸探针，用于属类检测超组 B HPV-DNA。

30

在另一方面，本发明提供种类一特异寡核苷酸探针，用于种类特异性或选择性检测属于 HPV 超组 B 的单个 HPV-型。

附图描述

5 图 1 示出合适的双向引物对，用于扩增来自属于超组 B 的皮肤 HPV 的 DNA。

图 2 示出属于超组 B 的皮肤 HPV 的 DNA 中超组 B HPV-特异引物一结合区的序列(5'-3')。为了清楚起见和便于所示序列的比对，这些区中的互补链未示出，但应理解含在其中。

10 图 3 示出合适的属类检测探针，用于检测衍生自皮肤超组 B HPV 的扩增子 HPV (5'DIG-3')。如文本所示，这些探针也可由所示的互补链组成。

图 4 示出皮肤超组 B HPV 的 DNA 中探针一结合区的序列 (5'-3')。为了清楚起见和和便于所示序列的比对，这些区中的互补链未示出，但应理解含在其中。

15 图 5 示出种类一特异性检测探针，适用于反系印迹(reverse line blot)(RLB)定型衍生自皮肤超组 B HPV 的扩增子(5'氨基-3')。如文本所示，这些探针也可由所示的互补链组成。

20 图 6 示出 HPV 4 型的双链 DNA 序列(根据 EMBL 登录号 X70827 编号)。所示为双向引物的位置(下划线)以及分别在图 2 和 4 中定义的探针一结合区(阴影部分)。

发明详述

25 “互补序列”为与另一核苷酸序列根据沃森一克里克碱基配对法则形成氢键双链体的核苷酸序列。例如，5'-AAGGCT-3'的互补碱基序列为 3'-TTCCGA-5'。

“表达”是指基因转录成结构 RNA(rRNA, tRNA)或信使 RNA(mRNA)，以及如果适用，随后翻译成蛋白。

30

如果多核苷酸在同一生物体中不是天然出现在一起，则它们彼此是“异源的”。如果某个多核苷酸在某生物体中不以其特定形式和排列天然出现，则它对该生物体是异源的。

5 如本发明所述，当对最大对应进行比对时，如果两个序列中的核苷酸序列相同，则多核苷酸具有同源序列。两个或多个多核苷酸之间序列比较一般是在比较窗上比较两个序列部分以鉴定和比较局部区域的序列相似性。比较窗通常为大约 20 到 200 个相邻核苷酸。多核苷酸的“序列同源性百分比”，诸如 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98, 99
10 或 100%序列同源性可通过在比较窗上比较两个最佳比对的序列而确定，其中比较窗中的多核苷酸序列部分与用于最佳比对两个序列的参照序列(不包括添加或缺失)比较，可包括添加或缺失(即，间隙)。百分比的计算如下：(a)确定相同核酸碱基在两个序列中出现的位置数，以产生匹配位置数；(b)将匹配位置数除以比较窗中的位置总数；以及(c)
15 结果乘以 100，以产生序列同源性的百分比。比较用序列的最佳比对可通过计算机化执行已知算法或通过检查而进行。容易可用的序列比较和多序列比对算法分别为局部相似性基本查询工具(BLAST)(Altschul, S. F.等，1990. J. Mol. Biol. 215: 403; Altschul, S. F.等，1997. Nucleic Acid Res. 25: 3389-3402)以及 ClustalW 程序，皆可
20 从因特网上获得。其他合适的程序包括威斯康星遗传软件包(Wisconsin Genetics Software Package)(Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI, USA)中的 GAP, BESTFIT 和 FASTA。

25 如本发明所用，“基本上互补”表示两个核酸序列彼此具有至少大约 65%，优选大约 70%，更优选大约 80%，甚至更优选 90%，以及最优选大约 98%的序列互补性。这意味着引物和探针必须与其模板和靶核酸分别显现足够的互补性，从而在严格条件下杂交。因此，本说明书中公开的引物序列无需反映模板上结合区的真正序列，并且可采用简并引物。基本互补的引物序列与扩增模板具有足够的序列互补
30 性，从而导致引物结合和第二链合成。

术语“杂合体”是指通过在互补核苷酸之间的氢键形成的双链核酸分子，或双链体。术语“杂交”或“退火”是指单链核酸序列通过互补核苷酸之间的氢键形成双螺旋区段的过程。

5

术语“寡核苷酸”是指通过磷键(例如，磷酸二酯，烷基和芳基磷酸酯，硫代磷酸酯)或非磷键(例如，肽，氨基磺酸盐(sulfamate)等)而连接的核苷酸单体的短序列(通常为 6 到 100 个核苷酸)。寡核苷酸可包含修饰的核苷酸，具有修饰的碱基(例如，5-甲基胞嘧啶)和修饰的糖基(例如，2'-O-甲基核糖基，2'-O-甲氧基乙基核糖基，2'-氟核糖基，2'-氨基核糖基等)。寡核苷酸可以是天然存在或合成的双链和单链 DNA 分子以及双链和单链 RNA 分子，形状有环状，支链或线性，并且任选包括能够形成稳定的二级结构的结构域(例如，茎和环结构以及环-茎-环结构)。

15

本发明所用术语“引物”是指当置于诱导合成互补于核酸链的引物延伸产物的条件，即在核苷酸，DNA 聚合酶等聚合剂，以及合适的温度和 pH 存在时，能够退火至扩增靶，让 DNA 聚合酶连接从而用作 DNA 合成起始点的寡核苷酸。(扩增)引物优选为单链，用于最大效率扩增。优选地，引物为寡脱氧核糖核苷酸。引物必须足够长，以在聚合剂存在下引发延伸产物的合成。引物的确切长度将依赖于诸多因素，包括温度和引物来源。如本发明所用的“双向引物对”是指 DNA 扩增，如 PCR 扩增领域中常用的一个正向引物和一个反向引物。

20

术语“探针”是指单链寡核苷酸序列，其会识别靶核酸序列分析物中的互补序列或其 cDNA 衍生物，并与之形成氢键双链体。

25

术语“严格”或“严格杂交条件”是指影响杂合体稳定性的杂交条件，例如，温度，盐浓度，pH，甲酰胺浓度等。这些条件根据经验进行优化，以使引物或探针与其靶核酸序列的特异性结合最大化并使

30

非特异性结合最小化。所用术语还包括参照条件，在此条件下探针或引物与其靶序列杂交的可检测程度大于其他序列(例如，至少高于背景2倍)。严格条件是序列依赖的，并且随情形不同而不同。较长序列在更高温度下特异性杂交。一般而言，严格条件的选择在限定的离子强度和 pH 下比特定序列的热熔点(T_m)低大约 5°C 。 T_m 是 50%的互补靶序列与完全匹配的探针或引物杂交时的温度(在限定的离子强度和 pH 下)。通常，在严格条件中，盐浓度小于大约 1.0 M Na^+ 离子，一般大约 $0.01\text{--}1.0\text{ M Na}^+$ 离子浓度(或其他盐)，pH $7.0\text{--}8.3$ ，以及温度对短探针或引物(例如， $10\text{--}50$ 个核苷酸)至少大约 30°C ，而对长探针或引物(例如，大于 50 个核苷酸)至少大约 60°C 。严格条件的实现也可加入去稳定剂，如甲酰胺。示例性低严格条件或“降低的严格条件”包括在 37°C 下用 30%甲酰胺， 1 M NaCl ，1% SDS 的缓冲液杂交，以及在 40°C 下以 $2\times\text{SSC}$ 冲洗。示例性高严格条件包括在 37°C 下用 50%甲酰胺， 1 M NaCl ，1% SDS 的缓冲液杂交，以及在 60°C 下以 $0.1\times\text{SSC}$ 冲洗。杂交步骤在本领域是众所周知的，并且描述在例如，Ausubel 等，*Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons Inc., 1994。

本发明方法检测，鉴定和诊断属于超组 B 的人乳头瘤病毒，以及人乳头瘤病毒在生物体中的感染，所述生物体易受由超组 B HPV 引起的这类感染影响。

超组 B HPV 的检测

本发明检测超组 B HPV 的方法可在衍生自人的样品上操作，但也可在其他样品，诸如环境样品，或其他可能存在 HPV 的地点的样品，诸如来自昆虫等其他生物体的样品上操作。优选地，用于本发明方法的样品包括人样品，诸如病人的细胞样品。更优选地，样品包括来自潜在感染或怀疑感染场所的病人细胞。

病人细胞样品可包括肿瘤性皮肤细胞(例如，在疣情形下，veruccas 等，假设由皮肤 HPV 感染引起)。此外，样品可包括肿瘤性粘膜细胞

样品，诸如在 HPV 感染女性泌尿生殖道的情形下的宫颈细胞样品，而且，肺，喉，口腔，扁桃腺，食管，阴茎，阴户，肛门，直肠，前列腺，子宫的癌组织和其他组织也可作为样品用于本发明的方法中。

5 用于本发明方法中的这种样品的获得和制备方法对本领域技术人员是公知的，或者从本发明公开内容中会变得一目了然。有关 DNA 分析和操作的通用方法参见，例如，分子克隆：实验室手册(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)，第 2 版，第 1-3 卷，Sambrook 等主编，Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)或 Current Protocols in
10 Molecular Biology，Ausubel 等编，Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (1987)及其定期的更新资料。

 优选地，本发明方法用于检测 HPV 型 4，5，8，9，12，14，15，17，19，20，21，22，23，24，25，36，37，38，47，48，49，50，
15 60 和/或 65。所有这些类型被分类成皮肤超组 B HPV。

 还未发现的皮肤 HPV 超组 B 的成员就可通过本发明方法进行合适地检测正是本发明的优势方面。而且，定型超组 B HPV 的方法可被放大，以便于在本发明的 HPV 定型体系中并入这些新发现的类型。

20 本发明人在所有皮肤超组 B HPV 类型的 DNA 中现已发现两个离散的区域，其紧密地分隔在一起，并且在各种不同的超组 B HPV 类型之间显示同源性。这两个同源区或共有区域位于皮肤超组 B HPV 基因组的 L1 可读框(ORF)中。这两个共有区域的 DNA 序列示于图 2 中。
25 第一个共有区域包括在此定义成以 5'-3'方向在 HPV 4 型基因组上从大约核苷酸位置 6539 到大约核苷酸位置 6559 延伸的区域(根据 EMBL 登录号 X70827 编号，HPV 4 型)以及其他皮肤超组 B HPV 型的基因组内的对应区域。第二共有区域包括在此定义成以 5'-3'方向在 HPV 4 型基因组上从大约核苷酸位置 6583 到大约核苷酸位置 6610 延伸的区域
30 以及其他皮肤超组 B HPV 型的基因组内的对应区域。

基于这个发现，本发明提供了一组双向引物，其中各个引物分别能够退火至多个皮肤超组 B HPV 型的两个共有区域中的一个。完整的组优选提供多个双向引物对，当其共同使用时，能够退火至任何皮肤超组 B HPV 的 DNA 中的这两个共有区域，以及能够扩增这两个共有区域之间和相邻(即位于这两个共有区域侧翼)的限定的 DNA 序列。

从所有皮肤超组 B HPV 中扩增上述两个共有区域之间区域的合适双向引物对的例子示于图 1 中。从本发明公开内容中，本领域技术人员显然可设计出除图 1 所示之外的其他组的引物，并且用于扩增位于皮肤超组 B HPV 基因组的 L1 ORF 中的两个共有区域侧翼或与之侧翼相接的特异序列。例如，有可能使用稍短或稍长的引物，或含有例如，肌醇残基或模糊碱基的引物序列，或者甚至与图 1 的引物序列比较含有一个或多个错配的引物。一般而言，与图 1 的寡核苷酸序列显示至少 65%，更优选至少 80%同源性的序列被视为适用于本发明的方法。

本发明方法原则上可通过采用任何核酸扩增方法进行，诸如聚合酶链式反应(PCR; Mullis 1987, U.S.专利 No. 4,683,195, 4,683,202, en 4,800,159)或通过采用扩增反应进行，诸如连接酶链式反应(LCR; Barany 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 189-193; EP 申请 No., 320,308), 自动维持序列复制(3SR; Guatelli 等, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874-1878), 链置换扩增(SDA; U.S.专利 Nos. 5,270,184, en 5,455,166), 转录扩增体系(TAS; Kwoh 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173-1177), Q- β 复制酶(Lizardi 等, 1988, Bio/Technology 6: 1197), 滚环扩增(RCA; U.S.专利 No. 5,871,921), 基于核酸序列的扩增(NASBA), 切割片段长度多态性(Cleavase Fragment Length Polymorphism)(U.S.专利 No. 5,719,028), 等温和嵌合引物起始的核酸扩增(ICAN), 分叉延伸扩增方法(RAM; U.S.专利 Nos. 5,719,028 和 5,942,391)或其他合适的 DNA 扩增方法。

本发明优选的实施方案采用 PCR 方法，包括采用一组合起来匹配在所有已知属于超组 B 的 HPV 型的 L1 可读框内序列的 5 个重叠正向和 4 个重叠反向引物，通过引物起始扩增超组 B HPV-DNA。

5

由于在此定义的 L1 ORF 中的两个共有区域被紧密地分隔在一起，优选的一组双向扩增引物扩增超组 B HPV-DNA 的短片段(即，大约 72 个碱基对)。这为从质量差的模板 DNA，诸如降解到一定程度的 DNA 中扩增 DNA 序列提供了可能，从而在本发明方法中能够使用福尔马林固定的样本作为样品材料，以及使用其他保存不太好的材料。

10

为了使用一个或多个扩增引物扩增带有少量错配的 HPV 型的 DNA，扩增反应可在降低的严格条件下进行(例如，PCR 扩增利用退火温度 38°C，或存在 3.5 mM MgCl₂ 的条件下)。本领域技术人员能够选择合适的严格条件。

15

引物序列和超组 B HPV-特异 DNA 扩增引物的对应序列示于图 1 中。

20

L1 ORF 中两个共有区域侧翼的序列区域的另一重要方面在于，其 DNA 序列包括属于超组 B 的多种不同的 HPV 的共同基元，如图 4 所示。

25

因此，通过扩增 L1 ORF 中特异于超组 B HPV 的两个共有区域之间的 DNA 序列区域，所有超组 B HPV 可通过利用一组属类皮肤超组 B HPV 检测探针进行检测，所述检测探针必须会与那些含有共同基元的 HPV 的扩增子杂交。当共同使用时，这种属类检测探针会结合所有亚组 B HPV 扩增产物。本发明人已发现，非常有利的体系采用与 3 个设有摆动碱基的重叠属类探针的鸡尾酒杂交，以检测所有可能的通过皮肤超组 B HPV 引物扩增的 HPV 类型。一组合适的与所有超组 B

30

HPV 扩增子的上述两个共有区域之间区域结合的属类检测探针的例子示于图 3 中。

5 从本发明公开内容中，本领域技术人员会一目了然，可以设计除了图 3 的其他组的属类检测探针，并且用于检测位于所有皮肤超组 B HPV 的 L1 ORF 中两个共有区域侧翼的 DNA 序列。例如，有可能使用稍短或稍长的探针，或含有模糊碱基或摆动碱基的探针序列，它们被定向至稍微不同簇的 HPV 型，或者除了图 3 之外的不同组的探针，诸如与其靶序列相比含有一个或多个错配的探针。一般而言，与图 3
10 的寡核苷酸序列显示至少 65%，更优选至少 80%同源性的序列被视为适用于本发明的方法，用于属类检测所有超组 B HPV 的扩增子。

同样，图 3 中所列的互补序列在本发明方法中可合适地用作属类检测探针，前提是互补链在所用的扩增反应中扩增，诸如当 PCR 用于
15 扩增时。

检测扩增产物原则上可由本领域公知的任何合适的方法来完成。检测片段可直接用放射性标记，抗体，发光染料，荧光染料或酶试剂染色或标记。直接 DNA 染色包括例如，嵌入染料，诸如吖啶橙，溴
20 化乙锭，单叠氮化锭或 Hoechst 染料。

此外，DNA 片段通过掺入标记 dNTP 碱基至合成的 DNA 片段中而得以检测。与核苷酸碱基有关的检测标记包括例如，荧光素，靛蓝染料或 BrdUrd。
25

本发明优选包括通过反应产物与一个或多个属类皮肤 HPV 超组 B 探针杂交而检测由上述对皮肤超组 B HPV DNA 进行扩增反应得到的反应产物。

30 当使用基于探针的检测体系时，用于本发明的合适的检测步骤可

例如包括酶免疫分析(EIA)形式(Jacobs 等, 1997, J. Clin. Microbiol. 35, 791-795)。为了以 EIA 方式进行检测, 扩增反应中所用的正向或反向引物可包括捕获基团, 例如生物素基团, 以使超组 B HPV-DNA PCR 扩增子固定在例如链亲和素包被的微量滴定板孔上, 用于随后的 EIA 检测超组 B HPV-扩增子(参见下文)。本领域专业人员会理解, 可采用在 EIA 形式中用于固定超组 B HPV-DNA PCR 扩增子的其他基团。

定型超组 B HPV

位于皮肤超组 B HPV 的 L1 ORF 中的两个共有区域侧翼的 DNA 序列区的另一重要方面在于, 其 DNA 序列也独特于各个属于超组 B 的 HPV 类型, 正如在图 4 中可见。

所以, 在本发明的另一方面, 属于超组 B 的各种不同的 HPV 型通过使用多个种类特异皮肤超组 B HPV 检测探针可得以检测, 所述探针分别仅结合于属于超组 B 的一个特异型 HPV 的扩增子。由此, 通过扩增在此定义的两个共有区域之间的 DNA 序列区, 接着对各个 HPV 型的独特序列进行探测, 提供了用于定型各种不同的超组 B HPV 的方法。

用于种类特异性检测来自在此公开的超组 B 型 HPV 的 DNA 的 L1 ORF 中的区域的探针举例在图 5 中。这些种类特异性探针优选仅结合于至少部分 DNA 序列区域, 正如在属于超组 B 的单一 HPV 型的两个共有区域之间扩增的区域。本领域专业技术人员可制备相似的探针, 在来自超组 B HPV 的 DNA 的 L1 ORF 的核苷酸序列基础上, 用于种类特异性检测, 而无需太多的试验, 正如在此阐述。同样, 图 5 中所列的互补序列作为种类特异检测探针可合适地用于本发明方法中, 前提是这种互补链扩增在所用的扩增反应中。

根据本发明, 定型方法中所用的探针选择性与某个(些)HPV 型的扩增子结合, 但在很低的严格杂交条件下, 与其他 HPV 型的扩增子

不结合或仅弱结合。因此，在一个实施方案中，本发明可用于确定感染病人的 HPV 类型。随着恶性疾病的发展(以及临床预后)极其依赖于 HPV 型，这具有重要意义。因此，在定型方面，本发明提供确定病人中 HPV 感染的类型的方法。

5

根据本发明，在定型超组 B HPV 的方法中，合适的探针例如，仅与亚组 HPV 型的扩增子杂交。这类探针，例如，可以是图 3 的属类探针。在这样的实施方案中，例如，使感染 HPV 型限制至具体的亚组(或排除这样的亚组)的能力是足够的。

10

在本发明定型超组 B HPV 的方法中，与定型探针结合的扩增子的亚组可由单一 HPV 型扩增子组成，或可由多个不同类型的扩增子组成，以致种类特异探针与生成自样品的扩增子的结合或非结合(如果合适)会使研究人员推导出感染病人的 HPV 型的同一性。与所需 HPV 型结合，但不与非所需 HPV 型结合的探针可通过本领域专业人员公知的方法生成。

15

本发明现在提供探针以显著特异性与之结合的扩增子的具体区域。尽管同源区域可能存在于所有生成的 HPV 扩增子中，但是该具体区域的核酸序列对不同类型的 HPV 是独特的。

20

如果相似的定型需要对尚未清晰地包括或发现的超组 B HPV 进行，这种 HPV 类型的扩增子的核酸序列不必互补于本文提供的任何探针。然而，利用本发明公开内容，通过常规比对和序列比较计算机程序，合适的杂交区域可由本领域专业人员容易地在其他扩增子中进行鉴定。

25

在本发明定型超组 B HPV 的方法的优选实施方案中，使用一组 24 个不同探针(图 5)，或其互补序列，与图 4 所示的衍生自 24 个不同皮肤超组 B HPV 的扩增子的种类特异序列杂交。

30

用于本发明定型方面的合适的检测步骤例如，可包括固定扩增子以及通过例如 Southern 印迹探测其 DNA 序列。其他形式包括如上所述的 EIA 形式。为了便于检测结合，种类特异超组 B HPV 探针可包括标记部分，诸如荧光团，发色团，酶或放射性标记，从而促进探针与扩增反应产物的结合的监控。这种标记对本领域专业人员是众所周知的，并且包括例如，异硫氰酸荧光素(FITC)， β -半乳糖苷酶，腊根过氧化物酶，链亲和素，生物素，地高辛， ^{35}S 或 ^{125}I 。其他样品对本领域专业人员是一目了然的。

10

虽然可采用其他方法，本发明定型方法优选通过所谓的反系印迹(RLB)分析进行，诸如对粘向性(mucosotropic)HPV 最新开发的分析(van den Brule 等，2002, J. Clin. Microbiol. 40,779-787)。为此目的，RLB 探针优选 5'氨基合成，随后固定在例如，羧基包被的尼龙膜上。RLB 形式的优势为体系的方便及其速度，由此允许高通量样品处理。

15

本发明定型超组 B HPV 的方法可在相似样品材料上进行，如用于上述检测超组 B HPV 的材料。此外，根据本发明方法，定型超组 B HPV 可直接在扩增子或通过使用 DNA 扩增反应得到的 DNA 扩增反应产物上进行，如上文对检测超组 B HPV 所述。

20

因为本发明方法的两个方面在不同检测探针的应用中存在差异，在一个方面，本发明方法包括对疑似超组 B HPV DNA 的扩增，接着通过利用属类检测探针鸡尾酒而检测任何 HPV 的扩增子(即，检测感染有超组 B HPV)，所述鸡尾酒共同与生成的所有超组 B HPV 扩增子杂交。在另一方面，本发明方法包括对超组 B HPV DNA 的扩增，接着在例如反系印迹分析中对 24 个 HPV 进行定型。因此，根据本发明方法，检测和定型可平行进行。

25

30 引物和探针

在进一步方面，本发明提供一组双向扩增引物，用于在本发明方法中扩增超组 B HPV-DNA。这些引物优选是寡核苷酸引物，序列长度为大约 8 到大约 35，优选大约 15 到大约 30，更优选大约 21 到大约 28 个核苷酸。在最优选的实施方案中，正向引物包括大约 21 个核苷酸，而反向引物包括大约 28 个核苷酸。优选地，其中一个引物标记有基团，以利于固定双链超组 B HPV 扩增子链中的一条，以及在甚至更优选的实施方案中，反向引物标记有生物素。

本发明双向引物的核苷酸序列的设计应允许在引物和靶 DNA 之间在如本文定义的超组 B HPV 基因组的 L1 ORF 中两个共有区域之一的位置处形成稳定的杂合体。另外，正向引物的核苷酸序列优选基本上互补于区域中的一个或多个超组 B HPV 的基因组中 L1 ORF 的反义链，所述区域如图 2 的正向引物区域所定义，而反向引物的核苷酸序列优选基本上互补于区域中的一个或多个超组 B HPV 的基因组中 L1 ORF 的有义链，所述区域如图 2 的反向引物区域所定义。与此标准一致的引物例如示于图 1 中。当共同使用时，图 1 的引物将对在所有超组 B HPV 的基因组中的相应区域的 DNA 进行扩增。

本文引物的选择是“基本上”互补于(即，至少 65%，更优选至少 80%完全互补于)在各个待扩增的特异序列的不同链上存在的共有区域。有可能使用稍短或稍长的引物，或含有例如，肌醇残基或模糊碱基的引物序列，或者甚至与图 1 的引物序列比较时含有一个或多个错配的引物。一般而言，与图 1 的寡核苷酸序列显示至少 65%，更优选至少 80%同源性的序列被视为适用于本发明的方法。当利用低严格杂交条件时，序列错配也不是至关重要的。在本发明中，引物优选基本上互补于超组 B HPV 的 L1 ORF 中的两个共有区域中的至少一个的序列。

在另一方面，本发明提供用于属类检测超组 B HPV-DNA 的寡核苷酸探针。本文的检测探针的选择“基本上”互补于通过本发明扩增

反应生成的双链 DNA 扩增子链中的一条。优选地，探针基本上互补于固定的，例如生物素标记的，从超组 B HPV 的 L1 ORF 生成的扩增子的反义链。

5 扩增子包括的区域特征在于共同的基元，以及在各种不同的超组 B HPV 之间的独特序列。用于检测这些扩增子的属类探针的设计是足够互补的，以与生成自一个或多个超组 B HPV 型的扩增子的任意链杂交。属类检测探针序列不需要反映任意扩增子链的真正序列，也不需要反映所有超组 B HPV 的实际序列。本发明在图 3 中现提供一组带有
10 模糊碱基(摆动碱基)的探针，以利于它们与至少一亚组的生成自各种不同的超组 B HPV 的所有可能的扩增子结合。这使检测所有超组 B HPV 所需的属类探针数最小化。

 本发明属类检测探针与其靶序列比较允许含有一个或多个错配。
15 一般而言，与图 3 的寡核苷酸序列显示至少 65%，更优选至少 80%同源性的序列被视为适用于本发明的方法，用于属类检测所有超组 B HPV 的扩增子。所以，当参照图 1 和图 3 的引物或探针时，目的在于包括与图 1 和图 3 显示至少 65%，更优选至少 80%同源性的序列。

20 同样，图 3 中所列的互补序列在本发明方法中可合适地用作属类检测探针，前提是互补链在所用的扩增反应中扩增。

 与有些超组 B HPV 型结合但不与其他超组 B HPV 型结合的探针可由本领域专业人员公知的方法生成。

25 为了便于检测，属类超组 B HPV 探针可包括标记部分，诸如荧光团，发色团，酶或放射性标记，从而促进探针与扩增反应产物的结合的监控。这种标记对本领域专业人员是众所周知的，并且包括例如，荧光素，靛蓝染料， β -半乳糖苷酶，腊根过氧化物酶，链亲和素，生物素， ^{35}S 或 ^{125}I 。其他样品对本领域专业人员是一目了然的。用于本
30

发明方法中的优选的属类超组 B HPV 探针的标记为地高辛(DIG)标记。

5 这些属类检测探针优选是寡核苷酸探针，序列长度为大约 8 到大约 70，优选大约 15 到大约 40，更优选大约 25 到大约 35 个核苷酸。在最优选的实施方案中，属类检测探针包括大约 30 个核苷酸。

10 仍在另一方面，本发明为种类特异性或选择性检测单个 HPV 型或属于超组 B 的 HPV 型的亚组提供寡核苷酸探针。在优选的实施方案中，为各个 HPV 型提供一个探针，因此这样的探针是种类特异的。本发明公开一组 24 个合适的种类特异探针序列，用于种类特异性检测图 5 中所示的特异超组 B HPV。虽然有些错配是允许的，但是优选定型探针完全互补于其各自的靶序列。如上所述，图 5 中所示的互补序列也可在本发明方法中用作种类特异探针，前提是扩增反应能扩增
15 互补 DNA 片段。所以，当参照图 3 和图 5 的探针时，目的在于包括其互补序列。

种类特异性或选择性检测探针可用于各种不同的定型步骤中。合适的步骤包括探针-靶被固定的情形，还可使用探针被固定的情形的
20 步骤。作为后者的例子，可使用生物芯片形式，也可使用反系印迹形式，诸如 RLB 或系探针分析(line probe assay)。取决于固定基质和选定的表面化学，本领域专业人员能够挑选合适的基团标记寡核苷酸探针用于基质固定。在优选的实施方案中，该基团为在探针的 5'-端导入的氨基基团。

25 种类特异性检测探针优选为寡核苷酸探针，序列长度为大约 8 到大约 30，优选大约 15 到大约 25，更优选大约 19 到大约 23 个核苷酸。由于使用属类检测探针的设计，本领域专业人员会意识到在一个杂交反应中所用的一组探针内，单个探针的退火温度通过提供 G+C 含量
30 和探针长度之间的平衡可适当加以调整。

在一个实施方案中，本发明还提供包括实施本发明方法所用的引物和探针的试剂盒。这样的试剂盒的优选实施方案包括扩增引物，属类检测探针和种类特异探针，如在图 1，图 3 和图 5 中分别公开。

5

下列非限制性实施例说明若干个本发明的实施方案。

实施例 1

超组 B 的 HPV 的扩增，EIA 检测和 RLB 定型

10

方法

HPV 测试组

为了评价 RLB 定型方法的灵敏度和特异性，下列 HPV 型的质粒克隆子用作测试组：HPVs 4, 5, 8, 9, 14, 17, 19, 21, 22, 23, 25, 36, 38, 49, 和 50。

15

临床样本

为了评价对临床样本的 HPV 检测和定型，使用福尔马林一固定的石蜡包埋的皮肤组织样品。利用所谓的夹心方法(Walboomers 等，1999, J. Pathol. 189: 12-19)切成一系列 5 μ m 切片。简而言之，外部切片被苏木素一曙红染色用于组织学分析，而将内部切片(在总约 1 cm² 的组织中)置于试管中，用于 PCR。加入 250 μ l 裂解混合物(10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.45% Tween 20 和 500 μ g 蛋白酶 K (Roche, Mannheim, Germany)), 并在 37°C 下温育过夜。样品被煮沸，在标准台式离心机(10,000 rpm)上离心 1 分钟。冷却后，10 μ l 用于 PCR。

20

25

皮肤 HPV 超组 B-PCR

利用 5 个正向引物(即，5f, 6f, 7f, 8f, 9f; 图 1)和 3 个生物素酰化的反向引物(即，5r-bio, 6r-bio, 7r-bio, 和 8r-bio; 图 1)的混合物，对分离的 HPV 质粒 DNA 或预处理的样品进行 PCR。50 μ l 的 PCR

30

反应混合物含有 1.5 mM MgCl₂, 200 μM 各种 dNTP, 12.5 pmol 各种引物, 1 单位 AmpliTaq Gold DNA 聚合酶(Perkin-Elmer, Foster City, CA), 以及各种不同浓度的 HPV 质粒 DNA 或 10 μl 的样品粗提物的 Taq Gold 缓冲液(Perkin-Elmer, Foster City, CA)。利用 PE 9700 热循环仪(Perkin-Elmer, Foster City, CA)进行 40 个 PCR 循环。各个 PCR 反应的起始为预加热步骤, 94°C 下 10 分钟, 接着 40 个由下列步骤组成的循环: 变性步骤(94°C 下 20 秒), 引物退火步骤(38°C 下 30 秒), 以及延伸步骤(71°C 下 80 秒)。斜坡时间(ramping time)如前所述(van den Brule 等, 2002, J. Clin. Microbiol. 40: 779-787)。终了延伸步骤延长 4 分钟。

酶免分析 PCR 产物

利用链亲和素包被的微量滴定板(Roche, Mannheim, Germany)和如前所述(Jacobs 等, 1997, J. Clin. Microbiol. 35: 791-795)温育过夜后的读出进行 EIA, 除了杂交温度使用 55°C 外。将 3 个 DIG-标记的属类寡探针(即, SkinPR 1-DIG, SkinPR 2-DIG, 以及 SkinPR3- DIG; 图 3)的混合物用于杂交。

PCR 产物的 HPV 反系印迹(RLB)

利用先前对粘性 HPV 型开发的体系(van den Brule 等, 2002, J. Clin. Microbiol. 40: 779-787), 进行 RLB 分析。该体系是基于使用微型印迹仪(miniblotter)用于在羧基包被的尼龙膜上平行点样多达 42 个含有 5'-氨基基团的不同寡探针。随后, 多达 42 个 PCR 产物可被吸管吸入微型印迹仪的平行通道中, 其方式是使通道垂直于先前沉积的寡探针的行。以此形式实施杂交, 接着膜与抗生物素共轭物温育, 以及检测增强的化学发光(ECL)。

为 RLB 选定的 HPV-特异 5'氨基连接的寡核苷酸(Isogen, Maarssen, The Netherlands)示于图 5 中。利用引物/探针选择软件(Oligo), 选择的方式使得 T_m 为(约)55°C, 以及长度为约 20 bp。寡探针共价结合于带

负电荷的膜(Biodyne C, Pall BioSupport, East Hills, NY)。简而言之, 通过利用 16 % (wt/vol) EDAC (1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺; Sigma, St. Louis, MO), 膜被活化, 并置于微型印迹仪体系(MN 45, Immunetics, Cambridge, MA)上。寡核苷酸施加在平行系列上, 温育 1 分钟后, 通道被抽气, 而利用 100 mM NaOH 使膜灭活, 接着以补充有 0.1% SDS (BDH, Dorset, England)的 2×SSPE (0.18 M NaCl, 10 mM NaH₂PO₄ 和 1 mM EDTA (pH 7.7); Life Technologies, Rockville, MD)冲洗。

对杂交而言, 10 μl 生物素酰化的 PCR 产物稀释在 150 μl 的 2×SSPE/0.1% SDS 中, 热变性(96°C), 并在冰上快速冷却。PCR 产物被吸管吸入垂直于寡探针的行的平行通道内。42°C 下杂交 1 小时, 接着 51°C 下以 2×SSPE/0.5% SDS 冲洗两次。随后, 在 42°C 下膜与链亲和素-过氧化物酶共轭物温育 45-60 分钟(1:4000 倍稀释的 2×SSPE/0.5% SDS; Roche, Mannheim, Germany), 在 42°C 下以 2×SSPE/0.5% SDS 冲洗两次, 并在室温下用 2×SSPE/0.5% SDS 漂洗两次, 共 5 分钟。检测方法是采用化学发光 ECL 检测液(Amersham, Buckinghamshire, England), 再曝光于膜 (Hyperfilm, Amersham, Buckinghamshire, England)1-10 分钟。随后显影膜。为了重复使用, 膜的剥离方法是, 在 80°C 下以 1% SDS 冲洗两次, 共 30 分钟, 接着室温下在 20 mM EDTA (pH 8)中温育 15 分钟。膜密封在塑料中, 保存在 4°C 直至使用。

结果

扩增超组 B 的 HPV 和随后 EIA 检测衍生自 1 ng 的克隆 HPV s 4, 5, 8, 9, 14, 17, 19, 21, 22, 23, 25, 36, 38, 49, 和 50 的 PCR 产物在所有情形下都显示清晰的 EIA 信号, 然而, 用人 DNA 没有观察到交叉反应性。这表明高度的特异性。利用混合有人胎盘 DNA 的克隆 HPV s 5, 8, 21, 和 50 的稀释系列, 也可以对灵敏度很好地进行皮肤 HPV 超组 B-PCR EIA; 分析灵敏度范围为 10 fg (HPV s 5, 和 21)

到 100 fg (HPVs 8 和 50)。同样, RLB 定型显示了特异信号, 没有交叉反应性, 而灵敏度等于 EIA, 如果不是高于的话。

实施例 2

5 福尔马林—固定的临床样本的分析

利用实施例 1 中所述的材料和方法, 除了所用 DNA 分离自从 87 个 DNA 质量良好的皮肤样本(即, 在 β -球蛋白 PCR 中的阳性样品)中用福尔马林—固定和石蜡包埋的组织样品, 对皮肤超组 B HPV DNA 的扩增进行测试。这些样品包括 59 个肾移植受体样品, 其中有 21 例鳞状细胞癌(SCC), 23 例基细胞癌(BCC)和 15 例光化性角化症(AK)。另 29 个样品获自免疫活性病人, 包括 13 例 SCC, 12 例 BCC 和 4 例 AK。

用属类超组 B 探针进行 EIA 检测显示阳性率为病例的 62%: 肾移植受体的样本中有 76%, 而免疫活性病人的样本中有 34%。这些阳性率包括在获自肾移植受体的样品中有 15/21 病例的 SCC (71 %), 15/23 病例的 BCC (65%), 以及 14/15 病例的 AK (93%), 以及在获自免疫活性病人的样品中有 4/13 病例的 SCC (31 %), 2/12 病例的 BCC (17%) 以及 4/4 病例的 AK (100 %)。

20

通过 RLB 定型肾移植受体和免疫活性病人的 SSC 样品显示了在每个样品中有 1-7 个不同类型的 HPV。合起来, 下列 19 个 HPV 类型在一个或多个样品中得以检测: HPVs 4, 5, 8, 9, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 36, 37, 38, 47, 49, 50。这些数据与文献公布的利用其他 PCR 体系从冷冻样本中获得的数据相一致(Shamani 等, 1996, J. Natl. Cancer Inst. 88: 802-811; Berkhout 等, J. Clin. Microbiol. 33: 690-695; Forslund 等, J. Gen. Virol. 80: 2437-2443; Harwood 等, J. Med. Virol. 61: 289-297; Meijer 等, Cancer Detect. Prev. 25: 533-547)。

30 实施例 3

福尔马林—固定的临床样本的分析

对另外 42 个肾移植受体的非黑素瘤皮肤癌分析皮肤超组 B HPV DNA 的扩增,如实施例 2 中所述,除了所有 PCR 产物通过 EIA 和 RLB 分析之外。用属类超组 B 探针进行 EIA 检测显示阳性率为这些病例的 67% (28/42),而 RLB 显示对 24 个测试 HPV 型中至少一个的阳性率为病例的 88% (37/42)。检测的 HPV 型包括下列 18 个类型: HPV s 4, 5, 8, 9, 12, 14, 15, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 36, 37, 38, 48, 和 49。以降序排列,下列 HPV 类型是最普遍的: HPV s 20, 4, 5, 25, 15, 23, 和 14。同样,在这顺序中,还发现了多个 HPV 感染。这些数据暗示 RLB 比 EIA 更灵敏。

正向引物 (5'-3')

5f: TTAGCTCAAATTAATGCAATG
6f: TTGGCACAAATTAATGCAATG
7f: TTAGCACAAATTAATGCTATG
8f: TTAGCTCAGATAAATGCAATG
9f: CTGGCTCATTTAAATGTAATG

反向引物 (5'bio-3')

5r-bio: ATCAGGGGTGGGTACAAATCCTAACTGC
6r-bio: ATCAGGGGTGGGTACAAATCCTAATTGC
7r-bio: ATCTGGTGCAGGAACAAATCCTAATTGC
8r-bio: GGGAGGTGGTGGAACAAAAGCTAATTGC

图1

类型	正向引物区(有义)	反向引物区(反义)
HPV 4:	ATGGCTCATTTAAATGTAATG	GGGAGGTGGTGGAAACAAAATTTAACTGC
HPV 5:	TTGGCACAGATCAATGCAATG	ATCAGGAGTGGGAACAAATCCTAACTGC
HPV 8:	TTAGCACAAATCAATGCCATG	ATCAGGGGTAGGTACAAATCCCAGTTGC
HPV 9:	TTATCCCAGATAAATGCAATG	TTCAGGTGATGGAACAAACCCTAATTGC
HPV 12:	TTAGCACAGATAAATGCAATG	GTCAGGAGTTGGCACGAAGCCTAATTGC
HPV 14:	TTAGCTCAAATTAATGCAATG	GTCTGGTGCAGGTACAAATCCTAATTGC
HPV 15:	TTAACACAAATTAATGCTATG	GTCTGGTGTAGGAACAAACCCTAGTTGC
HPV 17:	TTAACTCAAATTAATGCAATG	ATCTGGTGTAGGCACAAATCCTAACTGC
HPV 19:	CTGGCACAAATCAATGCAATG	ATCGGGTGCAGGCACGAAACCTAATTGC
HPV 20:	TTAGCTCAAATTAATGCTATG	ATCCGGTGCAGGAACGAATCCTAACTGC
HPV 21:	TTAGCTCAAATTAATGCAATG	GTCTGGGGCAGGAACAAATCCTAACTGC
HPV 22:	TTAACTCAAATTAATGCCATG	GTCTGGTGTAGGTACAAAGCCTAGTTGC
HPV 23:	TTAACACAAATTAATGCCATG	ATCTGGTGTAGGAACAAACCCTAACTGC
HPV 24:	TTAGCACAGATCAATGCTATG	GTCTGGTGCAGGCACAAATCCTAACTGC
HPV 25:	TTGGCTCAGATTAATGCAATG	GTCCGGTGCAGGAACGAATCCTAATTGC
HPV 36:	TTGGCTCAGATAAATGCTATG	ATCTGGAGTAGGTACAAAACCTAACTGC
HPV 37:	TTAACTCAGATAAATGCAATG	ATCTGGAGTAGGTACAAATCCTAATTGC
HPV 38:	CTGACACAGATTAATGCTATG	GTCTGGGTGGGGTACAAAGCCTAATTGC
HPV 47:	TTAGCACAAATTAATGCCATG	GTCTGGAGTAGGCACAAATCCTAACTGC
HPV 48:	CTGGCACATTTACACGCTTTG	TGGAGCTGGTGGAAACAAAAGCTAATTGC
HPV 49:	CTGGCACAAATCAATGCTATG	ATCAGGGGTAGGAACAAATCCCAATTGC
HPV 50:	TTAGCTCATCTTAATGTAATG	GGGAGCTGGTGGAACTAAAGCTAATTGC
HPV 60:	TTAGCTCATTTAAATGTAATG	TGGTGGTGGAGGTACAAATGAAAGTTGC
HPV 65:	ATGGCTCACTTAAATGTAATG	AGGAGGAGGGGGCACAAAATTTAATTGC

图2

SkinPR 1-DIG : GCAATGAATSCHAAAYATWTTRGARGADTGG
SkinPR 2-DIG : GCAATGAAYTCWDVTATRTTGGARGATTGG
SkinPR 3-DIG : GCAATGAAYYCHDVDHTWTTRGARGADTGG

D = A, T或G

H = A, T或C

R = A或G

S = C或G

V = A, C或G

W = A或T

Y = C或T

图3

HPV 4 : GTAATGAATCCTAATATTTTGGATAATTGG
HPV 5 : GCAATGAACCTTCGTTATTGGAGGATTGG
HPV 8 : GCCATGAATTCATCACTACTTGAGGAATGG
HPV 9 : GCAATGAACCTCAGGTATTTTAGAGGATTGG
HPV 12 : GCAATGAACCTCTCTTTGCTGGAGGACTGG
HPV 14 : GCAATGAATTCTAATATTTTAGAGGAGTGG
HPV 15 : GCTATGAATTCAGGTATTTTAGAAGACTGG
HPV 17 : GCAATGAACCTCAGGAATCTGGAAGACTGG
HPV 19 : GCAATGAATTCTAACATATTGGAAGAATGG
HPV 20 : GCTATGAATTCAAATATATTAGAGGAGTGG
HPV 21 : GCAATGAATGCAAATATTTTAGAAGAATGG
HPV 22 : GCCATGAATCATGGCATTTTAGAAAATTGG
HPV 23 : GCCATGAATTCAGATATTTTAGAGAATTGG
HPV 24 : GCTATGAATCCATCTCTATTGGAAGAGTGG
HPV 25 : GCAATGAATTCCAACATTTTAGAAGATGG
HPV 36 : GCTATGAATTCTTCTTTATTGGAAGATTGG
HPV 37 : GCAATGAATTCTGGTATATTGGAAGAGTGG
HPV 38 : GCTATGAATTCTGGAATATTAGAAAATTGG
HPV 47 : GCCATGAATTCGTCCTTTTAGAGGAATGG
HPV 48 : GTTATGAATCCCAGAATATTAGAGGAGTGG
HPV 49 : GCTATGAATTCTTCTATATTGGAAAATTGG
HPV 50 : GTAATGGACCCAGAATTTTGGAAAATTGG
HPV 60 : GTAATGGACAAAAATATTTTAGAGGATTGG
HPV 65 : GTAATGAATCCTAATATCTTAGACAATTGG

图4

RLBskinHPV 4 : AATCCTAATATTTTGGATAATTG
RLBskinHPV 5 : TCTTCGTTATTGGAGGATTG
RLBskinHPV 8 : AATTCATCACTACTTGAGGA
RLBskinHPV 9 : TCAGGTATTTTAGAGGATTG
RLBskinHPV 12 : TTCTTTGCTGGAGGACTG
RLBskinHPV 14 : ATTCTAATATTTTAGAGGAGTG
RLBskinHPV 15 : AATTCAGGTATTTTAGAAGACT
RLBskinHPV 17 : AACTCAGGAATTCTGGAAGA
RLBskinHPV 19 : TTCTAACATATTGGAAGAATG
RLBskinHPV 20 : ATTCAAATATATTAGAGGAGTG
RLBskinHPV 21 : ATGCAAATATTTTAGAAGAATG
RLBskinHPV 22 : AATCATGGCATTTTAGAAAATT
RLBskinHPV 23 : ATTCAGATATTTTAGAGAATTG
RLBskinHPV 24 : CATCTCTATTGGAAGAGTG
RLBskinHPV 25 : AATTCCAACATTTTAGAAGAAT
RLBskinHPV 36 : TTCTTCTTTATTGGAAGATTG
RLBskinHPV 37 : TTCTGGTATATTGGAAGAGT
RLBskinHPV 38 : ATTCTGGAATATTAGAAAATTG
RLBskinHPV 47 : AATTCGTCTCTTTTAGAGGA
RLBskinHPV 48 : CCCAGAATATTAGAGGAGT
RLBskinHPV 49 : ATTCTTCTATATTGGAAAATTG
RLBskinHPV 50 : ACCCCAGAATTTTGGAAAAT
RLBskinHPV 60 : GACAAAAATATTTTAGAGGATT
RLBskinHPV 65 : AATCCTAATATCTTAGACAATT

图5

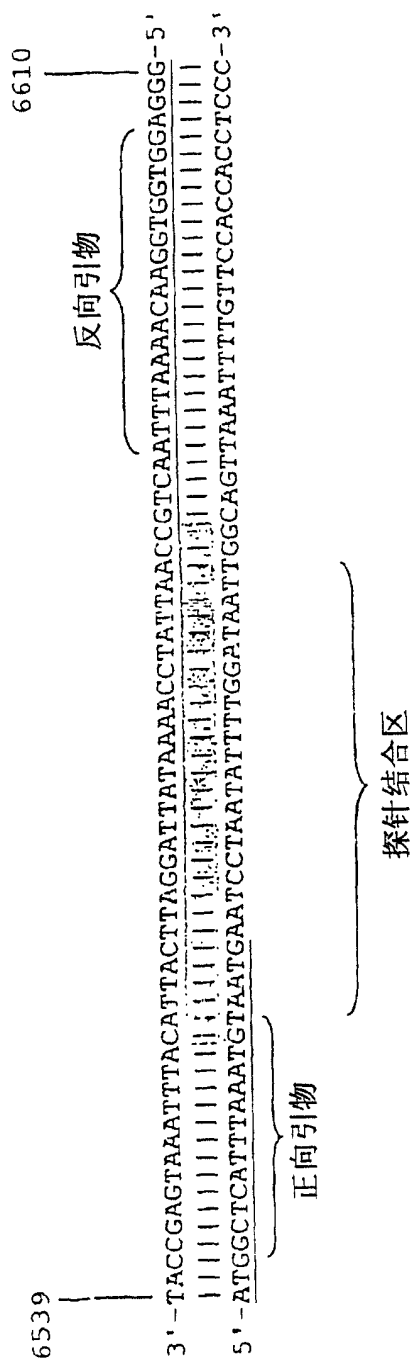


图6