



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103409552 B

(45)授权公告日 2017.04.05

(21)申请号 201310041279.3

C12Q 1/68(2006.01)

(22)申请日 2013.02.01

C12N 15/11(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

C12R 1/93(2006.01)

申请公布号 CN 103409552 A

审查员 刘超

(43)申请公布日 2013.11.27

(73)专利权人 港龙生物技术(深圳)有限公司

地址 518057 广东省深圳市南山区高新区
中区高新中一道生物孵化器大楼2-
310、311、312、208B室

(72)发明人 黄鹤 黄明辉

(74)专利代理机构 深圳市科吉华烽知识产权事

务所(普通合伙) 44248

代理人 胡吉科 孙伟

(51)Int.Cl.

C12Q 1/70(2006.01)

权利要求书1页 说明书8页

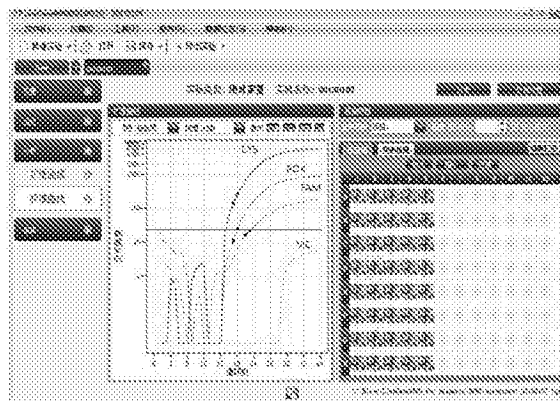
序列表11页 附图3页

(54)发明名称

同步检测多种高危型HPV基因型的引物组、
探针组、方法及试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种同步检测多种高危型HPV基因型的引物组、探针组、方法及试剂盒,所述试剂盒包括多个特异性引物对组成的引物组;与每对引物对相匹配的探针。本发明是一种多重引物的PCR方法,使用2对以上至14对引物并配合TaqMan荧光探针,针对14种HPV基因型,在一个样品管中同时检测2种以上至14种高危型HPV DNA并对HPV16和HPV18进行分型检测。



1.同步检测多种高危型HPV基因型的引物组,其特征是:所述引物组由以下引物对组成:SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:27。

2.同步检测多种高危型HPV基因型的试剂盒,其特征是:所述试剂盒包括权利要求1所述的引物组;

与每对引物对相匹配的探针,其核苷酸序列如序列表SEQ ID NO:29至SEQ ID NO:42所示。

3.如权利要求2所述的同步检测多种高危型HPV基因型的试剂盒,其特征是:所述探针为TaqMan探针,根据其修饰基团的不同分为两种:普通的TaqMan探针和TaqMan MGB探针。

4.使用权利要求1所述引物组进行非诊断目的的高危HPV基因型多重RT-PCR的筛查方法,包括步骤:

(1)在PCR反应开始时,针对每个型HPV的引物、探针寡核苷酸序列与临床样品中的模板DNA片段特异性结合杂交;

(2)Taq DNA聚合酶沿模板自5'端向3'端开始合成,此时探针保持完整,探针5'端荧光报告基团的荧光被探针3'端荧光淬灭基团淬灭,不产生荧光信号;

(3)剪切:当Taq DNA聚合酶沿模板合成遇到探针时,将探针5'端荧光报告基团剪切,游离下来的荧光报告基团的荧光不再被探针3'端荧光淬灭基团淬灭,会发出荧光;

(4)在特定波长下直接检测荧光信号。

同步检测多种高危型HPV基因型的引物组、探针组、方法及试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种聚合酶链式反应(PCR)荧光检测方法,属于生命科学领域和生物技术领域。本发明特别涉及一种利用多重聚合酶链式反应(PCR)荧光检测方法,以及利用所述方法在单一管PCR反应管中同时检测多种HPV基因型的引物组、探针组和试剂盒。

背景技术

[0002] HPV DNA的检测方法根据所采用的核酸分子生物学技术,主要分为三类:

[0003] 第一类是直接探针结合法,如有HPV类型特异性探针的Southern印迹和点印迹,原位杂交过滤(FISH)等法,由于其低灵敏度、操作繁琐费时及需要大量纯化的探针,现已很少采用。

[0004] 第二类是信号放大法,如杂交捕获(Hybrid Capture kit, Digene Diagnostics, SilverSpring, MD, USA, <http://www.digene.com>)法(Digene公司)和bDNA法(Bayer公司)。杂交捕获(Hybrid Capture)法是美国Digene公司的检测HPV DNA的技术,是目前获得美国FDA批准可在临床使用的一种检测HPV DNA的检测技术,HC2可以检测从高危型到低危型的各种HPV,该试剂盒用的是一套核酸杂交信号扩增系统杂交捕获二代试验(HC2)HPVDNA检测试剂,能同时检测13种高危型HPV(HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59和68)。在上述方法中,利用Hybrid Capture的液体杂交和普通引物PCR之后线性探针测试被认为是针对于诊断目的最合适的方法。商业化的Hybrid Capture试剂盒无须PCR扩增即可检出临床样品中的HPV DNA,并且可区别出高危型和低危型。但是,使用RNA探针可能会影响试剂盒的稳定性,并且也不能排除交叉反应的可能。2009年3月美国FDA又批准了Hologic公司采用Invader Chemistry原理放大荧光信号的方法的2种试剂盒,包括Cervista™ HPV HR(High Risk)(检测14种高危型HPV)和Cervista HPV 16/18 test(检测HPV16和HPV18)。

[0005] 第三类方法是基于PCR的靶序列片段扩增技术,应用PCR对特异型HPV靶序列片段进行扩增,用型特异性的寡核苷酸探针鉴别HPV型别。该类目前主要检测方法有:

[0006] 型特异性PCR(Type-specific PCR)法:该法根据E6、E7基因的变异区设计型特异性的引物进行PCR分析(Walboomers, 1999),其灵敏度大约在10—200个HPV拷贝每反应,随HPV型别不同而稍有差异。但这一方法目前主要局限于研究领域,因为每份样本都需要同时做多份PCR限制了高通量的使用。

[0007] 简并/通用引物PCR:通过针对高保守的L1基因设计引物(Kleter等, 1999, Gravitt PE, 2000),可以在一管反应中同时检出多个HPV型别,随后使用型特异性探针杂交确切分型,可区分大约40种型别。常用的引物包括简并引物MY09/11(Bosch, 1995)及其改进型PGMY09/11(Gravitt PE, 1998), SPF1/2(Reesink-Peters N, 2001),通用引物GP5/6(De Roda Husman AM, 1995)和GP5+/6+(Hutchinson, 1994), SPF1/2的灵敏度达到0.5—10fg(10—200个拷贝),PCR产物还可通过多种手段进行进一步分析:例如序列分析,限制性长度多态性分析(RFLP, Wang TS, 1999),以及使用特异性的探针进行斑点杂交(Laconi S, 2001)等。

[0008] AmpliCor微孔板检测法(Microtiter Well Plate):该产品是Roche公司的代表产品,使用非简并的系列引物混合物特异性扩增13种高危型L1区长度为170bp的片段,产物被固定在微孔板上的相应捕获分子所捕获,随后通过底物与酶的显色使产物得以检测。这一方法使用了TaqGold DNA聚合酶,减少了非特异性扩增并使反应的灵敏度大为提高。由于其针对的片段更短,这一检测手段对于检测保存不善的样本尤为有效,据报道(Thomas Iftner, 2003)相对PGMY09/11(针对450bp的片段)其对宫颈涂片的检出率可提高13%。

[0009] HPV分型诊断芯片:由韩国的生物医学实验室有限公司(Biomedlab)公司研制(TSHwang, 2003),目前可以检测22种HPV,方法是,将型特异性探针及对照探针(Beta珠蛋白)固定在芯片上,引物包含针对Beta珠蛋白的引物及针对HPV L1区的引物(在GP5/6基础上作进一步修改),PCR体系中含荧光素标记的核苷CY3或CY5,经PCR扩增的靶序列DNA产物,与芯片杂交,最后可通过激光扫描仪获得结果。对于多重感染的样本,可以检测到多个杂交信号,尽管这一方法的灵敏度和特异性均很高,但其实用性还有待进一步论证。

[0010] 以上检测HPV基因的几种杂交法方法利用GP5/6或MY11/9通用引物或其改进引物,加上多态区的特异型探针序列,都有几个缺点,例如,进行PCR反应后还需要做进一步实验才能鉴别不同HPV基因的型;而且,如样品中存在不同型HPV,不同的HPV型有不同的扩增反应效率,导致某些型相对于其它型有不均衡的扩增,不均衡的扩增使反应平衡趋向于样品中的高拷贝型,消耗了PCR反应的组份,使拷贝数少的型不易被检测出。

[0011] 荧光PCR技术:荧光PCR技术的荧光探针现已发展成多种类型,如TaqManMGB探针、Molecular Beacon探针、FRET探针、Scorpion(蝎子)探针等。TaqMan探针荧光PCR技术(fluorescence PCR, F-PCR),是由美国PE公司首先研制成功的(美国专利1994U.S. Patent No. 5538848; Holland等PNAS1991)。TaqMan探针是一条两端分别标记荧光基团的特异性寡核苷酸单链,在5'端标记荧光报告基团,在3'端标记荧光淬灭基团。在PCR反应开始时,引物与靶序列特异性结合, Taq酶沿模板自5'端向3'端开始合成,此时探针保持完整,荧光报告基团的荧光被荧光淬灭基团淬灭,不产生荧光信号;当Taq酶沿双链DNA模板合成至遇到探针时,将探针5'端剪切掉,游离下来的荧光报告基团会发出报告荧光;荧光的强度随PCR循环次数增加而增强,且与PCR产物的数量呈正比。荧光检测仪器透过PCR管壁能直接检测到荧光信号的波长和长度变化,因此荧光PCR检测能实现闭管实时监测PCR过程的变化,PCR产物无需后续检测和处理。它兼有PCR的高灵敏性、DNA杂交的特异性和光谱技术精确定量的优点,操作快速,结果直观,能直接探测PCR过程中的变化,其产物检测不需要做PCR后处理,无需进行凝胶电泳,完全闭管操作,有效的降低了PCR产物污染,进一步降低假阳性率。

[0012] Taq-Man探针根据其修饰基团的不同分为两种:普通的TaqMan探针和TaqMan MGB探针。2001年推出的TaqMan MGB探针在探针的3'端标记了自身不发光的淬灭荧光分子(Non-Fluorescent Quencher, NFQ)修饰基团,以取代常规可发光的TAMRA荧光标记,从而大大降低本底信号的强度,同时MGB基团可以将探针的T_m值提高10°C左右,因此为了获得同样的T_m值, MGB探针可以比普通TaqMan探针设计得更短,既降低了合成成本,大大增加了探针的杂交稳定性,也使得探针设计的成功率大为提高。该方法提高配对与非配对模板间的T_m值差异,具备高特异性和高精度性、探针的杂交的稳定性好等优点。

[0013] TaqMan探针荧光PCR技术已被用于检测HPV型(Swan等1997)用型特异性的引物 and 多重PCR扩增HPV16, 18, 31, 33, 35五个型HPV的L1区DNA片断,用型特异荧光探针检测一定

PCR循环反应后终点的反应信号,但是该法不是实时-PCR(real-time)。Josefsson等(1999)报道了用型特异性的引物PCR扩增HPV16,18,31,33,35五个型别HPV的E1区DNA片断,用不同荧光标记的型特异探针实时检测这五种HPV型,与Swan等的方法不同,该法应用了Real-time PCR原理。Tucker等(2001)报道了用型特异性的引物和多重PCR扩增HPV DNA E6/E7连接区的保守区,用不同荧光标记的型特异探针实时检测HPV。HART等(2001)报道用Scorpions荧光探针分三管检测HPV6,11,16,18,31,33,39,45,51,56十种型别。2011年4月,美国FDA批准了Roche公司的CobasHPV Test,采用四色荧光同时检测14种高危型HPV并对其中的HPV16、HPV18进行分型检测。

发明内容

[0014] 本方法特别涉及一种利用多重PCR检测方法,以及利用所述方法在单一管PCR反应管中快速、平行地同时检测多种常见的HPV基因型并且能对其中的HPV16、HPV18进行分型的引物组、探针组和试剂盒。

[0015] 一般PCR仅采用一对引物,通过PCR扩增产生一个核酸片段。本发明则采用多重PCR法(Multiplex PCR)即多重核酸扩增法,在同一PCR反应体系里加上二对以上的引物、各对引物针对各自特异的靶序列进行PCR反应,其反应原理,反应试剂和操作过程与一般PCR相同。采用多重PCR的原因有多种优势:多重PCR具有高效性、系统性、经济简便性等特点,能在同一反应管内同时检出多种HPV型,可节省时间,节省试剂,节约经费开支。本发明中强调针对每个HPV型的寡核苷酸序列引物和探针与对应的HPV型特异结合,反应体系中关键是含一组探针、一组特异性正向引物和反向引物,分别针对14种HPV型,能与相应的HPV型靶序列特异性结合。

[0016] 本发明的方法步骤包括:(1)在聚合酶和一组针对HPV各型的特异性引物存在下PCR进行扩增靶序列,产生靶序列扩增产物,针对每个HPV型的引物序列对包含有:一个首先与对应HPV型的靶序列上游第一个结合部位结合的正向引物,一个与对应HPV型靶序列的下游第二个结合部位结合的反向引物,正向引物和反向引物可以是本说明书序列列表列明的序列。(2)一个针对对应HPV型靶序列在正向引物和反向引物之间序列的TaqMan荧光标记探针;本发明的方法可以采用普通的TaqMan探针和TaqMan MGB探针。探针可以是本说明书序列列表列明的序列。(3)在PCR反应开始时,针对每个型HPV的引物寡核苷酸序列与临床样品中的PCR扩增的DNA片段特异性结合杂交,引物与靶序列特异性结合,Taq酶沿模板自5'端向3'端开始合成,此时未与靶序列结合的探针保持完整,荧光报告基团的荧光被荧光淬灭基团淬灭,不产生荧光信号;当Taq酶合成双链DNA沿DNA模板移动遇到探针时,将探针5'端切除,游离下来的荧光报告基团发出报告荧光;荧光的强度随PCR循环次数增加而增强,且与PCR产物的数量呈比例增长。探针5'端的荧光报告基团可以是FAM、TET、JOE、VIC、HEX、ROX、TAMRA、CY3、CY3.5、CY5、CY5.5、OregonGreen™、CALRed™、Red640、Texas Red、LightCycler® Cyan500、LightCycler® Red610中的一种或多种(根据其发射波长区分)。探针的3'端可以是发光或不发光的淬灭基团,可带有DNA小沟复合物(MGB, Minor Groove Binding)标记。(4)荧光检测仪器透过PCR管壁直接检测到在特定波长下一个或多个不同荧光信号,荧光强度变化代表对应HPV型的靶序列扩增产物的数量增加。

[0017] 研究表明,HPV各型基因组的L1区序列之间,既有一定的同源性即HPV保守性序列,

又具有一定的多态性即型特异性,根据型特异性序列可以设计型特异性引物。本实施例检测14种高危HPV型的引物与探针设计原理是:在HPV基因组的L1区选择相邻的多态性序列设计特异性正向引物和反向引物(所附检测14种高危HPV的引物探针设计序列列表)。

[0018] 同步检测多种高危型HPV基因型的引物组的核苷酸序列为如序列列表所示的引物对SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:27中的至少两对。上述引物和探针也可以是本专利权利要求1所述正向引物及反向引物之间的适合序列作为引物和探针的序列,不仅限于序列列表中列明的序列。

[0019] 利用TaqMan MGB探针的小沟结合物可以增加探针的 T_m 值的原理,使得探针的长度可以设计比普通的TaqMan探针更短,对单碱基序列的差异更为敏感,特异性更好,将反向引物设计在可变区内,使得针对每个HPV型别的反向引物具有型别的特异性,增加了PCR扩增的特异性,使得在一个反应管进行多重PCR,同时用针对14高危型HPV的TaqMan-MGB探针检测14种高危型HPV(包含HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68型)。模板变性温度在92-970C;引物退火温度在50-650C;DNA聚合酶催化下延伸合成互补DNA链,延伸合成互补DNA链的温度在50-650C,采用两步法即引物的退火温度和延伸温度使用同一个温度;进行扩增反应的循环数为30-40个。

[0020] 本发明的特征在于,采用两步法将HPV DNA模板在DNA聚合酶的作用下扩增特异片段,同时进行HPV的定量或定性荧光检测。本发明是一种多重引物的PCR方法,由2对以上至自14对多重引物,针对14种HPV基因型,在一个样品管中同时检测2种以上至14种HPV型别的DNA(包含HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68型)。

[0021] 本发明研制了一种简单、精确、重复性好的用于检出多种型HPV的方法,可在同一管PCR反应中,同时检测14种高危型并对其中的HPV16、HPV18进行分型检测,对于高危型HPV的筛查和疫苗的应用有重要意义。

[0022] 本发明的制备过程在下述步骤中详细描述。本发明在以下实施例中作了进一步说明,但本发明的范围并不受实施例的限制。特别是尽管实施例中列出引物和探针及其组合,但并不能理解为本发明就局限于相应的探针的类型和数量,凡是使用HPV DNA衍生核苷酸序列的多重聚合酶链式反应(PCR)荧光检测方法以及任何使用所述DNA荧光PCR检测的类似方法均属于本发明保护范围。

附图说明

[0023] 图1.表示一个HPV33阳性、HPV16阴性、HPV18阳性及内对照阳性样本的检测图:FAM荧光阳性表示样本中存在HPV31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68中至少一种HPV型为阳性,VIC荧光低于检测限表示HPV16阴性,CY5荧光阳性表示HPV18阳性,ROX荧光阳性表示Beta-珠蛋白基因内对照阳性。

[0024] 图2.VIC荧光阳性,ROX荧光阳性,FAM和VIC低于检测限,表示样本中HPV16阳性,表示样本中存在HPV31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68阴性,HPV18阴性,Beta-珠蛋白

基因内对照阳性。

[0025] 图3.ROX荧光阳性,其他荧光低于检测限,表明该样本有效,Beta珠蛋白DNA基因内对照阳性,14种高危HPV阴性。

具体实施方式

[0026] 实施例1:引物和探针设计

[0027] 本实施例在HPV各型基因组的L1区序列设计特异性正向引物和反向引物(检测14种高危HPV的引物探针设计序列列表),利用TaqMan MGB探针的小沟结合物可以增加探针的Tm值的原理,使得探针的长度可以设计比普通的TaqMan探针更短,对单碱基序列的差异更为敏感,特异性更好,将反向引物设计在可变区内,使得针对每个HPV型别的反向引物具有型别的特异性,增加了PCR扩增的特异性,使得在一个反应管进行多重PCR,同时用针对14高危型HPV的TaqMan MGB探针检测14种高危型HPV(包含HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68型)。本实施例中同步检测多种高危型HPV基因型的引物组的核苷酸序列为如序列列表所示的引物对SEQ ID NO:1和SEQ IDNO:14、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:19、SEQ IDNO:2和SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:10和SEQ IDNO:25、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:27。本实施例中使用FAM荧光标记检测12种高危型HPV的特异性探针(SEQ ID NO.31、SEQ ID NO.32、SEQ ID NO.33、SEQ ID NO.34、SEQ ID NO.35、SEQ ID NO.36SEQ ID NO.37、SEQ IDNO.38、SEQ ID NO.39、SEQ ID NO.40、SEQ ID NO.41、SEQ ID NO.42),以同时检测包含HPV31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68型HPV的1种或1种以上型别;使用VIC荧光标记探针(SEQ IDNO.29)检测HPV16;使用CY5荧光标记探针(SEQID NO.30)检测HPV18;使用ROX荧光标记探针(SEQ ID NO.43)检测Beta-珠蛋白(HBB)基因内对照。上述针对HPV的引物、探针,以及针对人Beta珠蛋白基因的引物组SEQ IDNO.13和SEQ ID NO.28,探针SEQ ID NO.43,按照一定比例混合10×PCR Buffer及MgCl₂、dATP、dUTP、dCTP、dGTP等配制成HPV PCR反应液,按【试剂主要组成成份】列表的组份组成HPV检测试剂盒,检测方法描述如下。

[0028] 【试剂主要组成成份】

[0029] 表1.HPV检测试剂盒的主要组成成份(40人份)

组份名称	产品 HPF20
	组份规格
HPV PCR 反应液	750 μl×1
Taq 酶	8 μl×1
UNG	2 μl×1
HPV DNA 提取液	1 ml×1
HPV 阳性对照	15 μl×1
HPV 阴性对照	15 μl×1

[0031] 【试验方法】

[0032] 1样本处理

[0033] 1.1标本预处理

[0034] 取出待处理标本,将所有标本置13,000rpm离心5分钟,保留沉淀物。(注意:对-20℃保存的标本,要求置室温自然解冻后再使用)

[0035] 1.2DNA提取

[0036] 1.2.1准备三个离心管,分别加入阴性对照、阳性对照各5μl。

[0037] 1.2.2分别向标本沉淀物及上述对照品管中加入50μl DNA提取液,振荡混匀;沸水浴(或干浴)10分钟。

[0038] 1.2.313,000rpm离心10分钟,样本上清液可直接用于PCR检测。

[0039] 1.3DNA样品保存

[0040] 建议DNA样品立即用于PCR检测,否则4℃保存;当天不检测的样品,-20℃保存。

[0041] 2反应液配制

[0042] 2.1按表2配制PCR反应混合液,需配制的反应管总数(N)为标本数与对照品数之和。

[0043] (注意:实际计算用量时须计入损耗量)。

[0044] 表2PCR反应混合液配制要求

[0045]

组份	HPVPCR反应液	Taq酶	UNG
单人份用	17.75	0.2	0.05

[0046] 2.2将反应混合液充分混匀并短暂离心后,按每管18μl分装至各PCR反应管中;然后转移反应管至检测区。

[0047] 3加样

[0048] 向每个反应管反应液中加入2μl待测DNA样品。盖紧管盖,混匀、短暂离心后置于PCR检测仪上扩增检测。(注意:-20℃保存的DNA样品,应在加样前取出,置室温自然解冻后,13,000rpm离心1分钟,取上清用于检测)

[0049] 4PCR扩增检测

[0050] 4.1设置荧光检测参数

[0051] 设置能收集FAM、VIC、ROX、CY5荧光信号的荧光检测通道,设置方法参见各仪器使用说明。

[0052] 4.2设置PCR扩增参数设置

[0053] 按表3设置PCR扩增参数设置。

[0054] 表3扩增参数设置

步骤	循环数	温度	时间	收集荧光信号
1	1	50℃	2 min	否
2	1	95℃	10 min	否
3	40	95℃	15 sec	否
		56℃	1 min	是

[0055] 【荧光曲线和结果判断举例】

[0057] 1.HPV16阴性、HPV18阳性、HPV45阳性、内对照阳性的样本、

[0058] 使用博日9660荧光PCR检测仪检测实时的荧光曲线,该样本的孔位为D02,荧光曲

线结果见图1,结果判断如下表4:

[0059] 表4.D02孔位样本检测结果

[0060]

样本孔位	D02			
荧光信号	FAM	VIC	CY5	ROX

[0061]

CT 值	22.29	低于检测限	16.54	19.50
结果判断	12种高危型 HPV (31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68) 中的一种或多种阳性	HPV16 阴性	HPV18 阳性	内对照 阳性

[0062] 2. HPV阳性对照检测图

[0063] HPV阳性对照含HPV16重组质粒和人全基因组DNA提取物(含Beta-珠蛋白基因), 荧光曲线结果见图2,检测结果见表5:

[0064] 表5.H02孔位HPV阳性对照样本检测结果

[0065]

样本孔位	H02			
荧光信号	FAM	VIC	CY5	ROX
CT 值	低于检测限	16.7	低于检测限	22.90
结果判断	12种高危型 HPV (31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68) 阴性	HPV16 阳性	HPV18 阴性	内对照 阳性

[0066] 3. HPV阴性对照检测图

[0067] HPV阴性对照人全基因组DNA提取物(含Beta-珠蛋白基因), 荧光曲线结果见图3, 检测结果见表6:

[0068] 表6.H03孔位HPV阴性对照样本检测结果

[0069]

样本孔位	H03			
荧光信号	FAM	VIC	CY5	ROX
CT 值	低于检测限	低于检测限	低于检测限	20.20
结果判断	12种高危型 HPV (31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68) 阴性	HPV16 阴性	HPV18 阴性	内对照 阳性

[0070] 实施例2临床样本检测及与人乳头瘤病毒分型检测试剂盒(基因芯片法)对比结果

[0071] 按照实施例1的方法,对260例经人乳头瘤病毒分型检测试剂盒(基因芯片法)检测的样本进行对比检测。人乳头瘤病毒分型检测试剂盒(基因芯片法)是港龙生物技术(深圳)有限公司的HPV基因分型检测试剂盒,可检测26种HPV型别(包括HPV16、18、31、33、35、39、

45、51、52、56、58、59、68、53、66、67、73、6、11、40、42、43、44、54、55、57)。人乳头瘤病毒分型检测试剂盒(基因芯片法)检测结果表明,260例样本中包括(HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68的14种高危型)阳性145例、阴性样本115例(表2),本试剂检测阳性139例,其中检测出HPV16阳性28例、HPV18阳性12例,与人乳头瘤病毒分型检测试剂盒(基因芯片法)对HPV16和HPV18型的检测结果完全一致,上述12种高危型相对人乳头瘤病毒分型检测试剂盒(基因芯片法)的阳性符合率为99.3%,阴性符合率为95%,总符合率为97.3%。所有样本的ROX荧光检测(内对照)均为阳性。

[0072] 表1.本试剂盒与人乳头瘤病毒分型检测试剂盒(基因芯片法)对14种高危型HPV检测结果对比

本试剂盒	人乳头瘤病毒分型检测试剂盒(基因芯片法)		合计
	14种高危型阳性	14种高危性阴性	
[0073] 14种高危型阳性	139	6	145
14种高危性阴性	1	114	115
合计	140	120	260

[0074] 以上已清楚解释说明:本发明所述一种人类乳头状病毒(HPV)聚合酶链式反应(PCR)荧光检测方法,能够简便,准确检测14种高危型HPV以及对其中的HPV16和HPV18进行准确地分型检测。

[0075] 以上内容是结合具体的优选实施方式对本发明所作的进一步详细说明,不能认定本发明的具体实施只局限于这些说明。对于本发明所属技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干简单推演或替换,都应当视为属于本发明的保护范围。

[0001]

序列表

< 110 >港龙生物技术（深圳）有限公司

< 120 >同步检测多种高危型 HPV 基因型的引物组、探针组、方法及试剂盒

< 140 >201310041279.3

< 160 > 43

< 210 > 1

< 211 > 26

< 212 > DNA

< 213 >人工序列

< 221 > prim _ bind

CAATAAACCTTATTGGTTACAACGAG 26

< 210 > 2

< 211 > 30

< 212 > DNA

< 213 >人工序列

< 221 > prim _ bind

TTGTTTAATAAACCATATTGGTTACATAAG 30

< 210 > 3

< 211 > 26

< 212 > DNA

< 213 >人工序列

< 221 > prim _ bind

CCTCTGACTCCCAGTTGTTTAATAAA 26

< 210 >4

< 211 > 26

< 212 > DNA

< 213 >人工序列

< 221 > prim _ bind

TAATAAGCCATATTGGCTACAACGTG 26

< 210 >5

< 211 > 27

< 212 > DNA

< 213 >人工序列

< 221 > prim _ bind

TCCGATGCACAAATATTTAATAAACCA 27

[0002]

< 210 >6

< 211 > 26

< 212 > DNA

< 213 >人工序列

< 221 > prim _ bind

TTATTTAATAAGCCTTATTGGCTACA 26

< 210 >7

< 211 > 25

< 212 > DNA

< 213 >人工序列

< 221 > prim _ bind

TTTAATAAGCCTTATTGGCTCCACC 25

< 210 >8

< 211 > 28

< 212 > DNA

< 213 >人工序列

< 221 > prim _ bind

AGAATCCCAATTATTTAATAAACCGTAC 28

< 210 >9

< 211 > 33

< 212 > DNA

< 213 >人工序列

< 221 > prim _ bind

AGATACTACTAGAAGTACTAACATGACTATTAG 33

[0003]

< 210 >10

< 211 > 25

< 212 > DNA

< 213 >人工序列

< 221 > prim _ bind

TTATTTAATAAACCATATTGGCTGC 25

< 210 >11

< 211 > 22

< 212 > DNA

< 213 >人工序列

< 221 > prim _ bind

TAACAAgCCCTATTggCTgCAC 22

< 210 >12

< 211 > 28

< 212 > DNA

< 213 >人工序列

< 221 > prim _ bind

CTCTGAGGCCCAATTATTTAATAAACCT 28

< 210 >13

< 211 > 21

< 212 > DNA

< 213 >人工序列

< 221 > prim _ bind

TTGGACCCAGAGGTTCTTTGA 21

[0004]

< 210 >14

< 211 > 29

< 212 > DNA

< 213 >人工序列

< 221 > prim _ bind

CTGAAGTAGATATGGCAGCACATAATGAC 29

< 210 >15

< 211 > 27

< 212 > DNA

< 213 >人工序列

< 221 > prim _ bind

CAGGTACAGGAGACTGTGTAGAAGCAC 27

< 210 >16

< 211 > 22

< 212 > DNA

< 213 >人工序列

< 221 > prim _ bind

GCAATTGCAGCACAAACAGACA 22

< 210 >17

< 211 > 31

< 212 > DNA

< 213 >人工序列

< 221 > prim _ bind

GTACTGTCACTAGTTACTTGTGTGCATAAAG 31

[0005]

< 210 >18

< 211 > 27

< 212 > DNA

< 213 >人工序列

< 221 > prim _ bind

TGTACTGTCACTAGAAGACACAGCAGA 27

< 210 >19

< 211 > 31

< 212 > DNA

< 213 >人工序列

< 221 > prim _ bind

GAGGTAGATAATGTAAAGTTGGTACTACGGG 31

< 210 >20

< 211 > 25

< 212 > DNA

< 213 >人工序列

< 221 > prim _ bind

CTTGGCACAGGATTTTGTGTAGAGG 25

< 210 >21

< 211 > 18

< 212 > DNA

< 213 >人工序列

< 221 > prim _ bind

GGGGAAACCGCAGCAGTG 18

[0006]

< 210 >22

< 211 > 24

< 212 > DNA

< 213 >人工序列

< 221 > prim _ bind

GCTTTCCTTTTAAACCTCAGCACA 24

< 210 >23

< 211 > 29

< 212 > DNA

< 213 >人工序列

< 221 > prim _ bind

ACTGTTCTGTAGCAGTACTAATAGTCATG 29

< 210 >24

< 211 > 27

< 212 > DNA

< 213 >人工序列

< 221 > prim _ bind

TGTACCTTCCTTAGTTACTTCAGTGCA 27

< 210 >25

< 211 > 28

< 212 > DNA

< 213 >人工序列

< 221 > prim _ bind

CTGGTAGGTGTGTATACATTAGGAATAG 28

[0007]

< 210 >26

< 211 > 28

< 212 > DNA

< 213 >人工序列

< 221 > prim _ bind

TGGTACAGCTGATTCAGTAGTAGTAGAC 28

< 210 >27

< 211 > 28

< 212 > DNA

< 213 >人工序列

< 221 > prim _ bind

GTTAATGTGCTTTTAGCTGCATTAATAG 28

< 210 >28

< 211 > 21

< 212 > DNA

< 213 >人工序列

< 221 > prim _ bind

GCCATGAGCCTTCACCTTAGG 21

< 210 >29

< 211 > 16

< 212 > DNA

< 213 >人工序列

< 221 > prim _ bind

CACAGGGCCACAATAA 16

[0008]

< 210 >30

< 211 > 17

< 212 > DNA

< 213 >人工序列

< 221 > prim _ bind

GCACAGGGTCATAACAA 17

< 210 >31

< 211 > 16

< 212 > DNA

< 213 >人工序列

< 221 > prim _ bind

GGATGCAACGTGCTCA 16

<210>32

<211>19

<212>DNA

<213>人工序列

<221>prim_bind

GTGCACAAGGTCATAATAA 19

<210>33

<211>17

<212>DNA

<213>人工序列

<221>prim_bind

GCACAAGGCCATAATAA 17

[0009]

<210>34

<211>15

<212>DNA

<213>人工序列

<221>prim_bind

CCAGGGCCACAACAA 15

<210>35

<211>16

<212>DNA

<213>人工序列

<221>prim_bind

CCCAGGGCCATAACAA 16

<210>36

<211>16

<212>DNA

<213>人工序列

<221>prim_bind

CGCAGGGTCACAATAA 16

<210>37

<211>14

<212>DNA

<213>人工序列

<221>prim_bind

CAACGTGCGCAGGG 14

[0010]

<210>38

<211>17

<212>DNA

<213>人工序列

<221>prim_bind

CCCAAGGCCATAATAAT 17

<210>39

<211>19

<212>DNA

<213>人工序列

<221>prim_bind

TGCACAAGGTCATAACAAT 19

< 210 >40
< 211 > 18
< 212 > DNA
< 213 >人工序列
< 221 > prim _ bind
GGCTCAGGGTTTAAACAA 18

< 210 >41
< 211 > 17
< 212 > DNA
< 213 >人工序列
< 221 > prim _ bind
GCACAGGGACACAACAA 17

[0011]

< 210 >42
< 211 > 17
< 212 > DNA
< 213 >人工序列
< 221 > prim _ bind
CACAGGGCCATAATAAT 17

< 210 >43
< 211 > 18
< 212 > DNA
< 213 >人工序列
< 221 > prim _ bind
TCIGTCCACTCCTGATGC 18

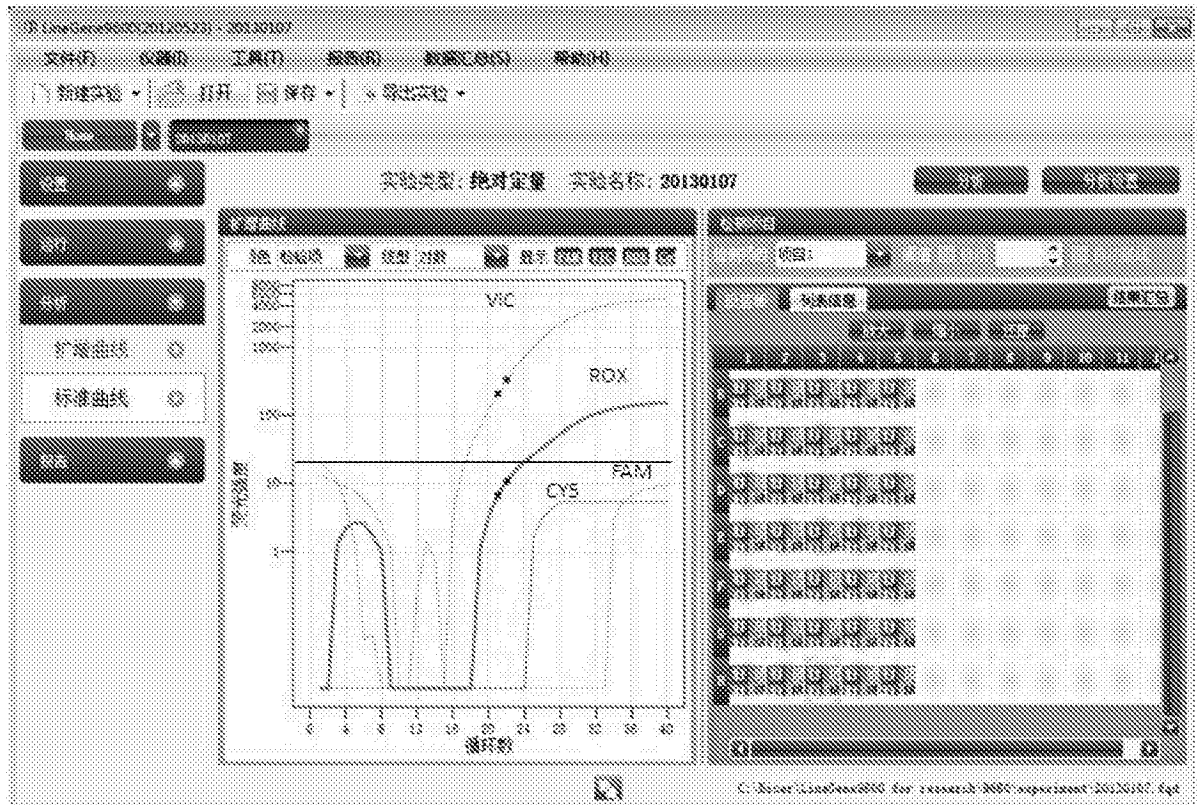


图2

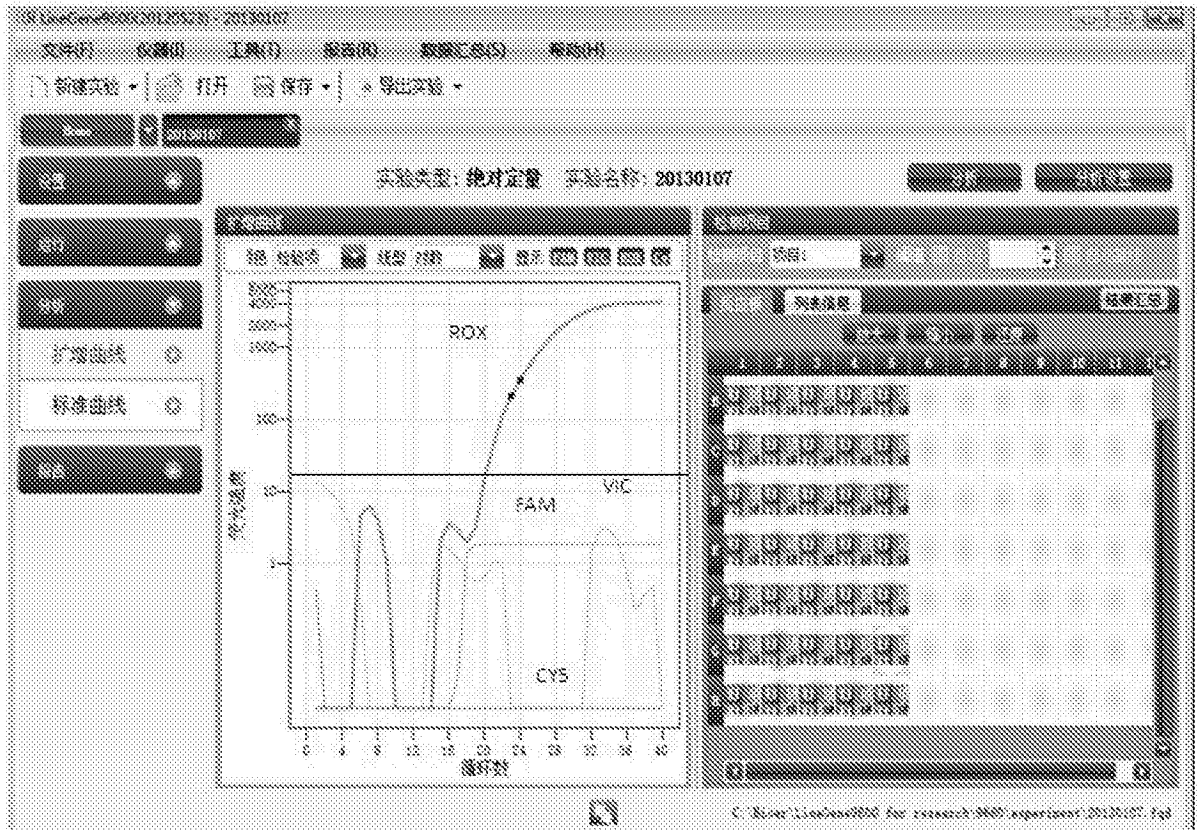


图3