



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101918550 B

(45) 授权公告日 2013. 12. 25

(21) 申请号 200880109655. 5

C12Q 1/68 (2006. 01)

(22) 申请日 2008. 08. 01

C12Q 1/70 (2006. 01)

(30) 优先权数据

2007-203677 2007. 08. 03 JP

(56) 对比文件

CN 1646705 A, 2005. 07. 27,

CN 1948503 A, 2007. 04. 18,

W0 2006077102 A2, 2006. 07. 27,

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 03. 26

审查员 冯晓亮

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2008/063906 2008. 08. 01

(87) PCT申请的公布数据

W02009/020079 JA 2009. 02. 12

(73) 专利权人 仓敷纺绩株式会社

地址 日本冈山县

(72) 发明人 森下笃 宫川功 小乡和彦

川上明子 尾川直树

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 梁谋 郭文洁

(51) Int. Cl.

C12N 15/09 (2006. 01)

C12M 1/00 (2006. 01)

权利要求书4页 说明书35页

序列表21页 附图4页

(54) 发明名称

用于检测人乳头瘤病毒的引物组和探针

(57) 摘要

本发明的目的是以高特异性和高灵敏度检测两种或更多种 HPV 类型。本发明提供 : 引物组 1 ~ 23 (各引物组如说明书中所记载), 探针 1 ~ 23 (各探针如说明书中所记载), 以及包含所述引物组和所述探针的试剂盒, 它们所有都用于 HPV 的型特异性检测。

1. 一种用于检测人乳头瘤病毒 HPV 的试剂盒,所述试剂盒包含:

(3) 引物组 3 和探针 3 的组合,所述引物组 3 的组成如下:由 SEQ ID NO:5 所示碱基序列构成的引物和由 SEQ ID NO:6 所示碱基序列构成的引物;所述探针 3 的组成如下:SEQ ID NO:51 所示碱基序列或与 SEQ ID NO:51 所示碱基序列互补的碱基序列。

2. 权利要求 1 的试剂盒,所述试剂盒还包含一种或多种选自下述的组合:

(4) 引物组 4 和探针 4 的组合,所述引物组 4 的组成如下:由 SEQ ID NO:7 所示碱基序列构成的引物和由 SEQ ID NO:8 所示碱基序列构成的引物;所述探针 4 的组成如下:SEQ ID NO:52 所示碱基序列或与 SEQ ID NO:52 所示碱基序列互补的碱基序列,

(6) 引物组 6 和探针 6 的组合,所述引物组 6 的组成如下:由 SEQ ID NO:11 所示碱基序列构成的引物和由 SEQ ID NO:12 所示碱基序列构成的引物;所述探针 6 的组成如下:SEQ ID NO:54 所示碱基序列或与 SEQ ID NO:54 所示碱基序列互补的碱基序列,

(7) 引物组 7 和探针 7 的组合,所述引物组 7 的组成如下:由 SEQ ID NO:13 所示碱基序列构成的引物和由 SEQ ID NO:14 所示碱基序列构成的引物;所述探针 7 的组成如下:SEQ ID NO:55 所示碱基序列或与 SEQ ID NO:55 所示碱基序列互补的碱基序列,

(9) 引物组 9 和探针 9 的组合,所述引物组 9 的组成如下:由 SEQ ID NO:17 所示碱基序列构成的引物和由 SEQ ID NO:18 所示碱基序列构成的引物;所述探针 9 的组成如下:SEQ ID NO:57 所示碱基序列或与 SEQ ID NO:57 所示碱基序列互补的碱基序列,

(10) 引物组 10 和探针 10 的组合,所述引物组 10 的组成如下:由 SEQ ID NO:19 所示碱基序列构成的引物和由 SEQ ID NO:20 所示碱基序列构成的引物;所述探针 10 的组成如下:SEQ ID NO:58 所示碱基序列或与 SEQ ID NO:58 所示碱基序列互补的碱基序列,

(13) 引物组 13 和探针 13 的组合,所述引物组 13 的组成如下:由 SEQ ID NO:25 所示碱基序列构成的引物和由 SEQ ID NO:26 所示碱基序列构成的引物;所述探针 13 的组成如下:SEQ ID NO:61 所示碱基序列或与 SEQ ID NO:61 所示碱基序列互补的碱基序列,

(14) 引物组 14 和探针 14 的组合,所述引物组 14 的组成如下:由 SEQ ID NO:27 所示碱基序列构成的引物和由 SEQ ID NO:28 所示碱基序列的引物;所述探针 14 的组成如下:SEQ ID NO:62 所示碱基序列或与 SEQ ID NO:62 所示碱基序列互补的碱基序列,

(15) 引物组 15 和探针 15 的组合,所述引物组 15 的组成如下:由 SEQ ID NO:29 所示碱基序列构成的引物和由 SEQ ID NO:30 所示碱基序列构成的引物;所述探针 15 的组成如下:SEQ ID NO:63 所示碱基序列或与 SEQ ID NO:63 所示碱基序列互补的碱基序列,

(18) 引物组 18 和探针 18 的组合,所述引物组 18 的组成如下:由 SEQ ID NO:35 所示碱基序列构成的引物和由 SEQ ID NO:36 所示碱基序列构成的引物;所述探针 18 的组成如下:SEQ ID NO:66 所示碱基序列或与 SEQ ID NO:66 所示碱基序列互补的碱基序列,

(19) 引物组 19 和探针 19 的组合,所述引物组 19 的组成如下:由 SEQ ID NO:37 所示碱基序列构成的引物和由 SEQ ID NO:38 所示碱基序列构成的引物;所述探针 19 的组成如下:SEQ ID NO:67 所示碱基序列或与 SEQ ID NO:67 所示碱基序列互补的碱基序列,

(20) 引物组 20 和探针 20 的组合,所述引物组 20 的组成如下:由 SEQ ID NO:39 所示碱基序列构成的引物和由 SEQ ID NO:40 所示碱基序列构成的引物;所述探针 20 的组成如下:SEQ ID NO:68 所示碱基序列或与 SEQ ID NO:68 所示碱基序列互补的碱基序列,

(22) 引物组 22 和探针 22 的组合,所述引物组 22 的组成如下:由 SEQ ID NO:43 所示

碱基序列构成的引物和由 SEQ ID NO :44 所示碱基序列构成的引物 ;所述探针 22 的组成如下 :SEQ ID NO :70 所示碱基序列或与 SEQ ID NO :70 所示碱基序列互补的碱基序列,

(23) 引物组 23 和探针 23 的组合,所述引物组 23 的组成如下 :由 SEQ ID NO :45 所示碱基序列构成的引物和由 SEQ ID NO :46 所示碱基序列构成的引物 ;所述探针 23 的组成如下 :SEQ ID NO :71 所示碱基序列或与 SEQ ID NO :71 所示碱基序列互补的碱基序列,

(1) 引物组 1 和探针 1 的组合,所述引物组 1 的组成如下 :由 SEQ ID NO :1 所示碱基序列构成的引物和由 SEQ ID NO :2 所示碱基序列构成的引物 ;所述探针 1 的组成如下 :SEQ ID NO :49 所示碱基序列或与 SEQ ID NO :49 所示碱基序列互补的碱基序列,

(2) 引物组 2 和探针 2 的组合,所述引物组 2 的组成如下 :由 SEQ ID NO :3 所示碱基序列构成的引物和由 SEQ ID NO :4 所示碱基序列构成的引物 ;所述探针 2 的组成如下 :SEQ ID NO :50 所示碱基序列或与 SEQ ID NO :50 所示碱基序列互补的碱基序列,

(5) 引物组 5 和探针 5 的组合,所述引物组 5 的组成如下 :由 SEQ ID NO :9 所示碱基序列构成的引物和由 SEQ ID NO :10 所示碱基序列构成的引物 ;所述探针 5 的组成如下 :SEQ ID NO :53 所示碱基序列或与 SEQ ID NO :53 所示碱基序列互补的碱基序列,

(8) 引物组 8 和探针 8 的组合,所述引物组 8 的组成如下 :由 SEQ ID NO :15 所示碱基序列构成的引物和由 SEQ ID NO :16 所示碱基序列构成的引物 ;所述探针 8 的组成如下 :SEQ ID NO :56 所示碱基序列或与 SEQ ID NO :56 所示碱基序列互补的碱基序列,

(11) 引物组 11 和探针 11 的组合,所述引物组 11 的组成如下 :由 SEQ ID NO :21 所示碱基序列构成的引物和由 SEQ ID NO :22 所示碱基序列构成的引物 ;所述探针 11 的组成如下 :SEQ ID NO :59 所示碱基序列或与 SEQ ID NO :59 所示碱基序列互补的碱基序列,

(12) 引物组 12 和探针 12 的组合,所述引物组 12 的组成如下 :由 SEQ ID NO :23 所示碱基序列构成的引物和由 SEQ ID NO :24 所示碱基序列构成的引物 ;所述探针 12 的组成如下 :SEQ ID NO :60 所示碱基序列或与 SEQ ID NO :60 所示碱基序列互补的碱基序列,

(16) 引物组 16 和探针 16 的组合,所述引物组 16 的组成如下 :由 SEQ ID NO :31 所示碱基序列构成的引物和由 SEQ ID NO :32 所示碱基序列构成的引物 ;所述探针 16 的组成如下 :SEQ ID NO :64 所示碱基序列或与 SEQ ID NO :64 所示碱基序列互补的碱基序列,

(17) 引物组 17 和探针 17 的组合,所述引物组 17 的组成如下 :由 SEQ ID NO :33 所示碱基序列构成的引物和由 SEQ ID NO :34 所示碱基序列构成的引物 ;所述探针 17 的组成如下 :SEQ ID NO :65 所示碱基序列或与 SEQ ID NO :65 所示碱基序列互补的碱基序列,以及

(21) 引物组 21 和探针 21 的组合,所述引物组 21 的组成如下 :由 SEQ ID NO :41 所示碱基序列构成的引物和由 SEQ ID NO :42 所示碱基序列构成的引物 ;所述探针 21 的组成如下 :SEQ ID NO :69 所示碱基序列或与 SEQ ID NO :69 所示碱基序列互补的碱基序列。

3. 权利要求 2 的试剂盒,所述试剂盒包含 :引物组 3 和探针 3 的组合、以及引物组 4 和探针 4 的组合。

4. 权利要求 3 的试剂盒,所述试剂盒还包含 :引物组 6 和探针 6 的组合、引物组 7 和探针 7 的组合、引物组 9 和探针 9 的组合、引物组 10 和探针 10 的组合、引物组 13 和探针 13 的组合、引物组 14 和探针 14 的组合、引物组 15 和探针 15 的组合、引物组 18 和探针 18 的组合、引物组 19 和探针 19 的组合、引物组 20 和探针 20 的组合、引物组 22 和探针 22 的组合、以及引物组 23 和探针 23 的组合。

5. 权利要求 4 的试剂盒,所述试剂盒还包含:引物组 1 和探针 1 的组合、引物组 2 和探针 2 的组合、引物组 5 和探针 5 的组合、引物组 8 和探针 8 的组合、引物组 11 和探针 11 的组合、引物组 12 和探针 12 的组合、引物组 16 和探针 16 的组合、引物组 17 和探针 17 的组合、以及引物组 21 和探针 21 的组合。

6. 引物组 3 和探针 3 的组合在制备用于以型特异性方式检测样品中 HPV 存在与否的试剂或试剂盒中的应用,所述引物组 3 的组成如下:由 SEQ ID NO:5 所示碱基序列构成的引物和由 SEQ ID NO:6 所示碱基序列构成的引物;所述探针 3 的组成如下:SEQ ID NO:51 所示碱基序列或与 SEQ ID NO:51 所示碱基序列互补的碱基序列。

7. 一种用于扩增人乳头瘤病毒 HPV 基因的 PCR 引物组,所述引物组包含:

(3) 引物组 3,其组成如下:由 SEQ ID NO:5 所示碱基序列构成的引物和由 SEQ ID NO:6 所示碱基序列构成的引物。

8. 一种用于检测人乳头瘤病毒 HPV 的探针,所述探针包含:

(3) 探针 3,其组成如下:SEQ ID NO:51 所示碱基序列或与 SEQ ID NO:51 所示碱基序列互补的碱基序列。

9. 一种用于检测 HPV 的 DNA 微阵列,其中将探针 3 固定化,所述探针 3 的组成如下:SEQ ID NO:51 所示碱基序列或与 SEQ ID NO:51 所示碱基序列互补的碱基序列。

10. 权利要求 9 的 DNA 微阵列,其中还将一种或多种选自下述探针 1、2 和 4 ~ 23 的探针固定化:

(1) 探针 1,其组成如下:SEQ ID NO:49 所示碱基序列或与 SEQ ID NO:49 所示碱基序列互补的碱基序列,

(2) 探针 2,其组成如下:SEQ ID NO:50 所示碱基序列或与 SEQ ID NO:50 所示碱基序列互补的碱基序列,

(4) 探针 4,其组成如下:SEQ ID NO:52 所示碱基序列或与 SEQ ID NO:52 所示碱基序列互补的碱基序列,

(5) 探针 5,其组成如下:SEQ ID NO:53 所示碱基序列或与 SEQ ID NO:53 所示碱基序列互补的碱基序列,

(6) 探针 6,其组成如下:SEQ ID NO:54 所示碱基序列或与 SEQ ID NO:54 所示碱基序列互补的碱基序列,

(7) 探针 7,其组成如下:SEQ ID NO:55 所示碱基序列或与 SEQ ID NO:55 所示碱基序列互补的碱基序列,

(8) 探针 8,其组成如下:SEQ ID NO:56 所示碱基序列或与 SEQ ID NO:56 所示碱基序列互补的碱基序列,

(9) 探针 9,其组成如下:SEQ ID NO:57 所示碱基序列或与 SEQ ID NO:57 所示碱基序列互补的碱基序列,

(10) 探针 10,其组成如下:SEQ ID NO:58 所示碱基序列或与 SEQ ID NO:58 所示碱基序列互补的碱基序列,

(11) 探针 11,其组成如下:SEQ ID NO:59 所示碱基序列或与 SEQ ID NO:59 所示碱基序列互补的碱基序列,

(12) 探针 12,其组成如下:SEQ ID NO:60 所示碱基序列或与 SEQ ID NO:60 所示碱基

序列互补的碱基序列，

(13) 探针 13,其组成如下:SEQ ID NO:61 所示碱基序或与 SEQ ID NO:61 所示碱基序列互补的碱基序列，

(14) 探针 14,其组成如下:SEQ ID NO:62 所示碱基序列或与 SEQ ID NO:62 所示碱基序列互补的碱基序列，

(15) 探针 15,其组成如下:SEQ ID NO:63 所示碱基序列或与 SEQ ID NO:63 所示碱基序列互补的碱基序列，

(16) 探针 16,其组成如下:SEQ ID NO:64 所示碱基序列或与 SEQ ID NO:64 所示碱基序列互补的碱基序列，

(17) 探针 17,其组成如下:SEQ ID NO:65 所示碱基序列或与 SEQ ID NO:65 所示碱基序列互补的碱基序列，

(18) 探针 18,其组成如下:SEQ ID NO:66 所示碱基序列或与 SEQ ID NO:66 所示碱基序列互补的碱基序列，

(19) 探针 19,其组成如下:SEQ ID NO:67 所示碱基序列或与 SEQ ID NO:67 所示碱基序列互补的碱基序列，

(20) 探针 20,其组成如下:SEQ ID NO:68 所示碱基序列或与 SEQ ID NO:68 所示碱基序列互补的碱基序列，

(21) 探针 21,其组成如下:SEQ ID NO:69 所示碱基序列或与 SEQ ID NO:69 所示碱基序列互补的碱基序列，

(22) 探针 22,其组成如下:SEQ ID NO:70 所示碱基序列或与 SEQ ID NO:70 所示碱基序列互补的碱基序列，以及

(23) 探针 23,其组成如下:SEQ ID NO:71 所示碱基序列或与 SEQ ID NO:71 所示碱基序列互补的碱基序列。

用于检测人乳头瘤病毒的引物组和探针

技术领域

[0001] 本发明涉及用于特异性检测人乳头瘤病毒的引物组和探针。本发明还涉及使用所述引物组和探针特异性检测人乳头瘤病毒的方法。

背景技术

[0002] 人乳头瘤病毒 (Human papillomavirus, HPV) 是在基因组中具有约 8000 碱基对的环状双链 DNA 的小型病毒,可引起人类特异性感染。据报道,存在多达 100 多种 HPV 亚型,主要分为在皮肤病变例如疣等中检出的亚型(嗜皮肤性 HPV(skin tropic HPV)),以及在黏膜病变中检出的亚型(嗜黏膜性 HPV)。此外,嗜黏膜性 HPV 被分成涉及例如宫颈癌、肛周癌、阴茎癌等癌症的高危型(HPV16、HPV18 等)以及涉及良性尖锐湿疣等的低危型(HPV6、HPV11 等)。WHO 估计,全球女性恶性肿瘤的 11% 涉及 HPV 感染,即大约有 45 万人受累于 HPV 感染,全球有 3 亿 HPV 感染携带者,说明 HPV 是一种常见的病毒。特别是宫颈癌患者中几乎总是检出 HPV。

[0003] 宫颈癌位居全球人数最多的女性癌症的第二位,全球每年大约有 25 万人,日本每年大约有 2500 人死于宫颈癌。因此,宫颈癌的预防、诊断和治疗一直被视作是对女性健康十分重大的问题。幸运的是,预防宫颈癌是可能的。其原因是通过细胞学诊断等,可以发现作为宫颈癌癌前期病变的发育异常,而且通过简单治疗就可以治愈这种发育异常。由于发育异常是由 HPV 感染引起的,因此越来越多地认识到对 HPV 遗传筛查的重要性,这样就能够更早更准确地发现宫颈癌或癌前期病变。

[0004] HPV 遗传筛查方法主要被分成包括直接检测 HPV DNA 的方法和包括在检测 DNA 前通过聚合酶链式反应 (PCR) 使 HPV DNA 扩增的方法。

[0005] 一种无需采用 PCR 的代表性方法是杂交俘获方法 (hybrid capture method)。在这种方法中,使 RNA 探针与样品中的 HPV DNA 杂交,采用抗体通过免疫测定法来检测所得到的 DNA/RNA 杂合体。由于方便,因此该方法目前是 HPV 遗传筛查的主要方法。另一方面,该方法由于使用 RNA 探针而导致的灵敏度低,稳定性低,而且污染的可能性无法排除,因此其可靠性低。此外,即使可以采用该方法鉴定出感染的 HPV 是高危型还是低危型,却都无法鉴定其亚型。

[0006] 在采用 PCR 的方法中,通过包括用限制性内切酶切割和用电泳检测条带的方法,或者包括与 DNA 微阵列上的探针杂交的检测方法,来检测扩增的 DNA。前一种利用电泳的检测方法可在普通实验室设备上进行,在经济实用方面具有优势。然而缺点是需要复杂的步骤,而且鉴定的亚型不完全。另一方面,后一种利用与探针杂交的检测方法具有亚型鉴定的检测灵敏度高和特异性高。然而,在快速和经济实用方面存在问题。

[0007] 至于通过 PCR 的 DNA 扩增,使用型特异性引物 (type-specific primer) 使 HPV 基因进行型特异性扩增的方法和使用随机引物或非型特异性引物 (non-type-specific primer) 使 HPV 基因进行非型特异性扩增的方法是已知的。

[0008] 在专利文献 1 和 2 所公开的方法中,使用型特异性引物通过 PCR 使 DNA 扩增。使

用扩增的双链 DNA 本身作为探针,将扩增的 DNA 与专利文献 1 中的 DNA 微阵列进行杂交,并进行专利文献 2 中的电泳以检测 HPV DNA 的存在与否。这些方法通过使用型特异性引物实现了高特异性和高灵敏度的扩增。甚至当使用引物的混合物时,也能够特异性地检出特定的 HPV 类型。

[0009] 另一方面,在专利文献 3 所公开的方法中,使用非型特异性引物使 HPV DNA 扩增,并使用短的单链寡聚 DNA 作为探针与 DNA 微阵列杂交以检测 HPV DNA。由于该方法使用了普通引物,因此这在合成成本和设计简易性上是有利的。然而,即使通过使用短探针提高杂交的特异性,在某种程度上可以克服 PCR 中的低特异性和低灵敏度,但是总体灵敏度仍很低。即使按照专利文献 4 所公开的方法制备各种 HPV 类型的引物,由于相应的引物序列几乎相同,因此引物的制备方法仍被视为与专利文献 3 的方法几乎相同。

[0010] 在此情况下,需要开发在快速、方便和经济实用方面具有优势、能够以高特异性和高灵敏度检测多种 HPV 类型的方法。

[0011] [专利文献 1] JP-A-2004-121240

[0012] [专利文献 2] JP-A-2006-345800

[0013] [专利文献 3] 专利申请公布号 2005-503177

[0014] [专利文献 4] 专利申请公布号 2005-519611

发明内容

[0015] 发明要解决的技术问题

[0016] 本发明旨在提供用于以高特异性和高灵敏度检测多种 HPV 类型的引物组和探针。本发明还旨在提供使用上述引物组和探针以高特异性和高灵敏度检测多种 HPV 类型的方法。

[0017] 解决技术问题采用的技术方案

[0018] 在尝试解决上述技术问题时,本发明的发明人注意到一种检测 HPV 基因的方法,并进行了广泛深入的研究,该方法包括使用型特异性引物通过 PCR 使 HPV 基因扩增,使 PCR 扩增产物与用于检测的 DNA 微阵列杂交。因此,本发明的发明人发现通过使用本发明的引物组和探针,可以方便快速地以高特异性和高灵敏度检测多种 HPV 类型,这导致了本发明的完成。

[0019] 因此,本发明提供下列方面。

[0020] [1] 一种用于扩增人乳头瘤病毒 (HPV) 基因的 PCR 引物组,所述引物组是至少一种选自以下的引物组:

[0021] (1) 引物组 1,由包含 SEQ ID NO:1 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO:1 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,以及包含 SEQ ID NO:2 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO:2 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体组成,

[0022] (2) 引物组 2,由包含 SEQ ID NO:3 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO:3 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,以及包含 SEQ ID NO:4 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包

含在严格条件下与同 SEQ ID NO :4 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体组成,

[0023] (3) 引物组 3, 由包含 SEQ ID NO :5 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :5 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体, 以及包含 SEQ ID NO :6 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :6 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体组成,

[0024] (4) 引物组 4, 由包含 SEQ ID NO :7 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :7 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体, 以及包含 SEQ ID NO :8 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :8 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体组成,

[0025] (5) 引物组 5, 由包含 SEQ ID NO :9 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :9 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体, 以及包含 SEQ ID NO :10 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :10 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体组成,

[0026] (6) 引物组 6, 由包含 SEQ ID NO :11 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :11 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体, 以及包含 SEQ ID NO :12 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :12 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体组成,

[0027] (7) 引物组 7, 由包含 SEQ ID NO :13 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :13 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体, 以及包含 SEQ ID NO :14 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :14 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体组成,

[0028] (8) 引物组 8, 由包含 SEQ ID NO :15 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :15 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体, 以及包含 SEQ ID NO :16 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :16 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体组成,

[0029] (9) 引物组 9, 由包含 SEQ ID NO :17 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :17 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体, 以及包含 SEQ ID NO :18 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :18 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体组成,

[0030] (10) 引物组 10, 由包含 SEQ ID NO :19 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :19 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱

基序列的变异体,以及包含 SEQ ID NO:20 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO:20 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体组成,

[0031] (11) 引物组 11,由包含 SEQ ID NO:21 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO:21 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,以及包含 SEQ ID NO:22 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO:22 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体组成,

[0032] (12) 引物组 12,由包含 SEQ ID NO:23 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO:23 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,以及包含 SEQ ID NO:24 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO:24 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体组成,

[0033] (13) 引物组 13,由包含 SEQ ID NO:25 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO:25 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,以及包含 SEQ ID NO:26 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO:26 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体组成,

[0034] (14) 引物组 14,由包含 SEQ ID NO:27 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO:27 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,以及包含 SEQ ID NO:28 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO:28 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体组成,

[0035] (15) 引物组 15,由包含 SEQ ID NO:29 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO:29 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,以及包含 SEQ ID NO:30 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO:30 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体组成,

[0036] (16) 引物组 16,由包含 SEQ ID NO:31 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO:31 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,以及包含 SEQ ID NO:32 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO:32 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体组成,

[0037] (17) 引物组 17,由包含 SEQ ID NO:33 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO:33 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,以及包含 SEQ ID NO:34 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO:34 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体组成,

[0038] (18) 引物组 18,由包含 SEQ ID NO:35 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引

物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :35 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,以及包含 SEQ ID NO :36 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :36 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体组成,

[0039] (19) 引物组 19,由包含 SEQ ID NO :37 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :37 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,以及包含 SEQ ID NO :38 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :38 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体组成,

[0040] (20) 引物组 20,由包含 SEQ ID NO :39 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :39 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,以及包含 SEQ ID NO :40 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :40 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体组成,

[0041] (21) 引物组 21,由包含 SEQ ID NO :41 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :41 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,以及包含 SEQ ID NO :42 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :42 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体组成,

[0042] (22) 引物组 22,由包含 SEQ ID NO :43 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :43 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,以及包含 SEQ ID NO :44 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :44 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体组成,和

[0043] (23) 引物组 23,由包含 SEQ ID NO :45 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :45 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,以及包含 SEQ ID NO :46 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :46 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体组成。

[0044] [2] 一种用于检测人乳头瘤病毒 (HPV) 的探针,所述探针是至少一种选自以下的探针:

[0045] (1) 包含 SEQ ID NO :49 所示碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :49 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,或者包含与 SEQ ID NO :49 所示碱基序列互补的碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与 SEQ ID NO :49 所示碱基序列杂交的碱基序列的变异体(探针 1),

[0046] (2) 包含 SEQ ID NO :50 所示碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :50 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,或者包含与 SEQ ID NO :50 所示碱基序列互补的碱基序列的探针或其同样具有作为探针

的功能且包含在严格条件下与 SEQ ID NO :50 所示碱基序列杂交的碱基序列的变异体 (探针 2),

[0047] (3) 包含 SEQ ID NO :51 所示碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :51 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体, 或者包含与 SEQ ID NO :51 所示碱基序列互补的碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与 SEQ ID NO :51 所示碱基序列杂交的碱基序列的变异体 (探针 3),

[0048] (4) 包含 SEQ ID NO :52 所示碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :52 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体, 或者包含与 SEQ ID NO :52 所示碱基序列互补的碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与 SEQ ID NO :52 所示碱基序列杂交的碱基序列的变异体 (探针 4),

[0049] (5) 包含 SEQ ID NO :53 所示碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :53 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体, 或者包含与 SEQ ID NO :53 所示碱基序列互补的碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与 SEQ ID NO :53 所示碱基序列杂交的碱基序列的变异体 (探针 5),

[0050] (6) 包含 SEQ ID NO :54 所示碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :54 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体, 或者包含与 SEQ ID NO :54 所示碱基序列互补的碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与 SEQ ID NO :54 所示碱基序列杂交的碱基序列的变异体 (探针 6),

[0051] (7) 包含 SEQ ID NO :55 所示碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :55 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体, 或者包含与 SEQ ID NO :55 所示碱基序列互补的碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与 SEQ ID NO :55 所示碱基序列杂交的碱基序列的变异体 (探针 7),

[0052] (8) 包含 SEQ ID NO :56 所示碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :56 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体, 或者包含与 SEQ ID NO :56 所示碱基序列互补的碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与 SEQ ID NO :56 所示碱基序列杂交的碱基序列的变异体 (探针 8),

[0053] (9) 包含 SEQ ID NO :57 所示碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :57 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体, 或者包含与 SEQ ID NO :57 所示碱基序列互补的碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与 SEQ ID NO :57 所示碱基序列杂交的碱基序列的变异体 (探针 9),

[0054] (10) 包含 SEQ ID NO :58 所示碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :58 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变

异体,或者包含与 SEQ ID NO :58 所示碱基序列互补的碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与 SEQ ID NO :58 所示碱基序列杂交的碱基序列的变异体(探针 10),

[0055] (11) 包含 SEQ ID NO :59 所示碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :59 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,或者包含与 SEQ ID NO :59 所示碱基序列互补的碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与 SEQ ID NO :59 所示碱基序列杂交的碱基序列的变异体(探针 11),

[0056] (12) 包含 SEQ ID NO :60 所示碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :60 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,或者包含与 SEQ ID NO :60 所示碱基序列互补的碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与 SEQ ID NO :60 所示碱基序列杂交的碱基序列的变异体(探针 12),

[0057] (13) 包含 SEQ ID NO :61 所示碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :61 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,或者包含与 SEQ ID NO :61 所示碱基序列互补的碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与 SEQ ID NO :61 所示碱基序列杂交的碱基序列的变异体(探针 13),

[0058] (14) 包含 SEQ ID NO :62 所示碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :62 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,或者包含与 SEQ ID NO :62 所示碱基序列互补的碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与 SEQ ID NO :62 所示碱基序列杂交的碱基序列的变异体(探针 14),

[0059] (15) 包含 SEQ ID NO :63 所示碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :63 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,或者包含与 SEQ ID NO :63 所示碱基序列互补的碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与 SEQ ID NO :63 所示碱基序列杂交的碱基序列的变异体(探针 15),

[0060] (16) 包含 SEQ ID NO :64 所示碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :64 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,或者包含与 SEQ ID NO :64 所示碱基序列互补的碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与 SEQ ID NO :64 所示碱基序列杂交的碱基序列的变异体(探针 16),

[0061] (17) 包含 SEQ ID NO :65 所示碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :65 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,或者包含与 SEQ ID NO :65 所示碱基序列互补的碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与 SEQ ID NO :65 所示碱基序列杂交的碱基序列的变异体(探针 17),

[0062] (18) 包含 SEQ ID NO :66 所示碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包

含在严格条件下与同 SEQ ID NO :66 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,或者包含与 SEQ ID NO :66 所示碱基序列互补的碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与 SEQ ID NO :66 所示碱基序列杂交的碱基序列的变异体(探针 18),

[0063] (19) 包含 SEQ ID NO :67 所示碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :67 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,或者包含与 SEQ ID NO :67 所示碱基序列互补的碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与 SEQ ID NO :67 所示碱基序列杂交的碱基序列的变异体(探针 19),

[0064] (20) 包含 SEQ ID NO :68 所示碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :68 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,或者包含与 SEQ ID NO :68 所示碱基序列互补的碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与 SEQ ID NO :68 所示碱基序列杂交的碱基序列的变异体(探针 20),

[0065] (21) 包含 SEQ ID NO :69 所示碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :69 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,或者包含与 SEQ ID NO :69 所示碱基序列互补的碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与 SEQ ID NO :69 所示碱基序列杂交的碱基序列的变异体(探针 21),

[0066] (22) 包含 SEQ ID NO :70 所示碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :70 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,或者包含与 SEQ ID NO :70 所示碱基序列互补的碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与 SEQ ID NO :70 所示碱基序列杂交的碱基序列的变异体(探针 22),和

[0067] (23) 包含 SEQ ID NO :71 所示碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :71 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,或者包含与 SEQ ID NO :71 所示碱基序列互补的碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与 SEQ ID NO :71 所示碱基序列杂交的碱基序列的变异体(探针 23)。

[0068] [3] 一种用于检测人乳头瘤病毒(HPV)的试剂盒,所述试剂盒包含:

[0069] (1) 引物组 1 和探针 1 的组合,(2) 引物组 2 和探针 2 的组合,(3) 引物组 3 和探针 3 的组合,(4) 引物组 4 和探针 4 的组合,(5) 引物组 5 和探针 5 的组合,(6) 引物组 6 和探针 6 的组合,(7) 引物组 7 和探针 7 的组合,(8) 引物组 8 和探针 8 的组合,(9) 引物组 9 和探针 9 的组合,(10) 引物组 10 和探针 10 的组合,(11) 引物组 11 和探针 11 的组合,(12) 引物组 12 和探针 12 的组合,(13) 引物组 13 和探针 13 的组合,(14) 引物组 14 和探针 14 的组合,(15) 引物组 15 和探针 15 的组合,(16) 引物组 16 和探针 16 的组合,(17) 引物组 17 和探针 17 的组合,(18) 引物组 18 和探针 18 的组合,(19) 引物组 19 和探针 19 的组合,(20) 引物组 20 和探针 20 的组合,(21) 引物组 21 和探针 21 的组合,(22) 引物组 22 和探针 22 的组合及(23) 引物组 23 和探针 23 的组合,以及任选(24) 引物组 24 和探针 24 的组

合。

[0070] [4] 上述 [3] 的试剂盒,所述试剂盒包含两种或更多种选自上述组合 (1) ~ (23) 的组合。

[0071] [5] 上述 [3] 或 [4] 的试剂盒,所述试剂盒包含引物组 3 和探针 3 的组合及引物组 4 和探针 4 的组合,以及任选引物组 24 和探针 24 的组合。

[0072] [6] 上述 [3] 或 [4] 的试剂盒,所述试剂盒包含引物组 3 和探针 3 的组合、引物组 4 和探针 4 的组合、引物组 5 和探针 5 的组合、引物组 6 和探针 6 的组合、引物组 7 和探针 7 的组合、引物组 9 和探针 9 的组合、引物组 10 和探针 10 的组合、引物组 13 和探针 13 的组合、引物组 14 和探针 14 的组合、引物组 15 和探针 15 的组合、引物组 18 和探针 18 的组合、引物组 19 和探针 19 的组合、引物组 20 和探针 20 的组合及引物组 23 和探针 23 的组合,以及任选引物组 24 和探针 24 的组合。

[0073] [7] 上述 [3] 或 [4] 的试剂盒,所述试剂盒包含引物组 1 和探针 1 的组合、引物组 2 和探针 2 的组合、引物组 3 和探针 3 的组合、引物组 4 和探针 4 的组合、引物组 5 和探针 5 的组合、引物组 6 和探针 6 的组合、引物组 7 和探针 7 的组合、引物组 8 和探针 8 的组合、引物组 9 和探针 9 的组合、引物组 10 和探针 10 的组合、引物组 11 和探针 11 的组合、引物组 12 和探针 12 的组合、引物组 13 和探针 13 的组合、引物组 14 和探针 14 的组合、引物组 15 和探针 15 的组合、引物组 16 和探针 16 的组合、引物组 17 和探针 17 的组合、引物组 18 和探针 18 的组合、引物组 19 和探针 19 的组合、引物组 20 和探针 20 的组合、引物组 21 和探针 21 的组合、引物组 22 和探针 22 的组合及引物组 23 和探针 23 的组合,以及任选引物组 24 和探针 24 的组合。

[0074] [8] 一种通过使用上述 [3] ~ [7] 中任一项的试剂盒以型特异性方式检测样品中 HPV 存在与否的方法,所述方法包括使用前述引物组和从样品中提取的 DNA 作为模板进行 PCR 的步骤,以及检测扩增 DNA 产物的步骤。

[0075] [9] 一种通过使用上述 [3] ~ [7] 中任一项的试剂盒以型特异性方式检测样品中 HPV 存在与否的方法,所述方法包括使用前述引物组和从样品中提取的 DNA 作为模板进行 PCR 的步骤,处理扩增 DNA 产物以具有单链的步骤,以及使单链 DNA 与前述探针杂交后进行检测的步骤。

[0076] [10] 一种用于检测 HPV 的 DNA 微阵列,其中将至少一种选自上述 [2] 中所述的探针 1 ~ 23 的探针固定化。

[0077] [11] 上述 [10] 的 DNA 微阵列,其中将两种或更多种选自上述 [2] 中所述的探针 1 ~ 23 的探针固定化。

[0078] [12] 上述 [10] 或 [11] 的 DNA 微阵列,其中将探针 24 固定化。

[0079] 发明的有益效果

[0080] 本发明提供能够方便快速地以高特异性和高灵敏度检测多种 HPV 类型的引物组和探针。本发明还提供通过使用前述引物组和探针能够方便快速地以高特异性和高灵敏度检测多种 HPV 类型的方法。

[0081] 附图简述

[0082] 图 1 表示使用磁珠分离单链 DNA 的步骤 (反义链 DNA 的分离) 的概念图。

[0083] 图 2 表示扩增 DNA 产物的琼脂糖凝胶电泳的结果。

[0084] 图 3 表示制备的 DNA 微阵列上的点配置。

[0085] 图 4 扫描影像表示检测经分离的标记单链 DNA 与 DNA 微阵列杂交的结果。

[0086] 图 5 表示使用磁珠进行与不进行单链 DNA 分离步骤之间 HPV 检测灵敏度的差异。

[0087] 实施发明的最佳方式

[0088] 本发明提供用于扩增 HPV 基因的 PCR 引物组,特别是型特异性引物组。引物组的实例包括下列 (1) ~ (23) 所示的引物组。

[0089] (1) 引物组 1,由包含 SEQ ID NO :1 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :1 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,以及包含 SEQ ID NO :2 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :2 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体组成,

[0090] (2) 引物组 2,由包含 SEQ ID NO :3 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :3 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,以及包含 SEQ ID NO :4 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :4 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体组成,

[0091] (3) 引物组 3,由包含 SEQ ID NO :5 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :5 所示 碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,以及包含 SEQ ID NO :6 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :6 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体组成,

[0092] (4) 引物组 4,由包含 SEQ ID NO :7 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :7 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,以及包含 SEQ ID NO :8 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :8 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体组成,

[0093] (5) 引物组 5,由包含 SEQ ID NO :9 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :9 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,以及包含 SEQ ID NO :10 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :10 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体组成,

[0094] (6) 引物组 6,由包含 SEQ ID NO :11 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :11 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,以及包含 SEQ ID NO :12 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :12 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体组成,

[0095] (7) 引物组 7,由包含 SEQ ID NO :13 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :13 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,以及包含 SEQ ID NO :14 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能

且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :14 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体组成,

[0096] (8) 引物组 8,由包含 SEQ ID NO :15 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :15 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,以及包含 SEQ ID NO :16 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :16 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体组成,

[0097] (9) 引物组 9,由包含 SEQ ID NO :17 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :17 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,以及包含 SEQ ID NO :18 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :18 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体组成,

[0098] (10) 引物组 10,由包含 SEQ ID NO :19 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :19 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,以及包含 SEQ ID NO :20 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :20 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体组成,

[0099] (11) 引物组 11,由包含 SEQ ID NO :21 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :21 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,以及包含 SEQ ID NO :22 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :22 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体组成,

[0100] (12) 引物组 12,由包含 SEQ ID NO :23 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :23 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,以及包含 SEQ ID NO :24 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :24 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体组成,

[0101] (13) 引物组 13,由包含 SEQ ID NO :25 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :25 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,以及包含 SEQ ID NO :26 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :26 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体组成,

[0102] (14) 引物组 14,由包含 SEQ ID NO :27 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :27 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,以及包含 SEQ ID NO :28 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :28 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体组成,

[0103] (15) 引物组 15,由包含 SEQ ID NO :29 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :29 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱

基序列的变异体,以及包含 SEQ ID NO :30 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :30 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体组成,

[0104] (16) 引物组 16,由包含 SEQ ID NO :31 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :31 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,以及包含 SEQ ID NO :32 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :32 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体组成,

[0105] (17) 引物组 17,由包含 SEQ ID NO :33 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :33 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,以及包含 SEQ ID NO :34 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :34 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体组成,

[0106] (18) 引物组 18,由包含 SEQ ID NO :35 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :35 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,以及包含 SEQ ID NO :36 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :36 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体组成,

[0107] (19) 引物组 19,由包含 SEQ ID NO :37 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :37 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,以及包含 SEQ ID NO :38 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :38 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体组成,

[0108] (20) 引物组 20,由包含 SEQ ID NO :39 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :39 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,以及包含 SEQ ID NO :40 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :40 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体组成,

[0109] (21) 引物组 21,由包含 SEQ ID NO :41 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :41 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,以及包含 SEQ ID NO :42 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :42 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体组成,

[0110] (22) 引物组 22,由包含 SEQ ID NO :43 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :43 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,以及包含 SEQ ID NO :44 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :44 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体组成,和

[0111] (23) 引物组 23,由包含 SEQ ID NO :45 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引

物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :45 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,以及包含 SEQ ID NO :46 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :46 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体组成。

[0112] 引物组 1 中的“包含 SEQ ID NO :1 所示碱基序列的引物”和“包含 SEQ ID NO :2 所示碱基序列的引物”表示的含义分别与“包含 SEQ ID NO :1 所示碱基序列的寡核苷酸”和“包含 SEQ ID NO :2 所示碱基序列的寡核苷酸”相同,下文亦分别简称为“SEQ ID NO :1 的引物”和“SEQ ID NO :2 的引物”。

[0113] “其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :1 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体”是在严格条件下与包含同 SEQ ID NO :1 所示碱基序列互补的碱基序列的上述寡核苷酸杂交、且具有作为类似于包含 SEQ ID NO :1 所示碱基序列的寡核苷酸的引物的功能的寡核苷酸,所述功能即能够通过与包含 SEQ ID NO :2 所示碱基序列的引物混合,使 HPV6 基因的特定区域进行 PCR 扩增的功能。在下文中,该变异体亦简称为“SEQ ID NO :1 的引物变异体”。同样,“其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :2 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体”是在严格条件下与包含同 SEQ ID NO :2 所示碱基序列互补的碱基序列的上述寡核苷酸杂交、且具有作为类似于包含 SEQ ID NO :2 所示碱基序列的寡核苷酸的引物的功能的寡核苷酸,所述功能即能够通过与包含 SEQ ID NO :1 所示碱基序列的引物混合,使 HPV6 基因的特定区域进行 PCR 扩增的功能。在下文中,亦简称为“SEQ ID NO :2 的引物变异体”。“变异体”是在保持其作为引物的功能不变的范围内,原寡核苷酸中取代、缺失、插入或添加一个或多个核苷酸。

[0114] 已知杂交中的严格性是温度、盐浓度、引物链长、引物核苷酸序列的 GC 含量和杂交缓冲液中离液剂浓度的函数。至于严格条件,可采用例如以下文献描述的条件: Sambrook, J. 等 (1998) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (第二版), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 等。严格温度条件约为 30℃ 以上,更优选约 37℃ 以上,最优选约 42℃ 以上。其它条件为杂交时间、去污剂(例如 SDS)浓度、载体 DNA 存在与否等,通过综合这些条件可设置各种严格性。本领域普通技术人员可适当地确定各条件以获得具有作为 PCR 引物的功能以扩增所需 HPV 基因的变异体。

[0115] 引物组 1 由“SEQ ID NO :1 的引物”或“SEQ ID NO :1 的引物变异体”和“SEQ ID NO :2 的引物”或“SEQ ID NO :2 的引物变异体”组成,优选由“SEQ ID NO :1 的引物”和“SEQ ID NO :2 的引物”组成。

[0116] 可按照与引物组 1 相同的方式定义引物组 2~引物组 23 的每个引物。具体来讲,引物组 2 由“SEQ ID NO :3 的引物”或“SEQ ID NO :3 的引物变异体”和“SEQ ID NO :4 的引物”或“SEQ ID NO :4 的引物变异体”组成,优选由“SEQ ID NO :3 的引物”和“SEQ ID NO :4 的引物”组成,并且可以扩增 HPV11 基因的特定区域,

[0117] 引物组 3 由“SEQ ID NO :5 的引物”或“SEQ ID NO :5 的引物变异体”和“SEQ ID NO :6 的引物”或“SEQ ID NO :6 的引物变异体”组成,优选由“SEQ ID NO :5 的引物”和“SEQ ID NO :6 的引物”组成,并且可以扩增 HPV16 基因的特定区域,

[0118] 引物组 4 由“SEQ ID NO :7 的引物”或“SEQ ID NO :7 的引物变异体”和“SEQ ID

NO:8 的引物”或“SEQ ID NO:8 的引物变异体”组成,优选由“SEQ ID NO:7 的引物”和“SEQ ID NO:8 的引物”组成,并且可以扩增 HPV18 基因的特定区域,

[0119] 引物组 5 由“SEQ ID NO:9 的引物”或“SEQ ID NO:9 的引物变异体”和“SEQ ID NO:10 的引物”或“SEQ ID NO:10 的引物变异体”组成,优选由“SEQ ID NO:9 的引物”和“SEQ ID NO:10 的引物”组成,并且可以扩增 HPV30 基因的特定区域,

[0120] 引物组 6 由“SEQ ID NO:11 的引物”或“SEQ ID NO:11 的引物变异体”和“SEQ ID NO:12 的引物”或“SEQ ID NO:12 的引物变异体”组成,优选由“SEQ ID NO:11 的引物”和“SEQ ID NO:12 的引物”组成,并且可以扩增 HPV31 基因的特定区域,

[0121] 引物组 7 由“SEQ ID NO:13 的引物”或“SEQ ID NO:13 的引物变异体”和“SEQ ID NO:14 的引物”或“SEQ ID NO:14 的引物变异体”组成,优选由“SEQ ID NO:13 的引物”和“SEQ ID NO:14 的引物”组成,并且可以扩增 HPV33 基因的特定区域,

[0122] 引物组 8 由“SEQ ID NO:15 的引物”或“SEQ ID NO:15 的引物变异体”和“SEQ ID NO:16 的引物”或“SEQ ID NO:16 的引物变异体”组成,优选由“SEQ ID NO:15 的引物”和“SEQ ID NO:16 的引物”组成,并且可以扩增 HPV34 基因的特定区域,

[0123] 引物组 9 由“SEQ ID NO:17 的引物”或“SEQ ID NO:17 的引物变异体”和“SEQ ID NO:18 的引物”或“SEQ ID NO:18 的引物变异体”组成,优选由“SEQ ID NO:17 的引物”和“SEQ ID NO:18 的引物”组成,并且可以扩增 HPV35 基因的特定区域,

[0124] 引物组 10 由“SEQ ID NO:19 的引物”或“SEQ ID NO:19 的引物变异体”和“SEQ ID NO:20 的引物”或“SEQ ID NO:20 的引物变异体”组成,优选由“SEQ ID NO:19 的引物”和“SEQ ID NO:20 的引物”组成,并且可以扩增 HPV39 基因的特定区域,

[0125] 引物组 11 由“SEQ ID NO:21 的引物”或“SEQ ID NO:21 的引物变异体”和“SEQ ID NO:22 的引物”或“SEQ ID NO:22 的引物变异体”组成,优选由“SEQ ID NO:21 的引物”和“SEQ ID NO:22 的引物”组成,并且可以扩增 HPV40 基因的特定区域,

[0126] 引物组 12 由“SEQ ID NO:23 的引物”或“SEQ ID NO:23 的引物变异体”和“SEQ ID NO:24 的引物”或“SEQ ID NO:24 的引物变异体”组成,优选由“SEQ ID NO:23 的引物”和“SEQ ID NO:24 的引物”组成,并且可以扩增 HPV42 基因的特定区域,

[0127] 引物组 13 由“SEQ ID NO:25 的引物”或“SEQ ID NO:25 的引物变异体”和“SEQ ID NO:26 的引物”或“SEQ ID NO:26 的引物变异体”组成,优选由“SEQ ID NO:25 的引物”和“SEQ ID NO:26 的引物”组成,并且可以扩增 HPV45 基因的特定区域,

[0128] 引物组 14 由“SEQ ID NO:27 的引物”或“SEQ ID NO:27 的引物变异体”和“SEQ ID NO:28 的引物”或“SEQ ID NO:28 的引物变异体”组成,优选由“SEQ ID NO:27 的引物”和“SEQ ID NO:28 的引物”组成,并且可以扩增 HPV51 基因的特定区域,

[0129] 引物组 15 由“SEQ ID NO:29 的引物”或“SEQ ID NO:29 的引物变异体”和“SEQ ID NO:30 的引物”或“SEQ ID NO:30 的引物变异体”组成,优选由“SEQ ID NO:29 的引物”和“SEQ ID NO:30 的引物”组成,并且可以扩增 HPV52 基因的特定区域,

[0130] 引物组 16 由“SEQ ID NO:31 的引物”或“SEQ ID NO:31 的引物变异体”和“SEQ ID NO:32 的引物”或“SEQ ID NO:32 的引物变异体”组成,优选由“SEQ ID NO:31 的引物”和“SEQ ID NO:32 的引物”组成,并且可以扩增 HPV53 基因的特定区域,

[0131] 引物组 17 由“SEQ ID NO:33 的引物”或“SEQ ID NO:33 的引物变异体”和“SEQ

ID NO:34 的引物”或“SEQ ID NO:34 的引物变异体”组成,优选由“SEQ ID NO:33 的引物”和“SEQ ID NO:34 的引物”组成,并且可以扩增 HPV54 基因的特定区域,

[0132] 引物组 18 由“SEQ ID NO:35 的引物”或“SEQ ID NO:35 的引物变异体”和“SEQ ID NO:36 的引物”或“SEQ ID NO:36 的引物变异体”组成,优选由“SEQ ID NO:35 的引物”和“SEQ ID NO:36 的引物”组成,并且可以扩增 HPV56 基因的特定区域,

[0133] 引物组 19 由“SEQ ID NO:37 的引物”或“SEQ ID NO:37 的引物变异体”和“SEQ ID NO:38 的引物”或“SEQ ID NO:38 的引物变异体”组成,优选由“SEQ ID NO:37 的引物”和“SEQ ID NO:38 的引物”组成,并且可以扩增 HPV58 基因的特定区域,

[0134] 引物组 20 由“SEQ ID NO:39 的引物”或“SEQ ID NO:39 的引物变异体”和“SEQ ID NO:40 的引物”或“SEQ ID NO:40 的引物变异体”组成,优选由“SEQ ID NO:39 的引物”和“SEQ ID NO:40 的引物”组成,并且可以扩增 HPV59 基因的特定区域,

[0135] 引物组 21 由“SEQ ID NO:41 的引物”或“SEQ ID NO:41 的引物变异体”和“SEQ ID NO:42 的引物”或“SEQ ID NO:42 的引物变异体”组成,优选由“SEQ ID NO:41 的引物”和“SEQ ID NO:42 的引物”组成,并且可以扩增 HPV61 基因的特定区域,

[0136] 引物组 22 由“SEQ ID NO:43 的引物”或“SEQ ID NO:43 的引物变异体”和“SEQ ID NO:44 的引物”或“SEQ ID NO:44 的引物变异体”组成,优选由“SEQ ID NO:43 的引物”和“SEQ ID NO:44 的引物”组成,并且可以扩增 HPV66 基因的特定区域,

[0137] 引物组 23 由“SEQ ID NO:45 的引物”或“SEQ ID NO:45 的引物变异体”和“SEQ ID NO:46 的引物”或“SEQ ID NO:46 的引物变异体”组成,优选由“SEQ ID NO:45 的引物”和“SEQ ID NO:46 的引物”组成,并且可以扩增 HPV68 基因的特定区域。

[0138] 各引物组的一个实例见表 1。如稍后所述,在本发明中,可以任选使用用作内标以扩增 G3PDH(甘油醛三磷酸脱氢酶)基因的引物组。用于扩增 G3PDH 基因的引物组(引物组 24)由包含 SEQ ID NO:47 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO:47 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,以及包含 SEQ ID NO:48 所示碱基序列的引物或其同样具有作为引物的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO:48 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体组成。

[0139] [表 1-1]

[0140]

引物组	病毒类型	*	引物序列 (5' → 3')	SEQ ID NO:	位置** (nt)	Tm (°C)	PCR 产物 的大小 (bp)
1	HPV6	F	TCTGCTGCCCTAAACGTAAG	1	7251	65	423
		R	GGTGGAAAGTGATGCCAAGG	2	7673	65	
2	HPV11	F	CGTTTTCGGTTGCCCTTAC	3	7594	64	200
		R	ACCTTTGGCTGCAATCCAC	4	7793	65	
3	HPV16	F	CGGTTGCATGCTTTTTGG	5	7458	65	238
		R	CAGCGGTATGTAAGGCGTTG	6	7695	65	
4	HPV18	F	CTGCACCGGCTGAAAATAAG	7	6910	64	467
		R	ATAGCCCAACAAGCAACACC	8	7376	64	
5	HPV30	F	ACTAAGGTGCGGTTGTGTCC	9	7324	64	314
		R	ATAAGGCGAGGCGTCTTACG	10	7637	65	
6	HPV31	F	GGGCGTCTGCAACTACTACTTC	11	5186	64	276
		R	ACACTTGTGGCGTTGTAGGG	12	5461	65	
7	HPV33	F	GTATTGGCACAGGCTCTGGT	13	4382	64	476
		R	AATGGGCGTGCTTGATGT	14	4857	64	
8	HPV34	F	CAAGCTGAGCAAGCCTGGA	15	683	65	159
		R	TAGGCGTCTGGAACAGTTGG	16	841	65	
9	HPV35	F	CCACTTAGCAGCGTGAGCTT	17	1144	64	258
		R	GTCTCGCGTTGGAGTCTCAT	18	1401	64	
10	HPV39	F	TAGTTCACGCTGAGCCCTCT	19	5259	64	432
		R	AGGTGGAGGCAATACACCA	20	5690	64	
11	HPV40	F	TGCAGTTTGAGCAGCCATC	21	5179	65	417
		R	CCGTGGCAAGAGGTATGGAT	22	5595	66	
12	HPV42	F	GCCCCTTTGTCCACTACATC	23	5581	64	228
		R	GCGCCTACGCCAAAATAAC	24	5808	65	
13	HPV45	F	TAAGCCCCATTGCTGCTACA	25	5203	65	177
		R	CAGCAGTAGAAGGCATGGTCA	26	5379	65	
14	HPV51	F	GCCATAGTCAGGCAACGAG	27	1196	65	381
		R	CTGCTACCATTGGGGAACG	28	1576	66	

[0141] [表 1-2]

[0142] (续)

[0143]

引物组	病毒类型	★	引物序列 (5' → 3')	SEQ ID NO:	位置** (nt)	T _m (°C)	PCR 产物 的大小 (bp)
15	HPV52	F	ATAGCACTGCGACGGACCTT	29	767	66	492
		R	CCGCTGTCTTCTACGTGACAT	30	1258	64	
16	HPV53	F	TACGGTTTTGCAGCAACAGG	31	7820	66	229
		R	GCAGCTCCAGCAATGGTTTA	32	192	65	
17	HPV54	F	ACCAGCCAATACTGCTGCTA	33	3824	62	349
		R	AGCAGGTTACACAGGGCATC	34	4172	64	
18	HPV56	F	CCGGGAAGGAGTAAACGG	35	1205	65	236
		R	CCTGCAATTGTTGTGTTGGC	36	1440	66	
19	HPV58	F	CATTGGTACAGGGTCGGGTA	37	4417	64	130
		R	ATCCAAAGGCCCCACAGTA	38	4546	64	
20	HPV59	F	GTTTTGCAAAGGGGAAGTGC	39	153	66	364
		R	CGCTTGTCGTGCTGTCTTA	40	516	64	
21	HPV61	F	CCGTCCTCGTCCCTAGTATAA	41	5412	65	185
		R	GATGTCACAGCGTATCAAGC	42	5596	65	
22	HPV66	F	ATAGGCTGGATGACACTGAGGT	43	6014	64	233
		R	CACCATGTCACCGTCCTCTATC	44	6246	66	
23	HPV68	F	TGCTACATTTACCTCCCGTTCC	45	1333	66	383
		R	AATGCCAGTGCCTGTTACG	46	1715	65	
24	内部标准 G3PDH	F	CAGCCTCAAGATCATCAGCA	47	164	64	460
		R	AAAGGTGGAGGAGTGGGTGT	48	907	65	

[0144] *F 表示正向引物, R 表示反向引物。

[0145] ** 位置 (nt) 表示基因组上引物 5' 端与之结合的位置。

[0146] 在上述表 1 中, 各个病毒类型基因组和 G3PDH 上各引物与之结合的位置 (nt), 是表 2 所示的各基因在 GenBank (美国国立生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI)) 登录号下的基因序列上的位置。

[0147] [表 2]

[0148]

基因名称	GenBank 登录号
HPV6	AF092932
HPV11	M14119
HPV16	NC_001526
HPV18	X05015
HPV30	X74474
HPV31	J04353
HPV33	M12732
HPV34	X74476
HPV35	M74117
HPV39	M62849
HPV40	X74478
HPV42	M73236

HPV45	X74479
HPV51	M62877
HPV52	X74481
HPV53	X74482
HPV54	U37488
HPV56	X74483
HPV58	D90400
HPV59	X77858
HPV61	U31793
HPV66	U31794
HPV68	M73258
G3PDH	DQ894744

[0149] 本发明的引物被设计成提高对各个 HPV 基因的特异性(100%互补性)且与其它 HPV 类型不具有高度同源性的序列,并且引物组之间的 T_m 值较接近。因此,当在一个试管中进行这些引物的混合物的多重 PCR 时,可以特异性地扩增存在于样品中 HPV 基因的特定类型。

[0150] 可以根据表 1 所述的每个引物的信息来设计每个引物的变异体序列。准确地讲,设计 SEQ ID NO:1 的引物变异体以提供使其和 SEQ ID NO:2 的引物(或 SEQ ID NO:2 的引物变异体)进行 PCR 反应得到的 PCR 产物、与 SEQ ID NO:1 的引物和 SEQ ID NO:2 的引物进行 PCR 反应得到的 PCR 产物具有相同或较高的同源性。同源性水平至少为 80%,优选至少 90%,特别优选至少 95%。SEQ ID NO:1 引物的 5' 端与 HPV6 (GenBank 登录号:AF092932) 基因组上的第 7251 位结合。与 ±50 位、优选 ±20 位、特别优选 ±10 位结合的引物,也属于本发明 SEQ ID NO:1 的引物变异体的范围。

[0151] 作为初始设置,可应用常规用于本领域的同源性检索程序(例如 BLAST、FASTA 等)来确定同源性(%)。另一方面,可运用本领域已知的任何算法确定同源性(%),例如 Needleman 等(1970)(J. Mol. Biol. 48:444-453)、Myers 和 Miller(CABIOS, 1988, 4:11-17)的算法等。Needleman 等人的算法已被合编到 GCG 软件包的 GAP 程序(可获自 www.gcg.com)中,可应用例如 BLOSUM 62 矩阵或 PAM250 矩阵;空位权重(gap weight):16、14、12、10、8、6 或 4;以及长度权重:1、2、3、4、5 或 6 中的任一个,来确定同源性(%). 另外,Myers 和 Miller 的算法被合编到 GCG 序列比对软件包的组成部分 ALIGN 程序中。例如,当运用 ALIGN 程序比较氨基酸序列时,可以使用 PAM120 权重残基表(weight residue table)、空位长度罚分(gap length penalty)12、和空位罚分 4。

[0152] 可以使用例如通用 DNA 合成仪(例如由 Applied Biosystems 制造的 394 型),经化学方法合成本发明引物组中的各个核苷酸。还可采用本领域众所周知的任何其它方法来合成寡核苷酸。

[0153] 本发明还提供与前述 PCR 扩增产物特异性杂交的探针。该探针是每个 PCR 扩增产物的碱基序列中包含的单链 DNA,可以是有义链 DNA 或反义链 DNA。其具体实例包括下列探针(1)~(23)。

[0154] (1) 包含 SEQ ID NO:49 所示碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO:49 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,或者包含与 SEQ ID NO:49 所示碱基序列互补的碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与 SEQ ID NO:49 所示碱基序列杂交的碱基序列的变异体(探

针 1),

[0155] (2) 包含 SEQ ID NO :50 所示碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :50 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,或者包含与 SEQ ID NO :50 所示碱基序列互补的碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与 SEQ ID NO :50 所示碱基序列杂交的碱基序列的变异体(探针 2),

[0156] (3) 包含 SEQ ID NO :51 所示碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :51 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,或者包含与 SEQ ID NO :51 所示碱基序列互补的碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与 SEQ ID NO :51 所示碱基序列杂交的碱基序列的变异体(探针 3),

[0157] (4) 包含 SEQ ID NO :52 所示碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :52 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,或者包含与 SEQ ID NO :52 所示碱基序列互补的碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与 SEQ ID NO :52 所示碱基序列杂交的碱基序列的变异体(探针 4),

[0158] (5) 包含 SEQ ID NO :53 所示碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :53 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,或者包含与 SEQ ID NO :53 所示碱基序列互补的碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与 SEQ ID NO :53 所示碱基序列杂交的碱基序列的变异体(探针 5),

[0159] (6) 包含 SEQ ID NO :54 所示碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :54 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,或者包含与 SEQ ID NO :54 所示碱基序列互补的碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与 SEQ ID NO :54 所示碱基序列杂交的碱基序列的变异体(探针 6),

[0160] (7) 包含 SEQ ID NO :55 所示碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :55 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,或者包含与 SEQ ID NO :55 所示碱基序列互补的碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与 SEQ ID NO :55 所示碱基序列杂交的碱基序列的变异体(探针 7),

[0161] (8) 包含 SEQ ID NO :56 所示碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :56 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,或者包含与 SEQ ID NO :56 所示碱基序列互补的碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与 SEQ ID NO :56 所示碱基序列杂交的碱基序列的变异体(探针 8),

[0162] (9) 包含 SEQ ID NO :57 所示碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :57 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,或者包含与 SEQ ID NO :57 所示碱基序列互补的碱基序列的探针或其同样具有作为探针

的功能且包含在严格条件下与 SEQ ID NO :57 所示碱基序列杂交的碱基序列的变异体 (探针 9),

[0163] (10) 包含 SEQ ID NO :58 所示碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :58 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,或者包含与 SEQ ID NO :58 所示碱基序列互补的碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与 SEQ ID NO :58 所示碱基序列杂交的碱基序列的变异体 (探针 10),

[0164] (11) 包含 SEQ ID NO :59 所示碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :59 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,或者包含与 SEQ ID NO :59 所示碱基序列互补的碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与 SEQ ID NO :59 所示碱基序列杂交的碱基序列的变异体 (探针 11),

[0165] (12) 包含 SEQ ID NO :60 所示碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :60 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,或者包含与 SEQ ID NO :60 所示碱基序列互补的碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与 SEQ ID NO :60 所示碱基序列杂交的碱基序列的变异体 (探针 12),

[0166] (13) 包含 SEQ ID NO :61 所示碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :61 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,或者包含与 SEQ ID NO :61 所示碱基序列互补的碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与 SEQ ID NO :61 所示碱基序列杂交的碱基序列的变异体 (探针 13),

[0167] (14) 包含 SEQ ID NO :62 所示碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :62 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,或者包含与 SEQ ID NO :62 所示碱基序列互补的碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与 SEQ ID NO :62 所示碱基序列杂交的碱基序列的变异体 (探针 14),

[0168] (15) 包含 SEQ ID NO :63 所示碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :63 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,或者包含与 SEQ ID NO :63 所示碱基序列互补的碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与 SEQ ID NO :63 所示碱基序列杂交的碱基序列的变异体 (探针 15),

[0169] (16) 包含 SEQ ID NO :64 所示碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :64 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,或者包含与 SEQ ID NO :64 所示碱基序列互补的碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与 SEQ ID NO :64 所示碱基序列杂交的碱基序列的变异体 (探针 16),

[0170] (17) 包含 SEQ ID NO :65 所示碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :65 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异

体,或者包含与 SEQ ID NO :65 所示碱基序列互补的碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与 SEQ ID NO :65 所示碱基序列杂交的碱基序列的变异体(探针 17),

[0171] (18) 包含 SEQ ID NO :66 所示碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :66 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,或者包含与 SEQ ID NO :66 所示碱基序列互补的碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与 SEQ ID NO :66 所示碱基序列杂交的碱基序列的变异体(探针 18),

[0172] (19) 包含 SEQ ID NO :67 所示碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :67 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,或者包含与 SEQ ID NO :67 所示碱基序列互补的碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与 SEQ ID NO :67 所示碱基序列杂交的碱基序列的变异体(探针 19),

[0173] (20) 包含 SEQ ID NO :68 所示碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :68 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,或者包含与 SEQ ID NO :68 所示碱基序列互补的碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与 SEQ ID NO :68 所示碱基序列杂交的碱基序列的变异体(探针 20),

[0174] (21) 包含 SEQ ID NO :69 所示碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :69 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,或者包含与 SEQ ID NO :69 所示碱基序列互补的碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与 SEQ ID NO :69 所示碱基序列杂交的碱基序列的变异体(探针 21),

[0175] (22) 包含 SEQ ID NO :70 所示碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :70 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,或者包含与 SEQ ID NO :70 所示碱基序列互补的碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与 SEQ ID NO :70 所示碱基序列杂交的碱基序列的变异体(探针 22),和

[0176] (23) 包含 SEQ ID NO :71 所示碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :71 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体,或者包含与 SEQ ID NO :71 所示碱基序列互补的碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与 SEQ ID NO :71 所示碱基序列杂交的碱基序列的变异体(探针 23)。

[0177] 在探针 1 中的“包含 SEQ ID NO :49 所示碱基序列的探针”表示的含义与“包含 SEQ ID NO :49 所示碱基序列的寡核苷酸”相同,下文亦简称为“SEQ ID NO :49 的探针”。

[0178] “其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO :49 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体”是在严格条件下与包含同 SEQ ID NO :49 所示碱基序列互补的碱基序列的上述寡核苷酸杂交、且具有作为类似于包含 SEQ ID NO :49 所示碱基序列的寡核苷酸的探针的功能的寡核苷酸,所述功能即能够检测 HPV6 基因的特定

区域。在下文中,该变异体亦简称为“SEQ ID NO:49 的探针变异体”。“变异体”是在保持其作为探针的功能的范围内,原寡核苷酸中取代、缺失、插入或添加一个或多个核苷酸。

[0179] “包含与 SEQ ID NO:49 所示碱基序列互补的碱基序列的探针”表示的含义与“包含与 SEQ ID NO:49 所示碱基序列互补的碱基序列的寡核苷酸”相同,下文亦简称为“与 SEQ ID NO:49 互补的探针”。

[0180] “其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与 SEQ ID NO:49 所示碱基序列杂交的碱基序列的变异体”是在严格条件下与包含 SEQ ID NO:49 所示碱基序列的上述寡核苷酸杂交、且具有作为类似于包含与 SEQ ID NO:49 所示碱基序列互补的碱基序列的寡核苷酸的探针的功能的寡核苷酸,所述功能即能够检测 HPV6 基因的特定区域。在下文中,该变异体亦简称为“与 SEQ ID NO:49 互补的探针变异体”。“变异体”是在保持其作为探针的功能的范围内,原寡核苷酸中取代、缺失、插入或添加一个或多个核苷酸。

[0181] 已知杂交中的严格性是温度、盐浓度、探针链长、探针核苷酸序列的 GC 含量和杂交缓冲液中离液剂浓度的函数。至于严格条件,可采用例如下列文献所描述的条件: Sambrook, J. 等 (1998) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第二版), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 等。严格温度条件约为 30℃ 以上,更优选约 37℃ 以上,最优选约 42℃ 以上。其它条件为杂交时间、去污剂(例如 SDS)浓度、载体 DNA 存在与否等,综合这些条件可设置各种严格性。本领域普通技术人员可适当地确定各条件以获得具有作为探针的功能以检测所需 HPV 基因的变异体。

[0182] 探针 1 是“SEQ ID NO:49 的探针”、“SEQ ID NO:49 的探针变异体”、“与 SEQ ID NO:49 互补的探针”和“与 SEQ ID NO:49 互补的探针变异体”中的任一个,优选“SEQ ID NO:49 的探针”或“与 SEQ ID NO:49 互补的探针”。

[0183] 可按照与探针 1 相同的方式定义探针 2~探针 23。具体来讲,

[0184] 探针 2 是“SEQ ID NO:50 的探针”、“SEQ ID NO:50 的探针变异体”、“与 SEQ ID NO:50 互补的探针”和“与 SEQ ID NO:50 互补的探针变异体”中的任一个,优选“SEQ ID NO:50 的探针”或“与 SEQ ID NO:50 互补的探针”,并且可以检测 HPV11 基因的特定区域,

[0185] 探针 3 是“SEQ ID NO:51 的探针”、“SEQ ID NO:51 的探针变异体”、“与 SEQ ID NO:51 互补的探针”和“与 SEQ ID NO:51 互补的探针变异体”中的任一个,优选“SEQ ID NO:51 的探针”或“与 SEQ ID NO:51 互补的探针”,并且可以检测 HPV16 基因的特定区域,

[0186] 探针 4 是“SEQ ID NO:52 的探针”、“SEQ ID NO:52 的探针变异体”、“与 SEQ ID NO:52 互补的探针”和“与 SEQ ID NO:52 互补的探针变异体”中的任一个,优选“SEQ ID NO:52 的探针”或“与 SEQ ID NO:52 互补的探针”,并且可以检测 HPV18 基因的特定区域,

[0187] 探针 5 是“SEQ ID NO:53 的探针”、“SEQ ID NO:53 的探针变异体”、“与 SEQ ID NO:53 互补的探针”和“与 SEQ ID NO:53 互补的探针变异体”中的任一个,优选“SEQ ID NO:53 的探针”或“与 SEQ ID NO:53 互补的探针”,并且可以检测 HPV30 基因的特定区域,

[0188] 探针 6 是“SEQ ID NO:54 的探针”、“SEQ ID NO:54 的探针变异体”、“与 SEQ ID NO:54 互补的探针”和“与 SEQ ID NO:54 互补的探针变异体”中的任一个,优选“SEQ ID NO:54 的探针”或“与 SEQ ID NO:54 互补的探针”,并且可以检测 HPV31 基因的特定区域,

[0189] 探针 7 是“SEQ ID NO:55 的探针”、“SEQ ID NO:55 的探针变异体”、“与 SEQ ID NO:55 互补的探针”和“与 SEQ ID NO:55 互补的探针变异体”中的任一个,优选“SEQ ID

NO:55 的探针”或“与 SEQ ID NO:55 互补的探针”，并且可以检测 HPV33 基因的特定区域，

[0190] 探针 8 是“SEQ ID NO:56 的探针”、“SEQ ID NO:56 的探针变异体”、“与 SEQ ID NO:56 互补的探针”和“与 SEQ ID NO:56 互补的探针变异体”中的任一个，优选“SEQ ID NO:56 的探针”或“与 SEQ ID NO:56 互补的探针”，并且可以检测 HPV34 基因的特定区域，

[0191] 探针 9 是“SEQ ID NO:57 的探针”、“SEQ ID NO:57 的探针变异体”、“与 SEQ ID NO:57 互补的探针”和“与 SEQ ID NO:57 互补的探针变异体”中的任一个，优选“SEQ ID NO:57 的探针”或“与 SEQ ID NO:57 互补的探针”，并且可以检测 HPV35 基因的特定区域，

[0192] 探针 10 是“SEQ ID NO:58 的探针”、“SEQ ID NO:58 的探针变异体”、“与 SEQ ID NO:58 互补的探针”和“与 SEQ ID NO:58 互补的探针变异体”中的任一个，优选“SEQ ID NO:58 的探针”或“与 SEQ ID NO:58 互补的探针”，并且可以检测 HPV39 基因的特定区域，

[0193] 探针 11 是“SEQ ID NO:59 的探针”、“SEQ ID NO:59 的探针变异体”、“与 SEQ ID NO:59 互补的探针”和“与 SEQ ID NO:59 互补的探针变异体”中的任一个，优选“SEQ ID NO:59 的探针”或“与 SEQ ID NO:59 互补的探针”，并且可以检测 HPV40 基因的特定区域，

[0194] 探针 12 是“SEQ ID NO:60 的探针”、“SEQ ID NO:60 的探针变异体”、“与 SEQ ID NO:60 互补的探针”和“与 SEQ ID NO:60 互补的探针变异体”中的任一个，优选“SEQ ID NO:60 的探针”或“与 SEQ ID NO:60 互补的探针”，并且可以检测 HPV42 基因的特定区域，

[0195] 探针 13 是“SEQ ID NO:61 的探针”、“SEQ ID NO:61 的探针变异体”、“与 SEQ ID NO:61 互补的探针”和“与 SEQ ID NO:61 互补的探针变异体”中的任一个，优选“SEQ ID NO:61 的探针”或“与 SEQ ID NO:61 互补的探针”，并且可以检测 HPV45 基因的特定区域，

[0196] 探针 14 是“SEQ ID NO:62 的探针”、“SEQ ID NO:62 的探针变异体”、“与 SEQ ID NO:62 互补的探针”和“与 SEQ ID NO:62 互补的探针变异体”中的任一个，优选“SEQ ID NO:62 的探针”或“与 SEQ ID NO:62 互补的探针”，并且可以检测 HPV51 基因的特定区域，

[0197] 探针 15 是“SEQ ID NO:63 的探针”、“SEQ ID NO:63 的探针变异体”、“与 SEQ ID NO:63 互补的探针”和“与 SEQ ID NO:63 互补的探针变异体”中的任一个，优选“SEQ ID NO:63 的探针”或“与 SEQ ID NO:63 互补的探针”，并且可以检测 HPV52 基因的特定区域，

[0198] 探针 16 是“SEQ ID NO:64 的探针”、“SEQ ID NO:64 的探针变异体”、“与 SEQ ID NO:64 互补的探针”和“与 SEQ ID NO:64 互补的探针变异体”中的任一个，优选“SEQ ID NO:64 的探针”或“与 SEQ ID NO:64 互补的探针”，并且可以检测 HPV53 基因的特定区域，

[0199] 探针 17 是“SEQ ID NO:65 的探针”、“SEQ ID NO:65 的探针变异体”、“与 SEQ ID NO:65 互补的探针”和“与 SEQ ID NO:65 互补的探针变异体”中的任一个，优选“SEQ ID NO:65 的探针”或“与 SEQ ID NO:65 互补的探针”，并且可以检测 HPV54 基因的特定区域，

[0200] 探针 18 是“SEQ ID NO:66 的探针”、“SEQ ID NO:66 的探针变异体”、“与 SEQ ID NO:66 互补的探针”和“与 SEQ ID NO:66 互补的探针变异体”中的任一个，优选“SEQ ID NO:66 的探针”或“与 SEQ ID NO:66 互补的探针”，并且可以检测 HPV56 基因的特定区域，

[0201] 探针 19 是“SEQ ID NO:67 的探针”、“SEQ ID NO:67 的探针变异体”、“与 SEQ ID NO:67 互补的探针”和“与 SEQ ID NO:67 互补的探针变异体”中的任一个，优选“SEQ ID NO:67 的探针”或“与 SEQ ID NO:67 互补的探针”，并且可以检测 HPV58 基因的特定区域，

[0202] 探针 20 是“SEQ ID NO:68 的探针”、“SEQ ID NO:68 的探针变异体”、“与 SEQ ID NO:68 互补的探针”和“与 SEQ ID NO:68 互补的探针变异体”中的任一个，优选“SEQ ID

NO:68 的探针”或“与 SEQ ID NO:68 互补的探针”，并且可以检测 HPV59 基因的特定区域，

[0203] 探针 21 是“SEQ ID NO:69 的探针”、“SEQ ID NO:69 的探针变异体”、“与 SEQ ID NO:69 互补的探针”和“与 SEQ ID NO:69 互补的探针变异体”中的任一个，优选“SEQ ID NO:69 的探针”或“与 SEQ ID NO:69 互补的探针”，并且可以检测 HPV61 基因的特定区域，

[0204] 探针 22 是“SEQ ID NO:70 的探针”、“SEQ ID NO:70 的探针变异体”、“与 SEQ ID NO:70 互补的探针”和“与 SEQ ID NO:70 互补的探针变异体”中的任一个，优选“SEQ ID NO:70 的探针”或“与 SEQ ID NO:70 互补的探针”，并且可以检测 HPV66 基因的特定区域，

[0205] 探针 23 是“SEQ ID NO:71 的探针”、“SEQ ID NO:71 的探针变异体”、“与 SEQ ID NO:71 互补的探针”和“与 SEQ ID NO:71 互补的探针变异体”中的任一个，优选“SEQ ID NO:71 的探针”或“与 SEQ ID NO:71 互补的探针”，并且可以检测 HPV68 基因的特定区域。

[0206] 各探针当为有义链 DNA 时的一个实例见表 3。如稍后所述，在本发明中，可以任选使用用作内标以检测 G3PDH 基因的探针。用于检测 G3PDH 基因的探针（探针 24）为包含 SEQ ID NO:72 所示碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能且包含在严格条件下与同 SEQ ID NO:72 所示碱基序列互补的碱基序列杂交的碱基序列的变异体，或者包含与 SEQ ID NO:72 所示碱基序列互补的碱基序列的探针或其同样具有作为探针的功能的变异体且包含在严格条件下与 SEQ ID NO:72 所示碱基序列杂交的碱基序列的变异体。

[0207] 各探针的碱基序列、T_m 值、大小和在基因组上位置见表 3。

[0208] [表 3-1]

[0209]

探针 编号	病毒 类型	序列	SEQ IDNO:	T _m (°C)	大小 (bp)	位置 (nt)	
1	HPV6	CACCCTGTGACTCAGTGGCTGTTGCACGCGTTTTGTTTG CACGCGCCTTACACACATAAGTAATATACA	49	75	70	7519	7588
2	HPV11	GCCCTGCCAAGTATCTTGCCAACAACACACCTGGCCAGGG CGCGGTATTGCATGACTAATGTACAATAAA	50	76	70	7684	7753
3	HPV16	CGTTTCCTGCTTGCCATGCGTGCCAAATCCCTGTTTTCT GACCTGCACCTGCTTGCCAACCATTCATTG	51	77	70	7532	7601
4	HPV18	ATTGCGTCGCAAGCGCACCATAGGCGCTCGCAAACGTTCT GCTCCATCTGCCACTACGCTCTTCTAAACCT	52	78	70	7034	7103
5	HPV30	GGCATTTAGGTAGCAATTTAGGTGGCGTCCCTATGTCCTC CAGCGTTTTTGTTGTTGCACACCACTGTG	53	76	70	7347	7416
6	HPV31	CACCTGCCACACATAATGTTTCCCTTCTACTGCTGTACA GTCCACATCTGCTGTGTCTGCTATGTACC	54	76	70	5264	5333
7	HPV33	ACCTATTGTTACTGACCCACCTACAGCTGCAATCCGCTTG CAGCCTATACGTCCTCCGTTACTGTAGAC	55	77	70	4425	4494
8	HPV34	GCAGCAGATGTCAGTCCACAGTGTGCTTACCATTGAGAG CAGACACGCTGACCTATTAGTGTAGAAGA	56	75	70	720	789
9	HPV35	CAGGTAGAGGGGCATGATACAGTTGAACAATGTAGTATGG GCAGTGGGGATAGTATAACCTCTAGTAGCG	57	75	70	1300	1369
10	HPV39	GGGATTCCGGCACTACATATAACACAGGCTCACTACCTTG TGTGGCTTCTTCAGCATCTACTAAATATGCC	58	74	71	5358	5428
11	HPV40	CGGCACCACATACACTGGAGACACCACATACACTAGAGAC ACCACTGGACACTACTGATGCCCTGTTTGA	59	76	70	5416	5485
12	HPV42	ACTGTGCATGTGGGCCCTGATTTATCTGTTGTGGACCACC CATGGGACAGTACCCCAACGTGTGTAATGC	60	77	70	5668	5737
13	HPV45	GTGCTACAAATGATAGTGACCTGTTGATGTATATGCAGA CTTCCCACCTCCTGCGTCCACTACACCTAG	61	75	70	5251	5320
14	HPV51	GATGGGCAACATGGCGTTACAGAACAGTGTGTGTAGTA GCGGGGGGGCAGTGTTATGGATGTGGA	62	78	70	1306	1375

[0210] [表 3-2]

[0211] (续表)

[0212]

探针 编号	病毒 类型	序列	SEQ IDNO:	T _m (°C)	大小 (bp)	位置 (nt)	
15	HPV52	CAAGCAGTCCGGAAAGTGCTGGGCAAGATGGTGTAGAAAA ACATGGTAGTCCGCGTGCAAAACACATTG	63	75	70	1132	1201
16	HPV53	CACCCAGGACATCCATGGATCGTCAGTTATTTGAAAATAC AGAAAGGCGACCACGTACATTGCACCAGC	64	75	69	88	156
17	HPV54	GTGTATATAGTGAGGTATGTATGGTGAGTATGGTAGTGAG TGCATGCAGGCTGCAGTGACTGAGGTGAG	65	75	70	3845	3914
18	HPV56	GAGGTACAGGGACGTGGGTGCGGGAATACACAAAATGGAG GGTCACAAAACAGTACCTATAGTAACAATA	66	74	70	1305	1374
19	HPV58	ATATGTGCCCCCTTGGTAGTACCCACCGTCTGAGGCTATA CCTTTACAGCCCATAGTCCCCAGTTACC	67	78	70	4453	4522
20	HPV59	GAGGCTGAAACCAAGACACCGTTACATGAGCTGCTGATAC GCTGTTATAGATGCCTAAACCTCTATGTCC	68	74	71	325	395
21	HPV61	TATGCTGACCGTGAGGTGTTGGATCTTCCTGCACACATA CACAAACCCACACTTACAGTACAGGGCCCTT	69	76	70	5445	5514
22	HPV66	GCACCAAGCATTAGGGGAACATTGGACTAAGGGCGCGGTGT GTAAATCTACACCAAGTAATACAGGGGATT	70	76	70	6127	6196
23	HPV68	TGTTGTGTTACCAAGCAAGTCTCCACAGTTGCCTTTAACA CCCTCTACACGAATTGATACAACCTATGCC	71	74	70	1459	1528
24	G3PDH	AAACCTGCCAAATATGATGACATCAAGAAAGGTGGTGAAGC AGGCGTCGGAGGGCCCTCAAGGGCATCC	72	78	70	773	842

[0213] 探针(有义链DNA)的位置(nt)用在各病毒类型基因组和G3PDH上的位置(5'→3')表示。位置对应于表2中所示各基因在GenBank登录号下基因序列中的位置。

[0214] 探针的长度相对较短,为69~71bp,且设计成与其它类型的HPV不具有高同源性的序列。因此,它与各PCR扩增产物杂交的特异性极高。例如,通过使PCR扩增产物与用于检测的DNA微阵列杂交,可以检测样品中各HPV的存在与否,其中将各HPV的特异性探针固定在支持体上。

[0215] 可根据表3中所示的各探针的信息,来设计各探针变异体的序列。具体来讲,将SEQ ID NO:49的探针变异体设计成具有高同源性的寡核苷酸,以允许在严格条件下与包含同HPV6基因组上7519位~7588位碱基序列互补的碱基序列的寡核苷酸杂交。同源性水平至少为80%,优选至少90%,特别优选至少95%。SEQ ID NO:49的探针对应于HPV6(GenBank登录号:AF092932)基因组上的7519位~7588位区域。只要可以特异性地检测HPV6基因,5'末端侧和3'末端侧则可变动±50位,优选±20位,特别优选±10位。

[0216] 当探针是反义链DNA时,可根据与表3所示各HPV基因特异性序列互补的序列,来设计所需要的HPV型特异性探针。

[0217] 作为初始设置,可应用常规用于本领域的同源性检索程序(例如BLAST、FASTA等)来确定同源性(%)。另一方面,可运用本领域已知的任何算法确定同源性(%),例如Needleman等(1970)(J. Mol. Biol. 48:444-453)、Myers和Miller(CABIOS, 1988, 4:11-17)的算法等。Needleman等人的算法已被合编到GCG软件包的GAP程序(可获自www.gcg.com)中,可应用例如BLOSUM 62矩阵或PAM250矩阵;空位权重:16、14、12、10、8、6或4;以及长度权重:1、2、3、4、5或6中的任一个,来确定同源性(%)。另外,Myers和Miller的算

法被合编到 GCG 序列比对软件包的组成部分 ALIGN 程序中。例如,当运用 ALIGN 程序比较氨基酸序列时,可以使用 PAM120 权重残基表、空位长度罚分 12 和空位罚分 4。

[0218] 可以使用例如通用 DNA 合成仪(例如由 Applied Biosystems 制造的 394 型),经化学方法合成探针的各个核苷酸。可采用本领域众所周知的任何其它方法合成寡核苷酸。

[0219] 在本发明的一个方面,提供用于 HPV 检测的试剂盒,其含有一种或多种、优选两种或更多种组合的 HPV 型特异性引物组和探针。使用试剂盒检测 HPV 包括使用型特异性引物组扩增相应型的 HPV 基因的 PCR,以及用与各扩增产物特异性杂交的探针检测 HPV 的存在。本发明的引物组被设计成具有近似的 T_m 值,因此,特别优选用于使用多个引物组混合物的多重 PCR 反应。

[0220] 由引物组 1 ~ 23 获得的 PCR 扩增产物各自用探针 1 ~ 23 进行型特异性检测。例如,当使用引物组 1 时,则使用探针 1 对其 PCR 扩增产物进行检测。

[0221] 对于使用本发明试剂盒检测 HPV,可提取样品中的 DNA,使用前述引物组对 DNA 进行 PCR。至于样品,可以使用获自疑似感染 HPV 的受试者的组织样品、活检样品、涂片等。此外,可将从通过密度梯度离心操作所采集的细胞中浓缩出普遍感染了 HPV 的宫颈鳞状细胞并使用。或者,可以使用培养的细胞,例如 HeLa 细胞等。对于根据本发明检出 HPV 基因的存在是有益的目标疾病包括疣、上皮内赘生物、皮肤癌、口腔/口咽癌、生殖器赘生物、宫颈癌、湿疣、乳头瘤等。

[0222] 从样品中提取 DNA 的方法是本领域众所周知的,可用例如苯酚和氯仿进行抽提,或者使用市售 DNA 提取试剂进行提取。或者,可使用柱试剂盒(column kit)(GENERATION(注册商标)Capture ColumnKit Gentra)进行抽提。

[0223] 使用如此从样品中提取的 DNA 作为模板,并使用前述引物组,通过 PCR 扩增各种类型的 HPV 基因。PCR 法本身是本领域众所周知的(Saiki 等,Science,239:487-491,1988),在这些引物、模板 DNA(即 HPV 基因)和耐热 DNA 聚合酶存在下,使用与有义链杂交的引物(反向引物)和与反义链杂交的引物(正向引物),通过使退火、延伸和变性步骤的循环重复大约 20 次~40 次来进行 RCR。在使用本发明试剂盒的 HPV 检测中,例如 FastStart Taq DNA 聚合酶(Roche)、Ex Taq(注册商标,Takara)、Z-Taq、AccuPrime Taq DNA 聚合酶、装于 M-PCR 试剂盒(QIAGEN)中的聚合酶等可用作如上所述的 DNA 聚合酶。基于引物 T_m 值选择合适 PCR 反应条件的方法是本领域众所周知的,本领域普通技术人员可以根据引物长度、GC 含量、目标特异性和灵敏度、所使用的聚合酶性质等,选出最佳条件。例如,下列实施例中,通过 95℃ 4 分钟,然后 95℃ 30 秒钟,60℃ 30 秒钟和 72℃ 1 分钟,循环 30 次,然后 72℃ 7 分钟,来进行 PCR。另外,可适当调整 PCR 溶液中所含引物的量,以达到所需检测灵敏度,并减少检测灵敏度依赖于病毒类型的变化。

[0224] 以相应的型特异性方式,使用能够检测 HPV 的本发明探针,使由 PCR 扩增的 DNA 产物进行杂交反应。通过例如使用标记探针和微阵列,可方便且高准确性地进行杂交。准确地讲,作为使用标记 DNA 探针的杂交方法,可采用例如等位基因特异性寡核苷酸探针法(Allele-specific Oligonucleotide Probe method)、寡核苷酸连接测定法(Oligonucleotide Ligation Assay method)、侵入物法(Invader method)等已知方法。另外,可通过微阵列进行诊断,例如如下文中所述。具体来讲,使用各种型特异性引物组,使从受试者的生物样品(例如血等)分离的 DNA 通过 PCR 扩增(DNA 扩增产物)。在此情况下,

掺入标记的 dNTP, 得到标记的 DNA。使标记 DNA 与微阵列接触, 检测与预先固定在微阵列上的探针杂交的 DNA。可将标记 DNA 的水溶液分配到 0.2ml 或 1.5ml 塑料管中, 将该溶液点滴到微阵列上, 来进行杂交。点滴量可大致为 5-100 μ l。杂交优选在室温~70℃的温度范围内进行 0.5-20 小时。杂交完成后, 通过用表面活性剂和缓冲液的混合溶液洗涤, 除去未反应的标记 DNA。优选使用十二烷基硫酸钠 (SDS) 或聚乙烯 (20) 失水山梨醇醚单月桂酸酯 (吐温 20) 作为表面活性剂。可以使用柠檬酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液、三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 缓冲液、Good 缓冲液等作为缓冲液, 优选柠檬酸盐缓冲液。

[0225] 可以使用例如 JP-B-3860174 中披露的方法, 作为使多种 DNA 扩增产物与探针生物聚合物同时杂交的方法。

[0226] 本发明提供一种用于检测 HPV 的 DNA 微阵列, 其中使至少一种、优选两种或更多种选自探针 1~23 的探针固定化。DNA 微阵列可含有作为内标固定化的探针 24。

[0227] 至于微阵列的制备方法, 包括在支持体表面上直接合成寡核苷酸的方法 (单芯片法 (on-chip method)) 以及包括将预先制备的寡核苷酸固定在支持体表面的方法是已知的。虽然本发明的微阵列可按照这些方法中的任一种制备, 但方便的方法是后者。至于单芯片方法, 可进行以下方法, 即包括结合使用可通过光照射选择性脱去的保护基与用于半导体制造的光刻技术及固相合成技术, 在小矩阵的指定区域上选择性地合成 (掩蔽技术 (masking technique): 例如 Fodor, S. P. A. Science 251:767, 1991) 等。另一方面, 当预先制备的寡核苷酸被固定在固相载体表面时, 将寡核苷酸点滴到表面经处理的离子键结合或共价键结合的支持体表面上 (例如 Lamture, J. B. 等, Nucl. Acids Res. 22:2121-2125, 1994; Guo, Z. 等, Nucl. Acids Res. 22:5456-5465, 1994)。寡核苷酸一般通过间隔基 (spacer) 或交联剂共价结合在表面经处理的支持体上。一种包括将小块聚丙烯酰胺凝胶排列在玻璃表面上以及使合成寡核苷酸与之共价结合的方法也是已知的 (Yershov, G. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4913, 1996)。

[0228] 另外, 涂覆有聚-L-赖氨酸或氨基丙基硅烷的玻璃表面也可用作支持体。支持体的实例包括尼龙膜、硝化纤维素膜、玻璃、硅片等。此外, 探针可通过本领域所用的任何方法固定化, 一般可用点样器 (spotter) 等将 DNA 固定在支持体上。

[0229] 当使用本发明的试剂盒将 DNA 微阵列用于检测 HPV 时, 优选在进行杂交之前对扩增 DNA 产物预先进行标记, 特别优选在扩增期间进行标记。标记方法的实例包括以下两种方法: 一种方法包括制备作为 DNA 聚合酶底物用于产生 PCR 扩增产物的 4 种脱氧核苷酸 ATCG (dATP、dCTP、dGTP、dTTP: 统称为 dNTP) 和标记的脱氧核苷酸 (例如 Cy3-dUTP), 调节各 dNTP 的最终浓度至同一水平, 将标记的脱氧核苷酸掺到要制备的扩增产物中, 另一种方法包括使用预先标记的引物以标记 DNA 的 PCR 反应。

[0230] 出于检测灵敏度和标记方便性方面的考虑, 标记物质优选含有荧光物质和生物素中的任一种。荧光物质的优选实例包括 FITC、FAM、Cy3、Cy5、Cy5.5、Cy7、TAMRA、Dabcyl、ROX、TET、罗丹明、德克萨斯红、HEX、Cyber Green 等, 特别优选的荧光物质是 Cy3。在生物素和洋地黄毒苷的情况下, 各种生物素结合的标记酶蛋白起反应, 可利用这类标记酶蛋白的酶活性为指标来进行检测。通过采用光学检测手段, 观察源于这类荧光物质的荧光强度, 能够以高灵敏度检测被用于荧光标记的各种荧光物质。另外, 当酶活性是利用各种显色反应检测时, 前述使用标记酶蛋白的酶活性作为指标的检测方法也可采用光学检测手段, 并

能够以高灵敏度进行检测。使用聚焦、非共焦激光扫描仪或 CCD 扫描仪为光学检测手段,可读取荧光强度值。

[0231] 当扩增产物与 DNA 微阵列杂交时,双链 DNA 产物可与 DNA 微阵列进行杂交反应,或者可以增加在杂交反应之前由扩增的双链 DNA 产物中分离出单链 DNA 的步骤。出于检测灵敏度方面的考虑,优选增加分离单链 DNA 的步骤。

[0232] 由双链 DNA 分离出单链 DNA 的方法并无特别的限制,可能提及的有例如公开于 JP-A-2006-230342 的方法。具体来讲,可通过下列步骤分离单链 DNA。将在非检测一侧上合成标签链的引物 5' 端用生物素标记。扩增之后,使生物素与链霉抗生物素固定化磁珠结合,形成扩增 DNA 产物-磁珠复合物。使该复合物与碱溶液(例如 NaOH 水溶液等)反应,由此使扩增 DNA 产物的双链解离成为单链。之后,使磁珠吸附到磁体上,由此可选择性地只分离出通过未用生物素标记的引物延伸的单链 DNA。使用磁珠分离反义链 DNA 的步骤的概要图见图 1。图 1 所示步骤中,当使用具有生物素修饰的 5' 端的反向引物而不是具有生物素修饰的 5' 端的正向引物时,也可按同样方式,使用磁珠分离出有义链 DNA。

[0233] 因为 HPV 遗传筛查是使用临床样品的试验,所以实验准确性控制极其重要。因此,需要设置作为内标的基因(内标基因)。本说明书的内标基因是与得自样品的 DNA 一起进行多重 PCR、与识别扩增产物的探针杂交并检测假阴性反应的基因。为此目的,通常采用持家基因,该基因在细胞中以相对较高的量表达,且其变异较少。具体实例包括 G3PDH、 β -肌动蛋白等。

[0234] 本发明的试剂盒采用了 G3PDH 作为内标,任选含有用于 G3PDH 的引物组(引物组 24)和探针(探针 24)的组合(参见上表 1 和表 3)。设计引物组和探针的组合,以按与各种类型的 HPV 基因的扩增反应或杂交反应相同的效率同时进行扩增或杂交。

[0235] 在一个实施方案中,本发明的试剂盒含有从前述 24 种引物组和探针的组合之中选出的引物组 3 和探针 3 的组合及引物组 4 和探针 4 的组合,以及任选引物组 24 和探针 24 的组合。这样,该试剂盒便可检出 HPV16 和 HPV18。这些 HPV 亚型对宫颈癌发生具有特别高的风险。

[0236] 在另一个实施方案中,本发明的试剂盒含有从前述 24 种引物组和探针的组合之中选出的引物组 3 和探针 3 的组合、引物组 4 和探针 4 的组合、引物组 5 和探针 5 的组合、引物组 6 和探针 6 的组合、引物组 7 和探针 7 的组合、引物组 9 和探针 9 的组合、引物组 10 和探针 10 的组合、引物组 13 和探针 13 的组合、引物组 14 和探针 14 的组合、引物组 15 和探针 15 的组合、引物组 18 和探针 18 的组合、引物组 19 和探针 19 的组合、引物组 20 和探针 20 的组合、引物组 23 和探针 23 的组合,以及任选引物组 24 和探针 24 的组合。这样,该试剂盒便可检出 HPV16、HPV18、HPV30、HPV31、HPV33、HPV35、HPV39、HPV45、HPV51、HPV52、HPV56、HPV58、HPV59 和 HPV68。这些 HPV 亚型被归类为对宫颈癌发生具有高风险。

[0237] 在进一步的实施方案中,本发明的试剂盒含有所有前述 23 种用于检测 HPV 的引物组和探针的组合,以及任选引物组 24 和探针 24 的组合。

[0238] 除各前述引物组和探针的组合外,本发明的试剂盒可含有所有下列试剂或其任选组合和其它试剂的组合:缓冲液、耐热 DNA 聚合酶、阳性对照 HPV DNA、非 HPV DNA、内标 G3PDH DNA、dNTP、荧光染料标记的碱基(例如 Cy3-dUTP)和链霉抗生物素固定化磁珠。

[0239] 作为本发明的另一方面,提供使用前述本发明的试剂盒以型特异性方式检测样品

中 HPV 存在与否的方法。该方法包括使用从样品中提取的 DNA (作为模板) 和前述引物组进行 PCR 的步骤, 以及检测扩增 DNA 产物的步骤。

[0240] 在另一个实施方案中, 该方法包括使用从样品中提取的 DNA (作为模板) 和前述引物组进行 PCR 的步骤, 分离扩增 DNA 产物作为单链的步骤, 通过单链 DNA 与前述探针进行杂交的检测步骤。虽然不特别限制各个步骤的实际方法, 但适当时, 优选采用试剂盒说明书所描述的方法。

[0241] 虽然下文中参照实施例对本发明进行更详细的说明, 但是本发明绝不局限于下面的实施例等。

实施例

[0242] 除非另有说明, 否则用于实施例的各种试剂 (缓冲液、酶、溶液、化合物等) 是本领域通常使用的试剂, 且是市售的或可通过以前报道的方法制备。

[0243] 实施例 1 引物的设计和特异性的确认

[0244] 由公共数据库获取 HPV 和用作内标的 G3PDH (甘油醛三磷酸脱氢酶) 的基因序列。用于本发明的 24 种基因序列的 GenBank 登录号见表 2。

[0245] 根据各个基因的序列, 设计出满足下列标准的引物组: 解链温度 (T_m) 的范围为 $60 \sim 70^\circ\text{C}$ (当采用最近邻法时, Na^+ 浓度: 50mM); 扩增产物长度的范围为 $100 \sim 500\text{bp}$; GC 含量的范围为 $50 \sim 60\%$; 它不含与其它 HPV 种类具有高度同源性的序列; 而且它在分子内不形成二级结构; 引物彼此间不杂交。这样, 设计出对 HPV 和 G3PDH 中的每一个都具有特异性的引物组。

[0246] 根据表 1 所示引物组的序列, 用 DNA 合成仪合成寡核苷酸 DNA。

[0247] 将 HPV6、HPV11、HPV16、HPV18、HPV30、HPV31、HPV33、HPV34、HPV35、HPV39、HPV40、HPV42、HPV45、HPV51、HPV52、HPV53、HPV54、HPV56、HPV58、HPV59、HPV61、HPV66 或 HPV68 的编码 DNA 分别导入质粒 pUC18 中, 得到用于 23 种模板的质粒。

[0248] 然后, 使用按照上述方法制备的每个引物组, 将 23 种用于 HPV 模板的质粒的各 DNA 和得自 Jurkat 细胞 (人白血病 T 淋巴瘤) 的基因组分别进行 PCR 反应。反应溶液的组成如下:

[0249] [表 4]

[0250]	10×PCR 缓冲液	2 μL
[0251]	2.5mM dNTP	0.4 μL
[0252]	引物 F (4 μM)	0.5 μL
[0253]	引物 R (4 μM)	0.5 μL
[0254]	DNA Taq 聚合酶	0.16 μL
[0255]	DDW (双蒸水)	15.44 μL
[0256]	模板 (1×10^6 个拷贝)	1 μL
[0257]	合计	20 μL

[0258] 所采用的 PCR 反应条件如下: 95°C 4 分钟, 然后 95°C 30 秒钟, 60°C 30 秒钟和 72°C 1 分钟, 30 次循环, 然后 72°C 7 分钟, 接着在 4°C 下保存。所得到的扩增 DNA 产物用琼脂糖凝胶电泳进行分离。得到每种引物组的具有预期长度的扩增产物, 证实不存在由非特异性杂

交引起的污染扩增产物。

[0259] 然后,使用 24 种引物组的混合物,分别使 23 种用于 HPV 模板的质粒和由 Jurkat 细胞提取的基因组进行 PCR 反应。引物组以两种浓度形式混合,使得每个引物组的扩增效率几乎为同一水平。反应溶液的组成如下。

[0260] [表 5]

[0261]	10×PCR 缓冲液	2 μ L
[0262]	2.5mM dNTP	0.4 μ L
[0263]	引物混合物	1 μ L
[0264]	(最终浓度:0.05 μ M 或 0.1 μ M)	
[0265]	DNA Taq 聚合酶	0.16 μ L
[0266]	DDW	15.44 μ L
[0267]	模板 (1×10^6 个拷贝)	1 μ L
[0268]	合计	20 μ L

[0269] 所采用的 PCR 反应条件如下:95℃ 4 分钟,然后 95℃ 30 秒钟,60℃ 30 秒钟和 72℃ 1 分钟,30 次循环,然后 72℃ 7 分钟,接着在 4℃ 下保存。所得到的扩增 DNA 产物用琼脂糖凝胶电泳进行分离。结果见图 2。得到每个模板的具有预期长度的扩增产物,因此证实,即使当引物混合时,也不存在由非特异性杂交引起的污染扩增产物。

[0270] 实施例 2 探针的设计

[0271] 设计在 23 种 HPV 和 G3PDH 的各个 PCR 扩增区内满足下列标准的探针(有义链 DNA):解链温度(T_m) 在 72 ~ 78℃ 范围内(当采用 GC% 方法时。 Na^+ 浓度:50mM);探针长度的范围为 69 ~ 71bp;GC 含量在 45 ~ 55% 的范围内;它不含与其它 HPV 种类具有高度同源性的序列,而且它在分子内不形成二级结构。这样,设计出对 HPV 和 G3PDH 中的每一个都具有特异性的引物组(表 3)。

[0272] 根据表 3 所示探针的序列,用 DNA 合成仪合成寡核苷酸 DNA。

[0273] 实施例 3DNA 微阵列的制备

[0274] 将实施例 2 中合成的 24 种探针的每一种按表 6 所示的组成进行混合,用市售接触型或非接触型点样器(SpotArray 或 Piezorray;PerkinElmer) 按图 3 的排列方式,点在涂覆有聚-L-赖氨酸的玻璃基底上(每种探针 2 个点),得到用于检测的 DNA 微阵列。

[0275] [表 6]

[0276]	探针 (100 μ m)	5 μ L
[0277]	20×SSC	3.75 μ L
[0278]	DDW	16.25 μ L
[0279]	合计	25 μ L

[0280] 实施例 4HPV 的扩增和检测

[0281] (1)HPV 和 G3PDH 的扩增与标记

[0282] 按表 7 所示反应混合物的组成,采用 24 种引物组的混合物(引物混合物),分别使 23 种用于 HPV 模板的质粒和由 Jurkat 细胞提取的基因组进行 PCR 反应。24 种引物组以两种浓度形式混合,使得每个引物组的扩增效率几乎为同一水平。为了检测表现为 DNA 微阵列上荧光强度的 HPV 感染存在与否,将荧光染料标记的碱基(Cy3-dUTP;GEHealthcare

Bio-Sciences Corp.) 同时加到 PCR 反应溶液中。

[0283] [表 7]

[0284]	10×PCR 缓冲液	2 μ L
[0285]	dCTP、dGTP、dATP (各 2.5mM)	0.4 μ L
[0286]	dTTP (1mM)	0.8 μ L
[0287]	Cy3-dUTP (1mM)	0.2 μ L
[0288]	引物混合物	1 μ L
[0289]	(最终浓度:0.05 μ M 或 0.1 μ M)	
[0290]	DNA Taq 聚合酶	0.16 μ L
[0291]	DDW	14.44 μ L
[0292]	模板 (1×10^4 个拷贝)	1 μ L
[0293]	合计	20 μ L

[0294] 所采用的 PCR 反应条件如下:95℃ 4 分钟,然后 95℃ 30 秒钟,60℃ 30 秒钟和 72℃ 1 分钟,30 次循环,然后 72℃ 7 分钟,接着在 4℃ 下保存。

[0295] 如上获得 Cy3 标记的扩增 DNA 产物。

[0296] PCR 反应后,使用纯化 Cy3 标记的扩增 DNA 产物的市售 PCR 纯化柱,除去反应中未使用的过量酶、荧光染料标记的碱基和引物。

[0297] (2) 使用 DNA 微阵列检测 HPV

[0298] 将纯化的 Cy3 标记的扩增 DNA 产物与表 8 中所述的杂交溶液混合,在 95℃ 加热 2 分钟使之变性,将混合物在冰上静置 3 分钟,使用 8 μ L 与 DNA 微阵列杂交。

[0299] [表 8]

[0300]	Cy3 标记的扩增 DNA 产物	3.1 μ L
[0301]	20×SSC	2.5 μ L
[0302]	50×Denhardt 溶液	0.8 μ L
[0303]	4%吐温溶液	0.5 μ L
[0304]	DDW	3.1 μ L
[0305]	合计	10 μ L

[0306] 按照 JP-B-3860174 中所述方法,在 65℃ 恒温槽中进行杂交反应 1 小时。

[0307] 杂交反应后,DNA 微阵列分别用 2×SSC-0.1% SDS 溶液和 0.2×SSC-0.1% SDS 溶液洗涤 5 分钟,用 0.2×SSC 和 0.05×SSC 漂洗后,用氮气空气枪或载玻片离心机干燥。

[0308] 用市售微阵列扫描仪 (GenePix4000B:Axon Instruments) 进行扫描。由 532nm 波长下样点的荧光强度值和样点周围的背景值,对检测进行了评价。

[0309] 任何模板都未检出由非特异性杂交引起的荧光点,结果证实可以 HPV 类型特异性的方式检测荧光点。

[0310] 实施例 5HPV 的检测额外包括使用磁珠分离单链 DNA 的步骤 (参见图 1)

[0311] 在实施例 1 中设计的引物组中,仅引物 F 是将生物素加到 5' 端而新产生的。将实际合成的定单发给 DNA 合成承包制造商,引物使用通用 DNA 合成仪经化学方法合成。按同样的方式,使用引物进行如实施例 4(1) 中所述 HPV 和 G3PDH 的扩增和标记步骤,得到 Cy3 标记的扩增 DNA 产物。

[0312] 然后,在 1.5mL 管中,使 Cy3 标记的扩增 DNA 产物溶液与链霉抗生物素固定化磁珠 (Dynabeads MyOne Streptavidin C1, Invitrogen) 反应 15 分钟,形成扩增 DNA 产物-磁珠复合物。反应溶液的组成如下:

[0313] [表 9]

[0314]	Cy3 标记的扩增 DNA 产物	10 μ L
[0315]	*2 $\times$ B&W 缓冲液	10 μ L
[0316]	磁珠	3.5-6 $\times 10^7$ 个磁珠
[0317]	合计	20 μ L

[0318] *2 $\times$ B&W 缓冲液的组成为:10mM Tris-HCl(pH 7.5)、1mM EDTA、2.0M NaCl。

[0319] 之后,充分除去反应溶液,同时使复合物吸附到磁体上。然后,除去磁体,将 0.1N NaOH(碱)溶液(10 μ L)加到复合物中,使混合物反应 10 分钟,使扩增 DNA 产物的双链解离成为单链。之后,仅将表 1 的 PCR 反应中由引物 F 延伸的有义链(单链)DNA 再次吸附到磁体上,收获碱溶液,从而仅 PCR 反应中由引物 R 延伸的反义链 DNA 被选择性地分离出来。分离的反义链(单链)DNA 用 3M 乙酸钠(1 μ L)中和后,在冰上静置 5 分钟。

[0320] 然后,将分离的反义链(单链)DNA 用于与实施例 4(2)中所述的 DNA 微阵列进行杂交反应。按照与实施例 4(2)同样的方法进行反应,只是用反义链(单链)DNA 替换表 8 中所列的反应组成中的 Cy3 标记的扩增 DNA 产物。

[0321] 扫描影像见图 4。对于任何模板都未检出由非特异性杂交引起的荧光点,这就证实了可 HPV 类型特异性的方式检测荧光点。此外,这可以证实,与实施例 4 相比,以较高灵敏度检测任何模板是可行的,这是由附加使用磁珠分离单链 DNA 的步骤导致的(图 5)。

[0322] 上述结果表明,使用本发明的引物组和探针以及本发明的 HPV 检测方法,可以高特异性和高灵敏度检测 HPV。

[0323] 工业实用性

[0324] 本发明提供可方便快速地以高特异性和高灵敏度检测多种 HPV 类型的引物组和探针。本发明还提供使用前述引物组和探针,能够方便快速地以高特异性和高灵敏度检测多种 HPV 类型的方法。

[0325] 本申请以在日本申请的专利申请号 2007-203677(申请日为 2007 年 8 月 3 日)为基础,该申请的内容通过引用全文结合到本文中。

[0326] [序列列表自由文本]

[0327] SEQ ID NO:1:用于 HPV6 基因扩增的正向 PCR 引物

[0328] SEQ ID NO:2:用于 HPV6 基因扩增的反向 PCR 引物

[0329] SEQ ID NO:3:用于 HPV11 基因扩增的正向 PCR 引物

[0330] SEQ ID NO:4:用于 HPV11 基因扩增的反向 PCR 引物

[0331] SEQ ID NO:5:用于 HPV16 基因扩增的正向 PCR 引物

[0332] SEQ ID NO:6:用于 HPV16 基因扩增的反向 PCR 引物

[0333] SEQ ID NO:7:用于 HPV18 基因扩增的正向 PCR 引物

[0334] SEQ ID NO:8:用于 HPV18 基因扩增的反向 PCR 引物

[0335] SEQ ID NO:9:用于 HPV30 基因扩增的正向 PCR 引物

[0336] SEQ ID NO:10:用于 HPV30 基因扩增的反向 PCR 引物

- [0337] SEQ ID NO :11 :用于 HPV31 基因扩增的正向 PCR 引物
- [0338] SEQ ID NO :12 :用于 HPV31 基因扩增的反向 PCR 引物
- [0339] SEQ ID NO :13 :用于 HPV33 基因扩增的正向 PCR 引物
- [0340] SEQ ID NO :14 :用于 HPV33 基因扩增的反向 PCR 引物
- [0341] SEQ ID NO :15 :用于 HPV34 基因扩增的正向 PCR 引物
- [0342] SEQ ID NO :16 :用于 HPV34 基因扩增的反向 PCR 引物
- [0343] SEQ ID NO :17 :用于 HPV35 基因扩增的正向 PCR 引物
- [0344] SEQ ID NO :18 :用于 HPV35 基因扩增的反向 PCR 引物
- [0345] SEQ ID NO :19 :用于 HPV39 基因扩增的正向 PCR 引物
- [0346] SEQ ID NO :20 :用于 HPV39 基因扩增的反向 PCR 引物
- [0347] SEQ ID NO :21 :用于 HPV40 基因扩增的正向 PCR 引物
- [0348] SEQ ID NO :22 :用于 HPV40 基因扩增的反向 PCR 引物
- [0349] SEQ ID NO :23 :用于 HPV42 基因扩增的正向 PCR 引物
- [0350] SEQ ID NO :24 :用于 HPV42 基因扩增的反向 PCR 引物
- [0351] SEQ ID NO :25 :用于 HPV45 基因扩增的正向 PCR 引物
- [0352] SEQ ID NO :26 :用于 HPV45 基因扩增的反向 PCR 引物
- [0353] SEQ ID NO :27 :用于 HPV51 基因扩增的正向 PCR 引物
- [0354] SEQ ID NO :28 :用于 HPV51 基因扩增的反向 PCR 引物
- [0355] SEQ ID NO :29 :用于 HPV52 基因扩增的正向 PCR 引物
- [0356] SEQ ID NO :30 :用于 HPV52 基因扩增的反向 PCR 引物
- [0357] SEQ ID NO :31 :用于 HPV53 基因扩增的正向 PCR 引物
- [0358] SEQ ID NO :32 :用于 HPV53 基因扩增的反向 PCR 引物
- [0359] SEQ ID NO :33 :用于 HPV54 基因扩增的正向 PCR 引物
- [0360] SEQ ID NO :34 :用于 HPV54 基因扩增的反向 PCR 引物
- [0361] SEQ ID NO :35 :用于 HPV56 基因扩增的正向 PCR 引物
- [0362] SEQ ID NO :36 :用于 HPV56 基因扩增的反向 PCR 引物
- [0363] SEQ ID NO :37 :用于 HPV58 基因扩增的正向 PCR 引物
- [0364] SEQ ID NO :38 :用于 HPV58 基因扩增的反向 PCR 引物
- [0365] SEQ ID NO :39 :用于 HPV59 基因扩增的正向 PCR 引物
- [0366] SEQ ID NO :40 :用于 HPV59 基因扩增的反向 PCR 引物
- [0367] SEQ ID NO :41 :用于 HPV61 基因扩增的正向 PCR 引物
- [0368] SEQ ID NO :42 :用于 HPV61 基因扩增的反向 PCR 引物
- [0369] SEQ ID NO :43 :用于 HPV66 基因扩增的正向 PCR 引物
- [0370] SEQ ID NO :44 :用于 HPV66 基因扩增的反向 PCR 引物
- [0371] SEQ ID NO :45 :用于 HPV68 基因扩增的正向 PCR 引物
- [0372] SEQ ID NO :46 :用于 HPV68 基因扩增的反向 PCR 引物
- [0373] SEQ ID NO :47 :用于 G3PDH 基因扩增的正向 PCR 引物
- [0374] SEQ ID NO :48 :用于 G3PDH 基因扩增的反向 PCR 引物
- [0375] SEQ ID NO :49 :用于 HPV6 基因检测的探针

- [0376] SEQ ID NO :50 :用于 HPV11 基因检测的探针
- [0377] SEQ ID NO :51 :用于 HPV16 基因检测的探针
- [0378] SEQ ID NO :52 :用于 HPV18 基因检测的探针
- [0379] SEQ ID NO :53 :用于 HPV30 基因检测的探针
- [0380] SEQ ID NO :54 :用于 HPV31 基因检测的探针
- [0381] SEQ ID NO :55 :用于 HPV33 基因检测的探针
- [0382] SEQ ID NO :56 :用于 HPV34 基因检测的探针
- [0383] SEQ ID NO :57 :用于 HPV35 基因检测的探针
- [0384] SEQ ID NO :58 :用于 HPV39 基因检测的探针
- [0385] SEQ ID NO :59 :用于 HPV40 基因检测的探针
- [0386] SEQ ID NO :60 :用于 HPV42 基因检测的探针
- [0387] SEQ ID NO :61 :用于 HPV45 基因检测的探针
- [0388] SEQ ID NO :62 :用于 HPV51 基因检测的探针
- [0389] SEQ ID NO :63 :用于 HPV52 基因检测的探针
- [0390] SEQ ID NO :64 :用于 HPV53 基因检测的探针
- [0391] SEQ ID NO :65 :用于 HPV54 基因检测的探针
- [0392] SEQ ID NO :66 :用于 HPV56 基因检测的探针
- [0393] SEQ ID NO :67 :用于 HPV58 基因检测的探针
- [0394] SEQ ID NO :68 :用于 HPV59 基因检测的探针
- [0395] SEQ ID NO :69 :用于 HPV61 基因检测的探针
- [0396] SEQ ID NO :70 :用于 HPV66 基因检测的探针
- [0397] SEQ ID NO :71 :用于 HPV68 基因检测的探针
- [0398] SEQ ID NO :72 :用于 G3PDH 基因检测的探针

序列表

<110> 仓敷纺绩株式会社 (KURASHIKI BOSEKI KABUSHIKI KAISHA)

<120> 用于检测人乳头瘤病毒的引物组和探针

<130>091283

<150>JP 2007-203677

<151>2007-08-03

<160>72

<170>PatentIn version 3.4

<210>1

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 HPV6 基因的正向 PCR 引物。

<400>1

tctgctgccc ctaaagctaa g 21

<210>2

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 HPV6 基因的反向 PCR 引物。

<400>2

ggtggaaagt gtatgccaag g 21

<210>3

<211>19

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 HPV11 基因的正向 PCR 引物。

<400>3

cgtttttcggt tgcccttac 19

<210>4

<211>19

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 HPV11 基因的反向 PCR 引物。

<400>4

accttttggt gcaatccac 19

<210>5

<211>18

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 HPV16 基因的正向 PCR 引物。

<400>5

cggttgcatg ctttttgg 18

<210>6

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 HPV16 基因的反向 PCR 引物。

<400>6

cagcggtatg taaggcgttg 20

<210>7

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 HPV18 基因的正向 PCR 引物。

<400>7

ctgcaccggc tgaaaataag 20

<210>8

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 HPV18 基因的反向 PCR 引物。

<400>8

atagcccaac aagcaacacc 20

<210>9

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 HPV30 基因的正向 PCR 引物。

<400>9

actaaggtgc ggttgtgtcc 20

<210>10

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 HPV30 基因的反向 PCR 引物。

<400>10

ataaggcgag gcgtcttacg 20

<210>11

<211>22

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 HPV31 基因的正向 PCR 引物。

<400>11

gggcgtctgc aactactact tc 22

<210>12

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 HPV31 基因的反向 PCR 引物。

<400>12

acacttgtagg cgttgtaggg 20

<210>13

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 HPV33 基因的正向 PCR 引物。

<400>13

gtattggcac aggctctggt 20

<210>14

<211>18

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 HPV33 基因的反向 PCR 引物。

<400>14

aatgggcgtg cttgatgt 18

<210>15

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 HPV34 基因的正向 PCR 引物。

<400>15

caagctgagc aagcctggta 20

<210>16

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 HPV34 基因的反向 PCR 引物。

<400>16

taggcgtctg gaacagttgg 20

<210>17

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 HPV35 基因的正向 PCR 引物。

<400>17

ccacttagca gcgtgagctt 20

<210>18

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 HPV35 基因的反向 PCR 引物。

<400>18

gtctcgcgtt ggagtctcat 20

<210>19

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 HPV39 基因的正向 PCR 引物。

<400>19

tagttcacgc tgagccctct 20

<210>20

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 HPV39 基因的反向 PCR 引物。

<400>20

aggtggaggc aaatacacca 20

<210>21

<211>19

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 HPV40 基因的正向 PCR 引物。

<400>21

tgcagtttga gcagccatc 19

<210>22

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 HPV40 基因的反向 PCR 引物。

<400>22

ccgtggcaag aggtatggat 20

<210>23

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 HPV42 基因的正向 PCR 引物。

<400>23

ccccgtttgt ccactacatc 20

<210>24

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 HPV42 基因的反向 PCR 引物。

<400>24

g'gcctacgc caaaaataac 20

<210>25

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 HPV45 基因的正向 PCR 引物。

<400>25

taagcccat tgctgctaca 20

<210>26

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 HPV45 基因的反向 PCR 引物。

<400>26

cagcagtaga aggcatggtc a 21

<210>27

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 HPV51 基因的正向 PCR 引物。

<400>27

gccatagtca ggcaaacgag 20

<210>28

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 HPV51 基因的反向 PCR 引物。

<400>28

ctgctaccat tggggaacg 20

<210>29

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 HPV52 基因的正向 PCR 引物。

<400>29

atagcactgc gacggacctt 20

<210>30

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 HPV52 基因的反向 PCR 引物。

<400>30

ccgctgtctt ctacgtgaca t 21

<210>31

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 HPV53 基因的正向 PCR 引物。

<400>31

tacggttttg cagcaacagg 20

<210>32

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 HPV53 基因的反向 PCR 引物。

<400>32

gcagctccag caatggttta 20

<210>33

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 HPV54 基因的正向 PCR 引物。

<400>33

accagccaat actgctgcta 20

<210>34

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 HPV54 基因的反向 PCR 引物。

<400>34

agcaggttac acagggcatc 20

<210>35

<211>19

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 HPV56 基因的正向 PCR 引物。

<400>35

ccgggaagga gtaaacgg 19

<210>36

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 HPV56 基因的反向 PCR 引物。

<400>36

cctgcaattg ttgtgttggc 20

<210>37

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 HPV58 基因的正向 PCR 引物。

<400>37

cattggtaca gggtcgggta 20

<210>38

<211>19

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 HPV58 基因的反向 PCR 引物。

<400>38

atccaaaggc cccacagta 19

<210>39

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 HPV59 基因的正向 PCR 引物。

<400>39

gttttgcaaa ggggaactgc 20

<210>40

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 HPV59 基因的反向 PCR 引物。

<400>40

cgcttgctcgt tgctgtctta 20

<210>41

<211>22

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 HPV61 基因的正向 PCR 引物。

<400>41

ccgtcctcgt cccctagtat aa 22

<210>42

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 HPV61 基因的反向 PCR 引物。

<400>42

gatgtcacag gcgtatcaag c 21

<210>43

<211>22

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 HPV66 基因的正向 PCR 引物。

<400>43

ataggctgga tgacactgag gt 22

<210>44

<211>22

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 HPV66 基因的反向 PCR 引物。

<400>44

caccatgtca ccgtcctcta tc 22

<210>45

<211>22

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 HPV68 基因的正向 PCR 引物。

<400>45

tgctacattt acctcccgtt cc 22

<210>46

<211>19

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 HPV68 基因的反向 PCR 引物。

<400>46

aatgccagtg cgtgttacg 19

<210>47

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 G3PDH 基因的正向 PCR 引物。

<400>47

cagcctcaag atcatcagca 20

<210>48

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 G3PDH 基因的反向 PCR 引物。

<400>48

aaaggtggag gagtgggtgt 20

<210>49

<211>70

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于检测 HPV6 基因的探针。

<400>49

caccctgtga ctcagtggct gttgcacgcg ttttggtttg cacgcgcctt acacacataa 60
gtaatataca 70

<210>50

<211>70

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于检测 HPV11 基因的探针。

<400>50

gccctgccaa gtatcttgcc aacaacacac ctggccaggg cgcggtattg catgactaat 60

gtacaataaa 70

<210>51

<211>70

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于检测 HPV16 基因的探针。

<400>51

cgtttcctgc ttgcatgcg tgccaaatcc ctgttttcct gacctgcact gcttgccaac 60

cattccattg 70

<210>52

<211>70

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于检测 HPV18 基因的探针。

<400>52

attgcgtcgc aagcccacca taggccctcg caaacgttct gctccatctg ccactacgtc 60

ttctaaacct 70

<210>53

<211>70

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于检测 HPV30 基因的探针。

<400>53

ggcatttagg tagcaattta ggtggcgctc ctatgtcctc cacccttttt ggttggtgca	60
caccactgtg	70

<210>54

<211>70

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于检测 HPV31 基因的探针。

<400>54

cacctgccac acataatggt tcccccttcta ctgctgtaca gtccacatct gctgtgtctg	60
cctatgtacc	70

<210>55

<211>70

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于检测 HPV33 基因的探针。

<400>55

acctattggt actgaccac ctacagctgc aatcccccttg cagcctatac gtcctccggt	60
tactgtagac	70

<210>56

<211>70

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于检测 HPV34 基因的探针。

<400>56

gcagcagatg tcagtcacac gtgtgtctta ccattgagag cacacacgct gacctattag 60
tgt tagaaga 70

<210>57

<211>70

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于检测 HPV35 基因的探针。

<400>57

caggtagagg ggcatgatac agttgaacaa tgtagtatgg gcagtgggga tagtataacc 60
tctagtagcg 70

<210>58

<211>71

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于检测 HPV39 基因的探针。

<400>58

gggattcggg cactacatat aacacaggct cactaccttc tgtggcttct tcagcatcta 60
ctaaatatgc c 71

<210>59

<211>70

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于检测 HPV40 基因的探针。

<400>59

cggcaccaca tacactggag acaccacata cactagagac accactggac actactgatg 60
ccctgtttga 70

<210>60

<211>70

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于检测 HPV42 基因的探针。

<400>60

actgtgcatg tgggccctga tttatctgtt gtggaccacc catgggacag taccccaacg 60

tctgtaatgc 70

<210>61

<211>70

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于检测 HPV45 基因的探针。

<400>61

gtgctacaaa tgatagtgac ctgtttgatg tatatgcaga cttcccacct cctgcgtcca 60

ctacacctag 70

<210>62

<211>70

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于检测 HPV51 基因的探针。

<400>62

gatgggcaac atggcggttc acagaacagt gtgtgtagta gcgggggggg cagtgttatg 60

gatgtggaaa 70

<210>63

<211>70

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于检测 HPV52 基因的探针。

<400>63

caagcagtcc ggaaagtgct gggcaagatg gtgtagaaaa acatggtagt ccgcgtgcaa	60
aacacatttg	70

<210>64

<211>69

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于检测 HPV53 基因的探针。

<400>64

cacccaggac atccatggat cgtcagttat ttgaaaatac agaagagcga ccacgtacat	60
tgcaccagc	69

<210>65

<211>70

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于检测 HPV54 基因的探针。

<400>65

gtgtatatag tgaggtatgt atggtgagta tggtagtgag tgcattgcagg cctgcagtga	60
ctgaggtgag	70

<210>66

<211>70

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于检测 HPV56 基因的探针。

<400>66

gaggtacagg gacgtgggtg cgggaataca caaatggag gctcacaaaa cagtacctat 60
agtaacaata 70

<210>67

<211>70

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于检测 HPV58 基因的探针。

<400>67

atatgtgccc cttggtagta cccaccgctc tgaggctata cctttacagc ccatacgtcc 60
cccagttacc 70

<210>68

<211>71

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于检测 HPV59 基因的探针。

<400>68

gaggctgaaa ccaagacacc gttacatgag ctgctgatac gctgttatag atgcctaaaa 60
cctctatgtc c 71

<210>69

<211>70

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于检测 HPV61 基因的探针。

<400>69

tatgctgacc ctgaggtggtt ggatcttccct gcacaacata cacaacccac acttacagta 60
cagggccctt 70

<210>70

<211>70

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于检测 HPV66 基因的探针。

<400>70

gcaccagcat taggggaaca ttggactaag ggcgcggtgt gtaagtctac accaggtaat	60
acaggggat t	70

<210>71

<211>70

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于检测 HPV68 基因的探针。

<400>71

tgttgtgtta ccagcaacgt ctccacagtt gcctttaaca ccctctacac caattgatac	60
aacctatgcc	70

<210>72

<211>70

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于检测 G3PDH 基因的探针。

<400>72

aaacctgcca aatatgatga catcaagaag gtggtgaagc aggcgtcgga gggccccctc	60
aaggcatcc	70

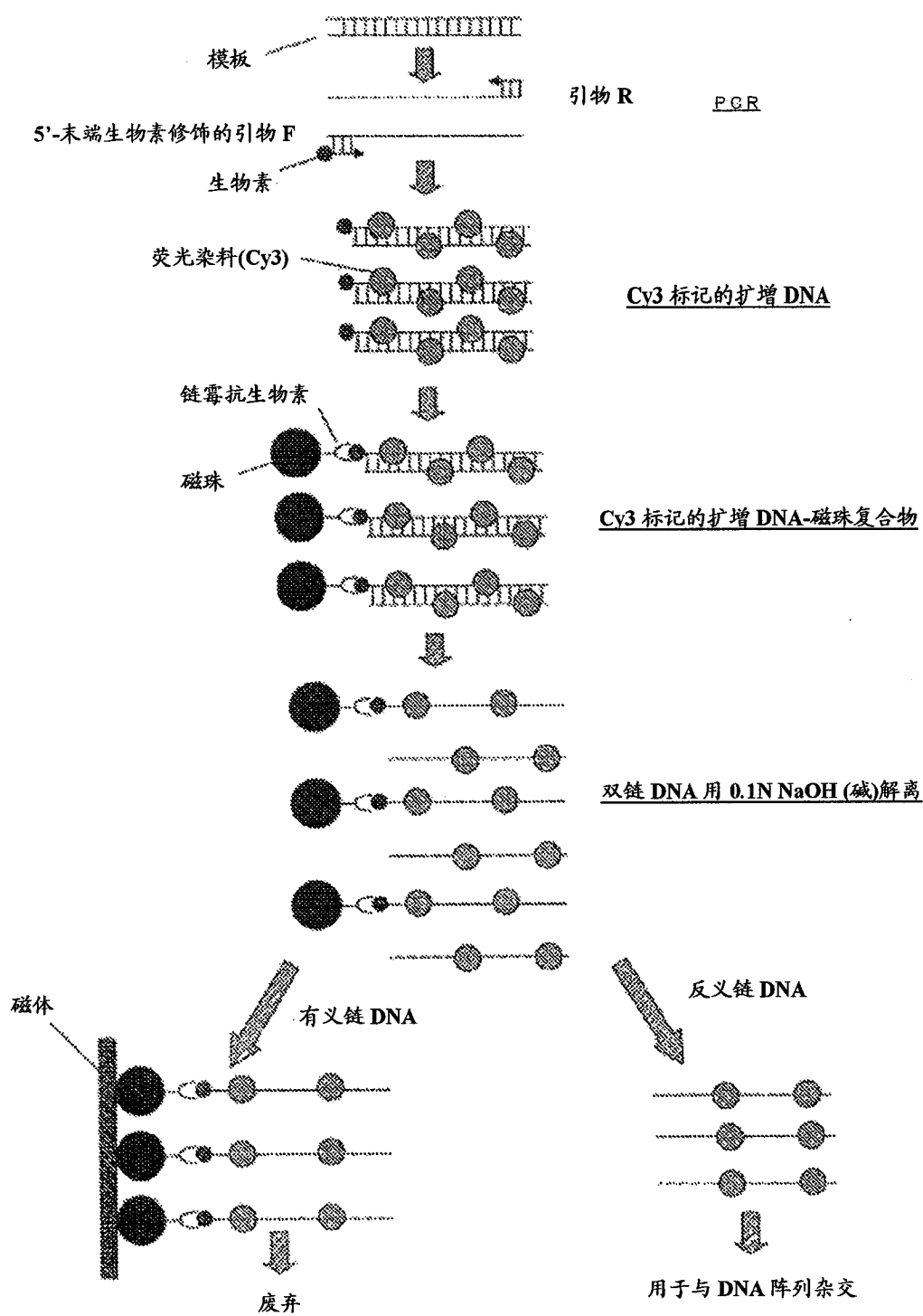


图 1

编号	类型	大小	编号	类型	大小
1	HPV6	423	13	HPV45	177
2	HPV11	200	14	HPV51	381
3	HPV16	238	15	HPV52	492
4	HPV18	467	16	HPV53	229
5	HPV30	314	17	HPV54	349
6	HPV31	276	18	HPV56	236
7	HPV33	476	19	HPV58	130
8	HPV34	159	20	HPV59	364
9	HPV35	258	21	HPV61	185
10	HPV39	432	22	HPV66	233
11	HPV40	417	23	HPV68	383
12	HPV42	228	24	G3PDH	460

M: ϕ X174/Hinc II

图 2

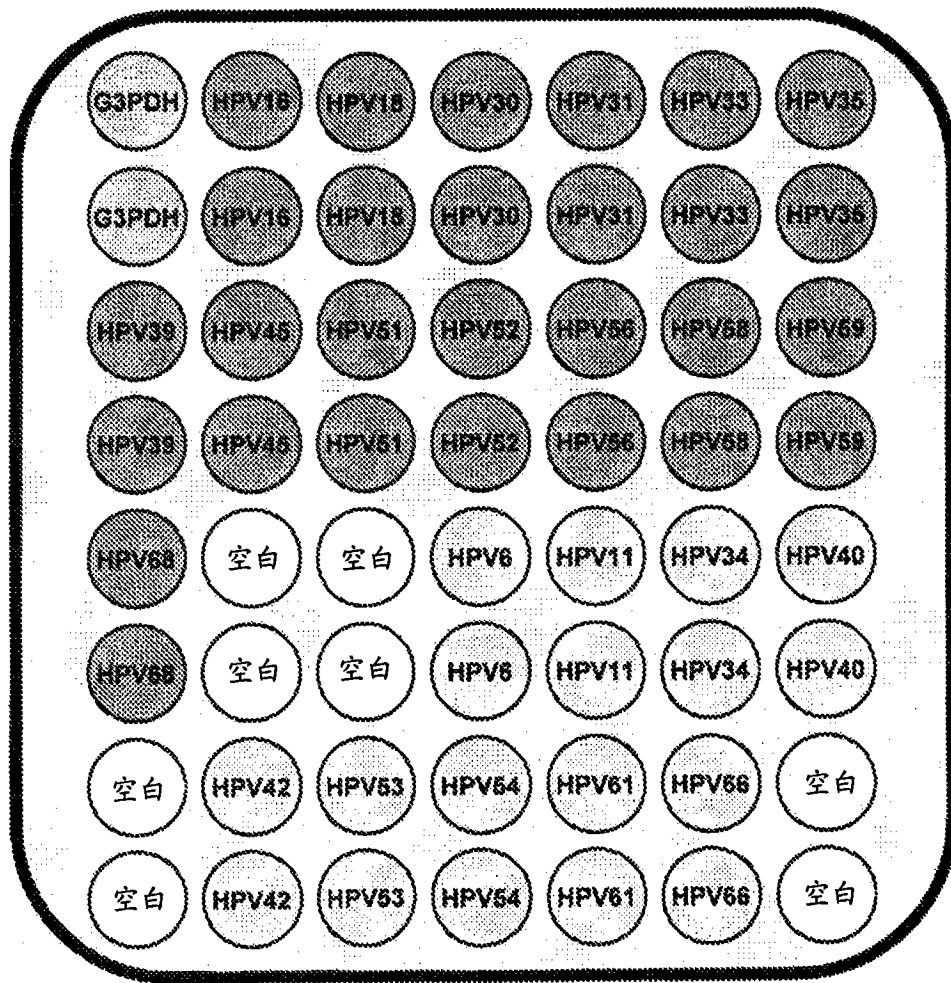


图 3

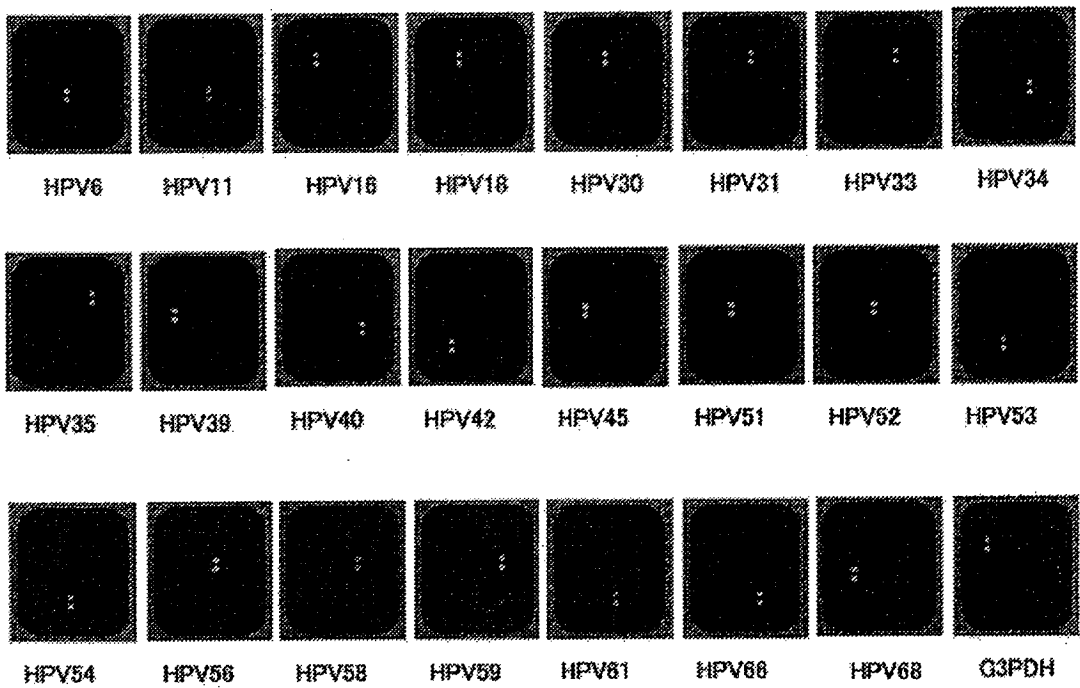


图 4

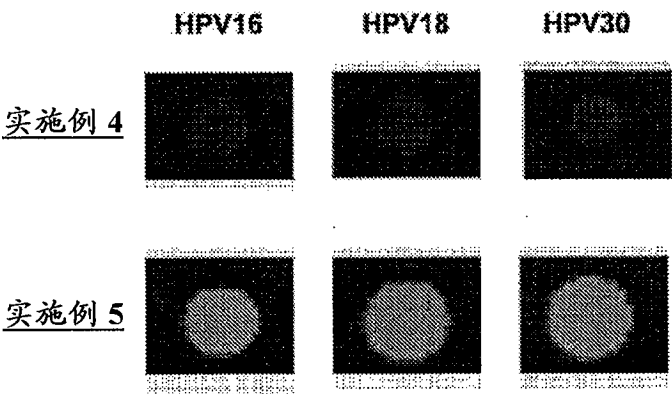


图 5