



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103517994 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 15

(21) 申请号 201280012327. X

(22) 申请日 2012. 01. 09

(30) 优先权数据

61/430, 797 2011. 01. 07 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 09. 09

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/020684 2012. 01. 09

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/094682 EN 2012. 07. 12

(71) 申请人 奇亚根盖瑟斯堡股份有限公司

地址 美国马里兰州

(72) 发明人 S. 兰格瓦拉 L. 科巴亚希 T. 盖伊

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 张文辉

(51) Int. Cl.

C12Q 1/70 (2006. 01)

权利要求书6页 说明书18页

序列表13页 附图12页

(54) 发明名称

用于对高风险人乳头瘤病毒进行基因型分型和定量的材料和方法

(57) 摘要

披露了用于检测和定量高风险 HPV 类型的核酸、分析以及方法。

1. 一种对高风险 HPV 基因组的 E6/E7 区中的靶序列具有特异性的核酸引物或探针,其中:

a. 所述核酸引物或探针在其整个长度上与该靶序列和其亚型的基因组的 E6/E7 区中的至少一个核酸序列两者具有 80% 或更大的一致性;和

b. 所述核酸引物或探针不与来源于不同 HPV 类型的核酸杂交。

2. 根据权利要求 1 所述的核酸引物或探针,其中该高风险 HPV 基因组是选自下组,该组由以下各项组成:HPV16、HPV18 以及 HPV45。

3. 根据权利要求 1 或权利要求 2 所述的核酸引物或探针,包含与选自下组的序列具有约 70% 到 100% 一致性的序列,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:1 到 SEQ ID NO:12 和 SEQ ID NO:16 到 SEQ ID NO:21,或其互补序列。

4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的核酸引物或探针,由选自下组的序列组成,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:1 到 SEQ ID NO:12 和 SEQ ID NO:16 到 SEQ ID NO:21,和/或其互补序列。

5. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的核酸探针,包含与选自下组的序列具有约 70% 到 100% 一致性的序列,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:18 以及 SEQ ID NO:21,或其互补序列。

6. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的核酸引物,其中该引物能够扩增该 HPV16 基因组的 E6/E7 区的一部分,但不扩增 HPV18 或 HPV45 基因组的 E6/E7 区。

7. 根据权利要求 6 所述的核酸引物,包含 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 或其互补序列。

8. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的核酸引物,其中该引物能够扩增该 HPV18 基因组的 E6/E7 区的一部分,但不扩增 HPV16 或 HPV45 基因组的 E6/E7 区。

9. 根据权利要求 8 所述的核酸引物,包含 SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:5。

10. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的核酸引物,其中该引物能够扩增该 HPV45 基因组的 E6/E7 区的一部分,但不扩增 HPV16 基因组或 HPV18 基因组的 E6/E7 区。

11. 根据权利要求 10 所述的核酸引物,包含 SEQ ID NO:7 或 SEQ ID NO:8。

12. 一种引物组,包含至少一个根据权利要求 1 至 4 和权利要求 6 至 11 中任一项所述的引物。

13. 根据权利要求 12 所述的引物组,包含至少一个选自下组的引物对,该组由以下各项组成:

a. 能够扩增该 HPV16 基因组的 E6/E7 区的一部分,但不扩增 HPV18 或 HPV45 基因组的 E6/E7 区的引物对;

b. 能够扩增该 HPV18 基因组的 E6/E7 区的一部分,但不扩增 HPV16 或 HPV45 基因组的 E6/E7 区的引物对;

c. 能够扩增该 HPV45 基因组的 E6/E7 区的一部分,但不扩增 HPV16 或 HPV18 基因组的 E6/E7 区的引物对。

14. 根据权利要求 12 或权利要求 13 所述的引物组,包含选自下组的引物对,该组由以下各项组成:

a. 与 SEQ ID NO:1 具有约 70% 到 100% 一致性的第一引物和与 SEQ ID NO:2 具有约 70% 到 100% 一致性的第二引物,

b. 与 SEQ ID NO:4 具有约 70% 到 100% 一致性的第一引物和与 SEQ ID NO:5 具有约 70% 到 100% 一致性的第二引物,

c. 与 SEQ ID NO:7 具有约 70% 到 100% 一致性的第一引物和与 SEQ ID NO:8 具有约 70% 到 100% 一致性的第二引物,

d. 与 SEQ ID NO:10 具有约 70% 到 100% 一致性的第一引物和与 SEQ ID NO:11 具有约 70% 到 100% 一致性的第二引物,

e. 与 SEQ ID NO:16 具有约 70% 到 100% 一致性的第一引物和与 SEQ ID NO:17 具有约 70% 到 100% 一致性的第二引物,

f. 与 SEQ ID NO:19 具有约 70% 到 100% 一致性的第一引物和与 SEQ ID NO:20 具有约 70% 到 100% 一致性的第二引物。

15. 根据权利要求 12 至 14 中任一项所述的引物组, 包含选自下组的引物对, 该组由以下各项组成:

a. 由 SEQ ID NO:1 组成的第一引物和与 SEQ ID NO:2 具有约 70% 到 100% 一致性的第二引物,

b. 由 SEQ ID NO:4 组成的第一引物和与 SEQ ID NO:5 具有约 70% 到 100% 一致性的第二引物,

c. 由 SEQ ID NO:7 组成的第一引物和与 SEQ ID NO:8 具有约 70% 到 100% 一致性的第二引物,

d. 由 SEQ ID NO:10 组成的第一引物和与 SEQ ID NO:11 具有约 70% 到 100% 一致性的第二引物,

e. 由 SEQ ID NO:16 组成的第一引物和与 SEQ ID NO:17 具有约 70% 到 100% 一致性的第二引物,

f. 由 SEQ ID NO:19 组成的第一引物和与 SEQ ID NO:20 具有约 70% 到 100% 一致性的第二引物。

16. 一种用于检测 HPV16、18 和 / 或 45 的试剂盒, 所述试剂盒包含根据权利要求 1 所述的核酸引物或探针。

17. 根据权利要求 15 所述的试剂盒, 包含至少一个核酸引物和至少一个核酸探针, 其中:

a. 所述核酸引物包含与选自下组的序列具有约 70% 到 100% 一致性的序列, 该组由以下各项组成: SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19 以及 SEQ ID NO:20, 或其互补序列; 并且

b. 所述核酸探针包含与选自下组的序列具有约 70% 到 100% 一致性的序列, 该组由以下各项组成: SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:18 以及 SEQ ID NO:21, 或其互补序列。

18. 根据权利要求 17 所述的试剂盒, 包含 HPV16 引物和探针组、HPV18 引物和探针组和 / 或 HPV45 引物和探针组。

19. 根据权利要求 18 所述的试剂盒, 其中:

a. 该 HPV16 引物和探针组包含:

- (i) 与 SEQ ID NO:1 序列具有 70% 到 100% 一致性的引物,
- (ii) 与 SEQ ID NO:2 序列具有 70% 到 100% 一致性的引物, 以及
- (iii) 与 SEQ ID NO:3 序列具有 70% 到 100% 一致性的探针 ;
- b. 该 HPV18 引物和探针组包含 :
  - (i) 与 SEQ ID NO:4 序列具有 70% 到 100% 一致性的引物,
  - (ii) 与 SEQ ID NO:5 序列具有 70% 到 100% 一致性的引物, 以及
  - (iii) 与 SEQ ID NO:6 序列具有 70% 到 100% 一致性的探针 ; 并且
- c. 该 HPV45 引物和探针组包含 :
  - (i) 与 SEQ ID NO:7 序列具有 70% 到 100% 一致性的引物,
  - (ii) 与 SEQ ID NO:8 序列具有 70% 到 100% 一致性的引物, 以及
  - (iii) 与 SEQ ID NO:9 序列具有 70% 到 100% 一致性的探针。
- 20. 根据权利要求 16 至 19 中任一项所述的试剂盒, 进一步包含对照引物和探针组。
- 21. 根据权利要求 20 所述的试剂盒, 其中该对照引物和探针组包含
  - a. 与 SEQ ID NO:16 序列具有 70% 到 100% 一致性的引物,
  - b. 与 SEQ ID NO:17 序列具有 70% 到 100% 一致性的引物, 以及,
  - c. 与 SEQ ID NO:18 序列具有 70% 到 100% 一致性的探针。
- 22. 一种对高风险 HPV 进行基因型分型的方法, 该方法包括 :
  - a. 使至少一个根据权利要求 1 至 11 中任一项所述的核酸引物或探针与第一高风险 HPV 基因组的 E6/E7 区中的靶序列的至少一部分杂交 ; 并且
  - b. 检测该核酸与该第一高风险 HPV 基因组的 E6/E7 区的杂交。
- 23. 根据权利要求 22 所述的方法, 其中该核酸引物或探针包含与选自下组的序列具有约 70% 到 100% 一致性的序列, 该组由以下各项组成 : SEQ ID NO:1 到 SEQ ID NO:12 和 SEQ ID NO:16 到 SEQ ID NO:21, 或其互补序列。
- 24. 根据权利要求 22 所述的方法, 其中 :
  - a. 使核酸引物与该靶序列杂交 ; 并且
  - b. 通过包括执行扩增反应的方法来检测杂交。
- 25. 根据权利要求 24 所述的方法, 其中 :
  - a. 该高风险 HPV 是选自下组, 该组由以下各项组成 : HPV16、HPV18 和 HPV45 ; 并且
  - b. 所述扩增反应产生对应于该 HPV 基因组的 E6/E7 区的一部分的扩增子。
- 26. 根据权利要求 25 所述的方法, 其中该核酸引物在其整个长度上与选自下组的核苷酸序列具有约 70% 到 100% 一致性, 该组由以下各项组成 : SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:8 或其互补序列。
- 27. 根据权利要求 22 所述的方法, 其中使核酸探针与该靶序列杂交, 所述核酸探针任选地被可检测地标记。
- 28. 根据权利要求 22 所述的方法, 其中所述方法是以一种实时多重 PCR 格式执行的。
- 29. 根据权利要求 28 所述的方法, 其中所述方法能够区别 HPV16、HPV18 以及 HPV45 感染, 所述方法包括 :
  - a. 提供怀疑包含高风险 HPV 的样品 ;
  - b. 使该样品与以下各项接触 :

(i)能够扩增该 HPV16 基因组的 E6/E7 区的靶序列的一部分,但不扩增 HPV18 或 HPV45 基因组的 E6/E7 区的引物组;

(ii)能够扩增该 HPV18 基因组的 E6/E7 区的靶序列的一部分,但不扩增 HPV16 或 HPV45 基因组的 E6/E7 区的引物组;

(iii) (iii)能够扩增该 HPV45 基因组的 E6/E7 区的靶序列的一部分,但不扩增 HPV16 或 HPV18 基因组的 E6/E7 区的引物组;

(iv)能够与该 HPV16 基因组的 E6/E7 区的靶序列的一部分杂交,但不与 HPV18 或 HPV45 基因组的 E6/E7 区杂交的被可检测地标记的核酸探针;

(v)能够与该 HPV18 基因组的 E6/E7 区的靶序列的一部分杂交,但不与 HPV16 或 HPV45 基因组的 E6/E7 区杂交的被可检测地标记的核酸探针;以及

(vi)能够与该 HPV45 基因组的 E6/E7 区的靶序列的一部分杂交,但不与 HPV16 或 HPV18 基因组的 E6/E7 区杂交的被可检测地标记的核酸探针,

其中每个核酸探针具有不同的可检测标记;

c. 进行核酸扩增;并且

d. 检测每个可检测标记的存在或不存在。

30. 根据权利要求 22 所述的方法,其中所述方法是在能够复制由凯杰公司(QIAGEN)的 Rotor-Gene PCR 仪器执行的方法的平台上执行的。

31. 根据权利要求 22 所述的方法,其中所述方法不受 PreservCyt® (马萨诸塞州贝德福德市的豪洛捷公司)和 SurePath™ (马里兰州斯帕克斯市的百克顿-迪金森公司)存在或不存在的影响。

32. 一种组合物,包含与一种高风险 HPV 基因组的 E6/E7 区中的靶序列杂交的根据权利要求 1 所述的核酸引物或探针。

33. 根据权利要求 32 所述的组合物,其中该高风险 HPV 基因组是选自下组,该组由以下各项组成:HPV16、HPV18 以及 HPV45。

34. 根据权利要求 33 所述的组合物,其中该核酸引物或探针包含与选自下组的序列具有约 70% 到 100% 一致性的序列,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:1 到 SEQ ID NO:12 和 SEQ ID NO:16 到 SEQ ID NO:21,或其互补序列。

35. 根据权利要求 1 至 4、6 以及 7 中任一项所述的引物,包含能够与选自下组的序列杂交的 3' 端序列,该组由以下各项组成:

(a) SEQ ID NO:13 的核苷酸 695 到 719 或其互补序列;和

(b) SEQ ID NO. 13 的核苷酸 811 到 834 或其互补序列,

其中所述引物为一种 HPV16E6/E7 特异性引物。

36. 一种试剂盒,包含至少一个根据权利要求 35 所述的引物。

37. 根据权利要求 36 所述的试剂盒,包含:

(a) 包含能够与 SEQ ID NO:13 的核苷酸 695 到 719 的互补序列杂交的 3' 端序列的第一引物;和

(b) 包含能够与 SEQ ID NO:13 的核苷酸 811 到 834 杂交的 3' 端序列的第二引物。

38. 根据权利要求 36 或 37 所述的试剂盒,进一步包含能够与 SEQ ID NO. 13 的核苷酸 751 到 775 或其互补序列杂交的核酸探针。

39. 根据权利要求 1 至 4、8 以及 9 中任一项所述的引物,包含能够与选自下组的序列杂交的 3' 端序列,该组由以下各项组成:

- a. SEQ ID NO:14 的核苷酸 724 到 747 或其互补序列;和
  - b. SEQ ID NO:14 的核苷酸 837 到 860 或其互补序列,
- 其中所述引物为一种 HPV18E6/E7 特异性引物。

40. 一种试剂盒,包含至少一个根据权利要求 39 所述的引物。

41. 根据权利要求 40 所述的试剂盒,包含:

(a) 包含能够与 SEQ ID NO:14 的核苷酸 724 到 747 的互补序列杂交的 3' 端序列的第一引物;和

(b) 包含能够与 SEQ ID NO:14 的核苷酸 837 到 860 杂交的 3' 端序列的第二引物。

42. 根据权利要求 40 或 41 所述的试剂盒,进一步包含能够与 SEQ ID NO. 14 的核苷酸 748 到 773 杂交的探针。

43. 根据权利要求 1 至 4、10 以及 11 中任一项所述的引物,包含能够与选自下组的序列杂交的 3' 端序列,该组由以下各项组成:

- (a) SEQ ID NO:15 的核苷酸 112 到 135 或其互补序列;
  - (b) SEQ ID NO:15 的核苷酸 208 到 231 或其互补序列;
  - (c) SEQ ID NO:15 的核苷酸 402 到 425 或其互补序列;以及
  - (d) SEQ ID NO:15 的核苷酸 546 到 569 或其互补序列,
- 其中该引物为一种 HPV45E6/E7 特异性引物。

44. 一种试剂盒,包含至少一个根据权利要求 43 所述的引物。

45. 根据权利要求 44 所述的试剂盒,包含:

(a) 第一引物对,包含:

(i) 包含能够与 SEQ ID NO:15 的互补核苷酸 112 到 135 杂交的 3' 端序列的第一引物;  
和

(ii) 包含能够与 SEQ ID NO:15 的核苷酸 208 到 231 杂交的 3' 端序列的第二引物;和  
/ 或

(b) 第二引物对,包含:

(i) 包含能够与 SEQ ID NO:15 的互补核苷酸 402 到 425 杂交的 3' 端序列的第三引物;  
和

(ii) 包含能够与 SEQ ID NO:15 的核苷酸 546 到 569 杂交的 3' 端序列的第四引物。

46. 根据权利要求 44 或 45 所述的试剂盒,进一步包含至少一个选自下组的核酸探针,该组由以下各项组成:

- (i) 能够与 SEQ ID NO. 15 的核苷酸 136 到 165 或其互补序列杂交的探针;和
- (ii) 能够与 SEQ ID NO. 15 的核苷酸 517 到 542 或其互补序列杂交的探针。

47. 根据权利要求 1 所述的核酸探针,所述探针能够与 SEQ ID NO. 13 的核苷酸 751 到 775 或其互补序列杂交。

48. 根据权利要求 1 所述的核酸探针,所述探针能够与 SEQ ID NO. 14 的核苷酸 748 到 773 或其互补序列杂交。

49. 根据权利要求 1 所述的核酸探针,所述探针能够与以下各项杂交:

- 
- (a) SEQ ID NO. 15 的核苷酸 136 到 165 或其互补序列 ;或  
(b) SEQ ID NO. 15 的核苷酸 517 到 542 或其互补序列。

## 用于对高风险人乳头瘤病毒进行基因型分型和定量的材料 和方法

### [0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2011 年 1 月 7 日提交的美国临时申请号 61/430,797 的优先权,该申请通过引用以其全文结合于此。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及用于确定样品中核酸的存在的分析、方法、试剂、系统和试剂盒。更确切地说,本发明涉及对样品中的高风险人乳头瘤病毒的检测、基因型分型和定量。

### [0004] 发明背景

[0005] 持久性感染致癌性高风险(HR)人乳头瘤病毒(HPV)基因型与存在出现高级发育异常或宫颈癌瘤、外阴或阴道癌瘤的风险增加相关。存在约 18 种感染生殖器粘膜的 HR-HPV 类型并且被定义为致癌的。在这些 HPV 类型中,16、18 和 45 与最高比率的宫颈腺癌相关。HPV 类型 16 和 18 造成了所有宫颈癌的 70%,是最普遍的致癌 HPV 类型,并且成为新 HPV 疫苗的标靶。

[0006] 众所周知利用针对 HR-HPV 的存在进行分子筛查的筛查程序独立地或作为细胞学测试的辅助改进了标准护理方法的疗效。此外,定量病毒负荷的测试也可能重要,因为已显示提高的 HPV 负荷与宫颈癌的疾病进展相关联。然而,计算 HPV DNA 负荷的预测值可能取决于所存在的 HPV 感染类型而变化,因为不同 HR-HPV 类型的生物学行为不同。因此,HR-HPV 负荷可以是侵入性癌瘤的一个类型依赖性风险标志。因此,精确地对 HPV 感染进行基因型分型并且对病毒负荷进行定量的能力将是一种有价值的工具。

[0007] 不幸地,大部分 HR-HPV 筛查方法并不对单独的 HPV 类型进行基因型分型,而是检测 HR-HPV 的整个组。确实存在一些基于对不同 HR-HPV 基因组的 L1 区的一部分进行扩增从而对高风险 HPV 类型进行基因型分型的基于 PCR 的分析。然而,以 L1 区作为标靶的测试容易产生假阴性结果,因为部分 L1 开放阅读框架在低百分比的进入人基因组中的整合事件中丢失。因此,使用基于 L1 的 HR-HPV 筛查程序可能导致潜在的高风险 HPV 感染的监测和治疗的延误。因此,对于基于 HPV 基因组中除 L1 以外的区域来精确地对 HR-HPV 感染进行基因型分型和 / 或定量的材料和方法存在需要,这将是一种有价值的工具。

### [0008] 发明概述

[0009] 在此所述的组合物、核酸、分析、试剂盒和方法通过提供适合于特异性地检测高风险 HPV 类型的 E6/E7 区的核酸来解决上文所述的缺点。

[0010] 一方面,一种对高风险 HPV 基因组的 E6/E7 区中的靶序列具有特异性的核酸引物或探针,其中 :a. 所述核酸引物或探针在其整个长度上与该靶序列和其亚型的基因组的 E6/E7 区中的至少一个核酸序列两者具有 80% 或更大的一致性 ;并且 b. 所述核酸引物或探针不与来源于不同 HPV 类型的核酸杂交。

[0011] 在一个实施例中,该高风险 HPV 基因组是选自下组,该组由以下各项组成 :HPV16、HPV18 和 HPV45。



[0012] 在一个实施例中,该核酸引物包含与选自下组的序列具有约 70% 到 100% 一致性的序列,主要由该序列组成,或由该序列组成,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:1 到 SEQ ID NO:12 和 SEQ ID NO:16 到 SEQ ID NO:21,和 / 或其互补序列。

[0013] 在一个实施例中,该核酸探针包含与选自下组的序列具有约 70% 到 100% 一致性的序列,主要由该序列组成,或由该序列组成,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:18 以及 SEQ ID NO:21,和 / 或其互补序列。

[0014] 在一个实施例中,该引物能够扩增 HPV16 基因组的 E6/E7 区的一部分,但不能扩增 HPV18 或 HPV45 基因组的 E6/E7 区。

[0015] 在一个实施例中,该核酸引物包含 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 或其互补序列,主要由该序列组成,或由该序列组成。

[0016] 在一个实施例中,所述引物能够扩增 HPV18 基因组的 E6/E7 区的一部分,但不能扩增 HPV16 或 HPV45 基因组的 E6/E7 区。

[0017] 在一个实施例中,该核酸引物包含 SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:5,主要由该序列组成,或由该序列组成。

[0018] 在一个实施例中,所述引物能够扩增 HPV45 基因组的 E6/E7 区的一部分,但不能扩增 HPV16 或 HPV18 基因组的 E6/E7 区。

[0019] 在一个实施例中,该核酸引物包含 SEQ ID NO:7 或 SEQ ID NO:8,主要由该序列组成,或由该序列组成。

[0020] 在一个实施例中,提供了包含至少一个核酸引物的引物组,该核酸引物包含与选自下组的序列具有约 70% 到 100% 一致性的序列,主要由该序列组成,或由该序列组成,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:1 到 SEQ ID NO:12 和 SEQ ID NO:16 到 SEQ ID NO:21,和 / 或其互补序列。

[0021] 在一个实施例中,该引物组包含至少一个选自下组的引物对,主要由该至少一个引物对组成,或由该至少一个引物对组成,该组由以下各项组成:(a) 能够扩增 HPV16 基因组的 E6/E7 区的一部分,但不扩增 HPV18 或 HPV45 基因组的 E6/E7 区的引物对;(b) 能够扩增 HPV18 基因组的 E6/E7 区的一部分,但不扩增 HPV16 或 HPV45 基因组的 E6/E7 区的引物对;以及(c) 能够扩增 HPV45 基因组的 E6/E7 区的一部分,但不扩增 HPV16 或 HPV18 基因组的 E6/E7 区的引物对。

[0022] 在一个实施例中,该引物组包含选自下组的引物对,主要由该引物对组成,或由该引物对组成,该组由以下各项组成:(a) 与 SEQ ID NO:1 具有约 70% 到 100% 一致性的第一引物和与 SEQ ID NO:2 具有约 70% 到 100% 一致性的第二引物,(b) 与 SEQ ID NO:4 具有约 70% 到 100% 一致性的第一引物和与 SEQ ID NO:5 具有约 70% 到 100% 一致性的第二引物,(c) 与 SEQ ID NO:7 具有约 70% 到 100% 一致性的第一引物和与 SEQ ID NO:8 具有约 70% 到 100% 一致性的第二引物,(d) 与 SEQ ID NO:10 具有约 70% 到 100% 一致性的第一引物和与 SEQ ID NO:11 具有约 70% 到 100% 一致性的第二引物,(e) 与 SEQ ID NO:16 具有约 70% 到 100% 一致性的第一引物和与 SEQ ID NO:17 具有约 70% 到 100% 一致性的第二引物,(f) 与 SEQ ID NO:19 具有约 70% 到 100% 一致性的第一引物和与 SEQ ID NO:20 具有约 70% 到 100% 一致性的第二引物。根据权利要求 13 所述的引物组,包含选自下组的引物对,该组由以下各项组成:(a) 由 SEQ ID NO:1 组成的第一引物和与 SEQ ID NO:2 具有约 70% 到 100% 一致

性的第二引物,(b)由 SEQ ID NO:4 组成的第一引物和与 SEQ ID NO:5 具有约 70% 到 100% 一致性的第二引物,(c)由 SEQ ID NO:7 组成的第一引物和与 SEQ ID NO:8 具有约 70% 到 100% 一致性的第二引物,(d)由 SEQ ID NO:10 组成的第一引物和与 SEQ ID NO:11 具有约 70% 到 100% 一致性的第二引物,(e)由 SEQ ID NO:16 组成的第一引物和与 SEQ ID NO:17 具有约 70% 到 100% 一致性的第二引物,(f)由 SEQ ID NO:19 组成的第一引物和与 SEQ ID NO:20 具有约 70% 到 100% 一致性的第二引物。

[0023] 另一个方面,提供了一种用于检测 HPV16、18 和 / 或 45 的试剂盒,所述试剂盒包含对高风险 HPV 基因组的 E6/E7 区中的靶序列具有特异性的核酸引物或探针,其中:a. 所述核酸引物或探针在其整个长度上与该靶序列和其亚型的基因组的 E6/E7 区中的至少一个核酸序列两者具有 80% 或更大的一致性;并且 b. 所述核酸引物或探针不与来源于不同 HPV 类型的核酸杂交。

[0024] 在一个实施例中,该试剂盒包含至少一个核酸引物和至少一个核酸探针,主要由该至少一个引物和该至少一个探针组成,或由该至少一个和该至少一个探针组成,其中:(a)所述核酸引物包含与选自下组的序列具有约 70% 到 100% 一致性的序列,主要由该序列组成,或由该序列组成,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19 以及 SEQ ID NO:20 或其互补序列;并且(b)所述核酸探针包含与选自下组的序列具有约 70% 到 100% 一致性的序列,主要由该序列组成,或由该序列组成,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:18 以及 SEQ ID NO:21 或其互补序列。

[0025] 在一个实施例中,该试剂盒包含 HPV16 引物和探针组、HPV18 引物和探针组和 / 或 HPV45 引物和探针组,主要由这些引物和探针组组成,或由这些引物和探针组组成。

[0026] 在一个实施例中,(a)该 HPV16 引物和探针组包含:(i)与 SEQ ID NO:1 序列具有 70% 到 100% 一致性的引物,(ii)与 SEQ ID NO:2 序列具有 70% 到 100% 一致性的引物,以及(iii)与 SEQ ID NO:3 序列具有 70% 到 100% 一致性的探针;(b)该 HPV18 引物和探针组包含:(i)与 SEQ ID NO:4 序列具有 70% 到 100% 一致性的引物,(ii)与 SEQ ID NO:5 序列具有 70% 到 100% 一致性的引物,以及(iii)与 SEQ ID NO:6 序列具有 70% 到 100% 一致性的探针;并且(c)该 HPV45 引物和探针组包含:(i)与 SEQ ID NO:7 序列具有 70% 到 100% 一致性的引物,(ii)与 SEQ ID NO:8 序列具有 70% 到 100% 一致性的引物,以及(iii)与 SEQ ID NO:9 序列具有 70% 到 100% 一致性的探针。

[0027] 在一个实施例中,该试剂盒进一步包含对照引物和探针组。在一个实施例中,该对照引物和探针组包含(a)与 SEQ ID NO:16 序列具有 70% 到 100% 一致性的引物,(b)与 SEQ ID NO:17 序列具有 70% 到 100% 一致性的引物,以及(c)与 SEQ ID NO:18 序列具有 70% 到 100% 一致性的探针。

[0028] 另一个方面,提供了一种用于对高风险 HPV 进行基因型分型的方法,该方法包括:(a)使至少一个根据权利要求 1 所述的核酸引物或探针与第一高风险 HPV 基因组的 E6/E7 区中的靶序列的至少一部分杂交;并且(b)检测该核酸与该第一高风险 HPV 基因组的 E6/E7 区的杂交。

[0029] 在一个实施例中,该核酸引物或探针包含与选自下组的序列具有约 70% 到 100% 一

致性的序列,主要由该序列组成,或由该序列组成,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:1 到 SEQ ID NO:12 和 SEQ ID NO:16 到 SEQ ID NO:21,和 / 或其互补序列。

[0030] 在一个实施例中:(a)使核酸引物与该靶序列杂交;并且(b)通过包含进行扩增反应的方法检测杂交。

[0031] 在一个实施例中:(a)该高风险 HPV 是选自下组,该组由以下各项组成:HPV16、HPV18 以及 HPV45;并且(b)该扩增反应产生对应于该 HPV 基因组的 E6/E7 区的一部分的扩增子。

[0032] 根据权利要求 25 所述的方法,其中该核酸引物在其整个长度上与选自下组的核苷酸序列具有约 70%到 100%一致性,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:1;SEQ ID NO:2;SEQ ID NO:4;SEQ ID NO:5;SEQ ID NO:7;以及 SEQ ID NO:8 或其互补序列。

[0033] 根据权利要求 22 所述的方法,其中使核酸探针与该靶序列杂交,所述核酸探针任选地被可检测地标记。

[0034] 根据权利要求 22 所述的方法,其中所述方法是以一种实时多重 PCR 格式执行的。

[0035] 根据权利要求 28 所述的方法,其中所述方法能够区别 HPV16、HPV18 以及 HPV45 感染,所述方法包括:(a)提供怀疑包含高风险 HPV 的样品;(b)使该样品与以下各项接触:(i)能够扩增该 HPV16 基因组的 E6/E7 区的靶序列的一部分,但不扩增 HPV18 或 HPV45 基因组的 E6/E7 区的引物对;(ii)能够扩增该 HPV18 基因组的 E6/E7 区的靶序列的一部分,但不扩增 HPV16 或 HPV45 基因组的 E6/E7 区的引物对;(iii)能够扩增该 HPV45 基因组的 E6/E7 区的序列的一部分,但不扩增 HPV16 或 HPV18 基因组的 E6/E7 区的引物对;(iv)能够与该 HPV16 基因组的 E6/E7 区的序列的一部分杂交,但不与 HPV18 或 HPV45 基因组的 E6/E7 区杂交的被可检测地标记的核酸探针;(v)能够与该 HPV18 基因组的 E6/E7 区的序列的一部分杂交,但不与 HPV16 或 HPV45 基因组的 E6/E7 区杂交的被可检测地标记的核酸探针;以及(vi)能够与该 HPV45 基因组的 E6/E7 区的序列的一部分杂交,但不与 HPV16 或 HPV18 基因组的 E6/E7 区杂交的被可检测地标记的核酸探针,其中各核酸探针具有不同的可检测标记;(c)进行核酸扩增;并且(d)检测各可检测标记的存在或不存在。

[0036] 在另一个实施例中,该方法是在能够复制由凯杰(QIAGEN)的 Rotor-Gene PCR 仪器执行的方法的平台上执行的。

[0037] 在另一个实施例中,该方法不受 PreservCyt®(马萨诸塞州贝德福德市的豪洛捷公司(Hologic, Bedford, MA)) 和 SurePath™(马里兰州斯帕克斯市的百克顿-迪金森公司(Becton Dickinson, Sparks MD)) 存在或不存在的的影响。

[0038] 另一个方面,提供了一种组合物,包含与高风险 HPV 基因组的 E6/E7 区中的序列杂交的如在此所述的核酸引物或探针。

[0039] 在一个实施例中,该组合物包含选自下组的高风险 HPV 基因组,该组由以下各项组成:HPV16、HPV18 以及 HPV45。

[0040] 在另一个实施例中,该组合物包含引物或探针,该引物或探针包含与选自下组的序列具有 70%至 100%一致性的序列,主要由该序列组成,或由该序列组成,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:1 到 SEQ ID NO:12 和 SEQ ID NO:16 到 SEQ ID NO:21,和 / 或其互补序列。

[0041] 附图简要说明

- [0042] 图 1 示出了一个示例性 HPV 引物 / 探针组的分析敏感度。
- [0043] 图 2 示出了对于示例性引物 / 探针组的多重压制研究的结果。
- [0044] 图 3 示出了单重和多重两种检测分析中的示例性 HPV16 检测。
- [0045] 图 4 示出了单重和多重两种检测分析中的示例性 HPV16 检测。
- [0046] 图 5 示出了单重和多重两种检测分析中的示例性 HPV16 检测。
- [0047] 图 6 示出了在  $10^3$  个复本 / 反应和  $10^5$  个复本 / 反应下 HPV16 的示例性多重分析和特异性检测中的循环橙色 (ROX) 结果。
- [0048] 图 7 示出了在 HPV16 的示例性多重分析和检测中的循环橙色 (ROX) 结果 (CT 值)。
- [0049] 图 8 示出了在  $10^3$  个复本 / 反应和  $10^5$  个复本 / 反应下 HPV18 的示例性多重分析和特异性检测中的循环黄色 (HEX) 结果。
- [0050] 图 9 示出了在 HPV18 的示例性多重分析和检测中的循环黄色 (HEX) 结果 (CT 值)。
- [0051] 图 10 示出了在  $10^3$  个复本 / 反应和  $10^5$  个复本 / 反应下 HPV45 的示例性多重分析和特异性检测中的循环绿色 (FAM) 结果。
- [0052] 图 11 示出了在 HPV45 的示例性多重分析和检测中的循环橙色 (FAM) 结果 (CT 值)。
- [0053] 图 12 示出了在作为对照的  $\beta$ -球蛋白的示例性多重分析和特异性检测中的循环红色 (Cy5) 结果。
- [0054] 图 13 示出了在对照物  $\beta$ -球蛋白的示例性多重分析和检测中的循环橙色 (Cy5) 结果 (CT 值)。
- [0055] 图 14 示出了在 5、10、100 和  $10^3$  个复本 / 反应下 HPV16 的示例性多重分析和检测的结果。
- [0056] 图 15 示出了在不同复本 / 反应下 HPV16 的示例性多重分析和检测中的循环橙色 (ROX) 结果 (CT 值)。
- [0057] 图 16 示出了在 5、10、100 和  $10^3$  个复本 / 反应下 HPV18 的示例性多重分析和检测的结果。
- [0058] 图 17 示出了在不同复本 / 反应下 HPV18 的示例性多重分析和检测中的循环黄色 (HEX) 结果 (CT 值)。
- [0059] 图 18 示出了在 5、10、100 和  $10^3$  个复本 / 反应下 HPV45 的示例性多重分析和检测的结果。
- [0060] 图 19 示出了在不同复本 / 反应下 HPV45 的示例性多重分析和检测中的循环绿色 (FAM) 结果 (CT 值)。
- [0061] 详细描述
- [0062] 本披露包括用于快速地确定在一个样品中一个核酸分子的存在和用于 定量该靶核酸分子的方法、组合物、试剂、系统和试剂盒。这些方法、组合物、试剂、系统和试剂盒可用于临床诊断目的, 和 / 或用于表征在基因型水平的 HPV 病毒续存、病毒负荷的动力学和 / 或疾病复发的可能性。
- [0063] 根据本发明的方法、组合物、试剂、系统和试剂盒提供用于对如 16、18 和 / 或 45 的 HPV 类型进行基因型分型和 / 或定量的初始测试或后续测试的一种有效测试。举例来说, 方法包括测试未测试样品、验证阳性样品中 HPV16、18 和 / 或 45 的存在和 / 或对这些 HPV 进行定量, 以及验证阴性样品中 HPV16、18 和 / 或 45 的不存在。

[0064] 由于 HPV 病毒负荷已经与例如宫颈癌的疾病进展相关联,所以 HPV 病毒负荷可以是侵入性癌瘤的一个类型依赖性风险标志。因此,方法包括对病毒负荷进行定量和分类以便诊断癌症的风险,和病人筛选分类(triage),包括确定治疗方法的优先级等。

[0065] 本发明的方法还包括筛查样品的 L1 缺失 / 突变,因为 E6 和 E7 在某些情况下是用于确定存在或不存在特异性 HPV 类型的靶向区域。

[0066] 当与对如 16、18 和 / 或 45 的 HPV 类型的典型的单独测试 / 基因型分型比较时,本发明的多重设计节约了时间和样品洗出液。

#### [0067] 引物和探针

[0068] 本发明的引物和探针能够靶向 HPV 基因型 16、18 和 45 的 E6 和 E7 区中的基因。E6 和 E7 区是合适的靶区,因为它们不像 L1 区那样在整合期间易于发生诱变事件。引物和探针对 HPV16、18 和 45 具有特异性并且在本身之中或在其他 HPV 类型之中不显示任何实质的交叉反应性。在检测 HPV16、18 或 45 的存在时在存在至少 5 个靶序列复本 / 反应的情况下,引物和探针可能是敏感的。

[0069] 在实施例中,这些引物可能为从约 15 到 50 个核苷酸的长度,如从约 18 到 30 个,约 20 到 26 个,或约 22 到 24 个核苷酸。举例来说但不加以限制,这些引物可能不超过 50 个核苷酸的长度、不超过 30 个核苷酸的长度、不超过 26 个核苷酸的长度或不超过 24 个核苷酸的长度。这些探针可能为从约 15 到约 60 个核苷酸的长度,如从约 18 到 40 个,约 20 到 35 个,或约 22 到 30 个。举例来说但不加以限制,这些探针可能不超过 60 个核苷酸的长度、不超过 40 个核苷酸的长度、不超过 35 个核苷酸的长度或不超过 30 个核苷酸的长度。

[0070] 在以下表格中针对 HPV 类型 16、18 和 45 中的每一种展示示例性引物和探针。对于类型 45,显示了两个引物和探针组,其中组 1 (SEQ ID NO7-9) 是用于多重分析的优选实施例。在以下表格中,探针序列在 5' 末端结合有一个信号并且在 3' 末端结合有一个淬灭剂。这些分子显示如下(粗体并且加下划线),但它们不是由对应的 SEQ ID NO 表示的核酸序列的一部分。

[0071] 表 1-HPV16 引物 / 探针组 :

[0072]

HPV 16 引物 A	SEQ ID NO. 1	5' AGA ACC GGA CAG AGC CCA TTA CAA 3'
HPV 16 引物 B	SEQ ID NO. 2	5' GCA CAC AAT TCC TAG TGT GCC CAT 3'
HPC 16 探针	SEQ ID NO. 3	5' <b><u>ROX-AC</u></b> GCT TCG GTT GTG CGT ACA AAG <b><u>CA-IAbRQSp</u></b> 3'

[0073] 表 2-HPV18 引物 / 探针组 :

[0074]

HPV 18 引物 A	SEQ ID NO. 4	5' TCA TCA ACA TTT ACC AGC CCG ACG 3'
HPV 18 引物 B	SEQ ID NO. 5	5' GAA ACA GCT GCT GGA ATG CTC GAA 3'
HPC 18 探针	SEQ ID NO. 6	5' <u>HEX</u> -AGC CGA ACC ACA ACG TCA CAC AAT GT- <u>IABkFQ</u> 3'

[0075] 表 3-HPV45 引物 / 探针组 1 :

[0076]

HPV 45 引物 A	SEQ ID NO. 7	5' TTG ACG ATC CAA AGC AAC GAC CCT 3'
HPV 45 引物 B	SEQ ID NO. 8	5' CCT CTG TGC GTT CCA ATG TTG CTT 3'
HPV 45 探针 1	SEQ ID NO. 9	5' <u>FAM</u> -ACA AGC TAC CAG ATT TGT GCA CAG AAT TGA- <u>IABkFQ</u> 3'

[0077] 表 4-HPV45 引物 / 探针组 2 :

[0078]

HPV 45 引物 C	SEQ ID NO. 10	5' TTG TTAATAAGG TGC CTG CGG TGC 3'
HPV 45 引物 D	SEQ ID NO. 11	5' TGT TTC CCT ACG TCT GCG AAG TCT 3'
HPC 45 探针 2	SEQ ID NO. 12	5' <u>FAM</u> -ATA CAT GTT GTG ACC AGG CAC GGC AA/ <u>3IABkFQ</u> / 3'

[0079] 在一些实施例中,可以与以上引物和探针组一起使用对照物,举例来说,β-球蛋白引物和探针组可以与具有第四可检测信号的多重系统一起使用。可以使用任何合适的对照物,只要该对照物不干扰以上示例的引物和探针组的检测和定量。以下引物和探针组可以用作对照物,其中组 1 是多重分析所优选的。

[0080] 表 5-β-球蛋白引物 / 探针组 1 :

[0081]

β 球蛋白引物 A	SEQ ID NO. 16	5' GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC 3'
β 球蛋白引物 B	SEQ ID NO. 17	5' CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC 3'
β 球蛋白探针 1	SEQ ID NO. 18	5' CCC TAG GGT TGG CCA ATC TAC TC- <u>IABkFQ</u> 3'

[0082] 表 6-β-球蛋白引物 / 探针组 2 :

[0083]

β 球蛋白引物 C	SEQ ID NO. 19	5' ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC 3'
β 球蛋白引物 D	SEQ ID NO. 20	5' CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC 3'
β 球蛋白探针 2	SEQ ID NO. 21	5' TCA AAC AGA CAC CAT GGT GCA TCT GAC TCC-IABkFQ 3'

[0084] 引物和探针还可以包括与不同的引物和探针具有约 70% 到 100% 一致性和 / 或同源性的那些引物和探针, 如 75% 或更大、80% 或更大、85% 或更大、90% 或更大、95% 或更大和 / 或 98% 或更大一致性和 / 或同源性。举例来说但不加以限制, 该引物和 / 或探针可以与选自下组的序列具有从 70% 到 100% 的一致性和 / 或同源性, 该组由以下各项组成: SEQ ID NO:1 到 SEQ ID NO:12 和 SEQ ID NO:16 到 SEQ ID NO:21。作为另一个实例, 该探针可以与选自下组的序列具有 75% 或更大、80% 或更大、85% 或更大、90% 或更大、95% 或更大和 / 或 98% 或更大一致性和 / 或同源性, 该组由以下各项组成: SEQ ID NO:1 到 SEQ ID NO:12 和 SEQ ID NO:16 到 SEQ ID NO:21。

[0085] 在一个实施例中, 将包含能够与 SEQ ID NO:13 的核苷酸 695 到 719 或其互补序列杂交的 3' 端序列的核酸用作 HPV16E6/E7 特异性引物。举例来说但不加以限制, 该 3' 端序列包含与 SEQ ID NO:13 的核苷酸 695 到 719 或其互补序列具有 70% 或更大、75% 或更大、80% 或更大、85% 或更大、90% 或更大、95% 或更大和 / 或 98% 或更大一致性和 / 或同源性的序列或由该序列组成。作为另一个实例, 该 HPV16E6/E7 特异性引物由与 SEQ ID NO:13 的核苷酸 695 到 719 或其互补序列具有 70% 或更大、75% 或更大、80% 或更大、85% 或更大、90% 或更大、95% 或更大和 / 或 98% 或更大一致性和 / 或同源性的序列组成。

[0086] 在另一个实施例中, 将包含能够与 SEQ ID NO. 13 的核苷酸 811 到 834 或其互补序列杂交的 3' 端序列的核酸用作 HPV16E6/E7 特异性引物。举例来说但不加以限制, 该 3' 端序列包含与 SEQ ID NO:13 的核苷酸 811 到 834 或其互补序列具有 70% 或更大、75% 或更大、80% 或更大、85% 或更大、90% 或更大、95% 或更大和 / 或 98% 或更大一致性和 / 或同源性的序列或由该序列组成。作为另一个实例, 该 HPV16E6/E7 特异性引物由与 SEQ ID NO:13 的核苷酸 811 到 834 或其互补序列具有 70% 或更大、75% 或更大、80% 或更大、85% 或更大、90% 或更大、95% 或更大和 / 或 98% 或更大一致性和 / 或同源性的序列组成。

[0087] 在另一个实施例中, 将能够与 SEQ ID NO. 13 的核苷酸 751 到 775 或其互补序列杂交的探针用作探针。举例来说但不加以限制, 该探针包含与 SEQ ID NO. 13 的核苷酸 751 到 775 或其互补序列具有 70% 或更大、75% 或更大、80% 或更大、85% 或更大、90% 或更大、95% 或更大和 / 或 98% 或更大一致性和 / 或同源性的序列或由该序列组成。

[0088] 在另一个实施例中, 提供了包含以下各项的 HPV16E6/E7 特异性引物组: (a) 包含能够与 SEQ ID NO:13 的核苷酸 695 到 719 的互补序列杂交的 3' 端序列的第一引物; 和 (b) 包含能够与 SEQ ID NO. 13 的核苷酸 811 到 834 杂交的 3' 端序列的第二引物。

[0089] 在另一个实施例中, 提供了包含以下各项的 HPV16E6/E7 特异性引物 / 探针组: (a) 包含能够与 SEQ ID NO:13 的核苷酸 695 到 719 的互补序列杂交的 3' 端序列的第一引物; (b) 包含能够与 SEQ ID NO. 13 的核苷酸 811 到 834 杂交的 3' 端序列的第二引物; 以及

(c) 能够与 SEQ ID NO. 13 的核苷酸 751 到 775 或其互补序列杂交的探针。

[0090] 在一个实施例中,将包含能够与 SEQ ID NO:14 的核苷酸 724 到 747 或其互补序列杂交的 3' 端序列的核酸用作 HPV18E6/E7 特异性引物。举例来说但不加以限制,该 3' 端序列包含与 SEQ ID NO:14 的核苷酸 724 到 747 或其互补序列具有 70% 或更大、75% 或更大、80% 或更大、85% 或更大、90% 或更大、95% 或更大和 / 或 98% 或更大一致性和 / 或同源性的序列或由该序列组成。作为另一个实例,该 HPV18E6/E7 特异性引物由与 SEQ ID NO:14 的核苷酸 724 到 747 或其互补序列具有 70% 或更大、75% 或更大、80% 或更大、85% 或更大、90% 或更大、95% 或更大和 / 或 98% 或更大一致性和 / 或同源性的序列组成。

[0091] 在另一个实施例中,将包含能够与 SEQ ID NO:14 的核苷酸 837 到 860 或其互补序列杂交的 3' 端序列的核酸用作 HPV18E6/E7 特异性引物。举例来说但不加以限制,该 3' 端序列包含与 SEQ ID NO. 14 的核苷酸 837 到 860 或其互补序列具有 70% 或更大、75% 或更大、80% 或更大、85% 或更大、90% 或更大、95% 或更大和 / 或 98% 或更大一致性和 / 或同源性的序列或由该序列组成。作为另一个实例,该 HPV18E6/E7 特异性引物由与 SEQ ID NO. 14 的核苷酸 837 到 860 或其互补序列具有 70% 或更大、75% 或更大、80% 或更大、85% 或更大、90% 或更大、95% 或更大和 / 或 98% 或更大一致性和 / 或同源性的序列组成。

[0092] 在另一个实施例中,将能够与 SEQ ID NO. 14 的核苷酸 748 到 773 或其互补序列杂交的探针用作探针。举例来说但不加以限制,该探针包含与 SEQ ID NO. 14 的核苷酸 837 到 860 或其互补序列具有 70% 或更大、75% 或更大、80% 或更大、85% 或更大、90% 或更大、95% 或更大和 / 或 98% 或更大一致性和 / 或同源性的序列或由该序列组成。

[0093] 在另一个实施例中,提供了包含以下各项的 HPV18E6/E7 特异性引物组:(a) 包含能够与 SEQ ID NO:14 的核苷酸 724 到 747 的互补序列杂交的 3' 端序列的第一引物;和(b) 包含能够与 SEQ ID NO. 14 的核苷酸 837 到 860 杂交的 3' 端序列的第二引物。

[0094] 在另一个实施例中,提供了包含以下各项的 HPV18E6/E7 特异性引物组:(a) 包含能够与 SEQ ID NO:14 的核苷酸 724 到 747 的互补序列杂交的 3' 端序列的第一引物;(b) 包含能够与 SEQ ID NO. 14 的核苷酸 837 到 860 杂交的 3' 端序列的第二引物;以及(c) 能够与 SEQ ID NO. 14 的核苷酸 748 到 773 或其互补序列杂交的探针。

[0095] 在一个实施例中,将包含能够与 SEQ ID NO:15 的核苷酸 112 到 135 或其互补序列杂交的 3' 端序列的核酸用作 HPV45E6/E7 特异性引物。举例来说但不加以限制,该 3' 端序列包含与 SEQ ID NO:15 的核苷酸 112 到 135 或其互补序列具有 70% 或更大、75% 或更大、80% 或更大、85% 或更大、90% 或更大、95% 或更大和 / 或 98% 或更大一致性和 / 或同源性的序列或由该序列组成。作为另一个实例,该 HPV45E6/E7 特异性引物由与 SEQ ID NO:15 的核苷酸 112 到 135 或其互补序列具有 70% 或更大、75% 或更大、80% 或更大、85% 或更大、90% 或更大、95% 或更大和 / 或 98% 或更大一致性和 / 或同源性的序列组成。

[0096] 在另一个实施例中,将包含能够与 SEQ ID NO:15 的核苷酸 208 到 231 或其互补序列杂交的 3' 端序列的核酸用作 HPV45E6/E7 特异性引物。举例来说但不加以限制,该 3' 端序列包含与 SEQ ID NO. 15 的核苷酸 208 到 231 或其互补序列具有 70% 或更大、75% 或更大、80% 或更大、85% 或更大、90% 或更大、95% 或更大和 / 或 98% 或更大一致性和 / 或同源性的序列或由该序列组成。作为另一个实例,该 HPV45E6/E7 特异性引物由与 SEQ ID NO. 15 的核苷酸 208 到 231 或其互补序列具有 70% 或更大、75% 或更大、80% 或更大、85% 或更大、90%



或更大、95%或更大和 / 或 98%或更大一致性和 / 或同源性的序列组成。

[0097] 在另一个实施例中,将能够与 SEQ ID NO. 15 的核苷酸 136 到 165 或其互补序列杂交的探针用作探针。举例来说但不加以限制,该探针包含与 SEQ ID NO. 15 的核苷酸 136 到 165 或其互补序列具有 70%或更大、75%或更大、80%或更大、85%或更大、90%或更大、95%或更大和 / 或 98%或更大一致性和 / 或同源性的序列或由该序列组成。

[0098] 在另一个实施例中,提供了包含以下各项的 HPV45E6/E7 特异性引物组:(a) 包含能够与 SEQ ID NO:15 的核苷酸 112 到 135 的互补序列杂交的 3'端序列的第一引物;和(b) 包含能够与 SEQ ID NO. 15 的核苷酸 208 到 231 杂交的 3'端序列的第二引物。

[0099] 在另一个实施例中,提供了包含以下各项的 HPV45E6/E7 特异性引物组:(a) 包含能够与 SEQ ID NO:15 的核苷酸 112 到 135 的互补序列杂交的 3'端序列的第一引物;(b) 包含能够与 SEQ ID NO. 15 的核苷酸 208 到 231 杂交的 3'端序列的第二引物;以及(c) 能够与 SEQ ID NO. 15 的核苷酸 136 到 165 或其互补序列杂交的探针。

[0100] 在一个实施例中,将包含能够与 SEQ ID NO:15 的核苷酸 402 到 425 或其互补序列杂交的 3'端序列的核酸用作 HPV45E6/E7 特异性引物。举例来说但不加以限制,该 3'端序列包含与 SEQ ID NO:15 的核苷酸 402 到 425 或其互补序列具有 70%或更大、75%或更大、80%或更大、85%或更大、90%或更大、95%或更大和 / 或 98%或更大一致性和 / 或同源性的序列或由该序列组成。作为另一个实例,该 HPV45E6/E7 特异性引物由与 SEQ ID NO:15 的核苷酸 402 到 425 或其互补序列具有 70%或更大、75%或更大、80%或更大、85%或更大、90%或更大、95%或更大和 / 或 98%或更大一致性和 / 或同源性的序列组成。

[0101] 在另一个实施例中,将包含能够与 SEQ ID NO:15 的核苷酸 546 到 569 或其互补序列杂交的 3'端序列的核酸用作 HPV45E6/E7 特异性引物。举例来说但不加以限制,该 3'端序列包含与 SEQ ID NO. 15 的核苷酸 546 到 569 或其互补序列具有 70%或更大、75%或更大、80%或更大、85%或更大、90%或更大、95%或更大和 / 或 98%或更大一致性和 / 或同源性的序列或由该序列组成。作为另一个实例,该 HPV45E6/E7 特异性引物由与 SEQ ID NO. 15 的核苷酸 546 到 569 或其互补序列具有 70%或更大、75%或更大、80%或更大、85%或更大、90%或更大、95%或更大和 / 或 98%或更大一致性和 / 或同源性的序列组成。

[0102] 在另一个实施例中,将能够与 SEQ ID NO. 15 的核苷酸 517 到 542 或其互补序列杂交的探针用作探针。举例来说但不加以限制,该探针包含与 SEQ ID NO. 15 的核苷酸 517 到 542 或其互补序列具有 70%或更大、75%或更大、80%或更大、85%或更大、90%或更大、95%或更大和 / 或 98%或更大一致性和 / 或同源性的序列或由该序列组成。

[0103] 在另一个实施例中,提供了包含以下各项的 HPV45E6/E7 特异性引物组:(a) 包含能够与 SEQ ID NO:15 的核苷酸 402 到 425 的互补序列杂交的 3'端序列的第一引物;和(b) 包含能够与 SEQ ID NO. 15 的核苷酸 546 到 569 杂交的 3'端序列的第二引物。

[0104] 在另一个实施例中,提供了包含以下各项的 HPV45E6/E7 特异性引物组:(a) 包含能够与 SEQ ID NO:15 的核苷酸 402 到 425 的互补序列杂交的 3'端序列的第一引物;(b) 包含能够与 SEQ ID NO. 15 的核苷酸 546 到 569 杂交的 3'端序列的第二引物;以及(c) 能够与 SEQ ID NO. 15 的核苷酸 517 到 542 或其互补序列杂交的探针。

[0105] 如在此所用,短语“HPV16E6/E7 特异性引物”、“HPV18E6/E7 特异性引物”以及“HPV45E6/E7 特异性引物”是指能够介导指定 HPV 类型的基因组的 E6/E7 区的一部分的扩

增,但不能够介导不同 HPV 类型的基因组的 E6/E7 区的一部分的扩增的核酸引物。

[0106] 在一个实施例中,这些探针被设计为包括适合于待测试的基因型的独立检测的可检测信号,如放射性、生物素或荧光信号。可以使用任何合适的可检测信号,例如,可以用 ROX (一种橙色荧光分子) 标记 HPV16 ;可以用 HEX (一种黄色荧光分子) 标记 HPV18 ;可以用 FAM (一种绿色荧光分子) 标记 HPV45 ;并且可以用 Cy5 (一种红色荧光分子) 标记对照物  $\beta$ - 球蛋白。在实施例中,如以上表格中所示,这些探针可以是塔克曼 (TaqMan) 探针,具有共价附接到该探针的 5' 末端的一个荧光团和附接于该探针的 3' 末端的一个淬灭剂。当该荧光团和淬灭剂接近时,任何荧光被该淬灭剂抑制。然而,当 Taq 聚合酶延伸该引物时,该探针被该聚合酶的外切核酸酶活性降解,从而使荧光团免受该淬灭剂的淬灭活性。可以使用任何合适的标记物和淬灭剂的组合。

[0107] 在另一个实施例中,利用该探针来产生用于杂交捕获法中的 DNA:RNA 杂交物。杂交捕获技术在纯化和检测一个样品中的特异性靶核酸的不同方法中利用某些能够结合到 DNA:RNA 杂交物的抗体。杂交捕获方法的不同反复尤其描述在美国专利号 5,994,079、6,027,897、6,277,579、6,686,151 以及 7,439,016 ;美国专利公开号 2006/0051809A1、2009/0162851A1 以及 2009-0298187A1 ;以及 PCT 公开号 W001/96608 中,这些专利和公开书中的每一个都通过引用以其全文结合在此。基本的杂交捕获方案包含:(1) 使核酸探针与靶核酸杂交以产生一个 DNA:RNA 杂交物;(2) 将该 DNA:RNA 杂交物与固相联合以促进该靶核酸的分离;并且(3) 检测该 DNA:RNA 杂交物。在不同反复中,可在步骤(2) 或步骤(3) 中使用抗 DNA:RNA 杂交物抗体。举例来说但不加以限制,该抗 DNA:RNA 杂交物抗体可以结合到该固相(共价地或以其他方式),从而介导该 DNA:RNA 杂交物被“捕获”到该固相。可替代地,结合到该固相(共价地或以其他方式)的核酸探针可以将该 DNA:RNA 杂交物捕获到该固相,随后它可以被经可检测地标记的抗 DNA:RNA 杂交物抗体检测到。

#### [0108] 试样制备

[0109] 可以使用任何合适的试样制备方法。当这些方法是用于验证或定量阳性或阴性结果时,可以使用已经纯化的试样的一个样品。当这些方法是用于进行 HPV16、18 和 / 或 45 的初始测定 / 定量时,可以使用任何合适的样品纯化方法来纯化试样。

#### [0110] PCR 设备和条件

[0111] 可以使用能够进行实时 PCR 分析的任何合适的 PCR 设备和条件来扩增并检测标靶 PCR 产物。在实施例中,可以使用由凯杰制造的 Rotor-Gene Q。

#### [0112] 实例

[0113] 以单重实时 PCR 评估 HPV16 引物 / 探针组 (SEQ ID NO. 1-3)、HPV18 引物 / 探针组 (SEQ ID NO. 4-6) 以及 HPV45 引物探针组 1 (SEQ ID NO. 7-9)。在洁净系统中在  $1E+7$  复本 / 分析下使用质体来测试针对高风险 (HR) 和低风险 (LR) 两种 HPV 类型的分析特异性。测试了 HPV 类型 6、11、16、18、26、31、33、35、39、40、42、43、45、51、52、53、56、58、59、61、66、67、68、69、71、72、73、81、82、2、3、13、30、34、44、70 以及 83。结果显示这些引物 / 探针组对于 HPV16、18 以及 45 对应地具有特异性。

[0114] 还针对可能的干扰物质,即血液、避孕胶冻、杀精子剂、保湿剂、痔麻醉剂、身体油、抗真菌乳膏、阴道润滑剂以及女性喷雾剂测试这些引物 / 探针组。结果显示这些物质不干扰这些引物 / 探针组的特异性。

[0115] 还根据 FDA 建议针对 16 种非 HPV 病原体测试这些引物 / 探针组。

[0116] 通过 BLAST 分析验证 HPV16 引物 / 探针组、HPV18 引物 / 探针组以及 HPV45 引物探针组 1。将这些序列与 NCBI 数据库中的所有相关粘膜 HPV 类型和 HPV16、18 以及 45 的所有已知亚型相比较。HPV16、18 以及 45 的已知亚型都不产生大于 10% 的错配。所有已知亚型具有大于 90% 的同源性。表 7 中展示与 HPV16、18 以及 45 引物和探针具有大于 80% 同源性的序列。

[0117] 表 7- 与 HPV16、18 以及 45 引物和探针具有大于 80% 同源性的序列

[0118]

序列	HPV 类型	BLAST (HPV 类型)	% 一致性
正向引物	16	31	86.36
正向引物	18	97	87.5
正向引物	18	45	83.33
正向引物	45	59	81.82
正向引物	45	37	80.95
反向引物	16	73	91.67
反向引物	16	35	87.5
反向引物	16	67	86.96

[0119]

反向引物	16	43	86.96
反向引物	16	32	86.36
反向引物	16	34	83.33
反向引物	16	7	83.33
反向引物	16	11	86.36
反向引物	16	42	86.36
反向引物	16	71	81.82
反向引物	16	91	81.82
反向引物	18	59	90.48
反向引物	18	45	82.61
反向引物	18	67	80.95
反向引物	45	97	91.67
反向引物	45	110	85.71
探针	18	45	91.67
探针	18	97	91.67
探针	18	68	90.48
探针	18	80	86.36
探针	18	113	86.36
探针	45	18	86.67
探针	45	97	86.67
探针	45	16	91.3

[0120] 样品制备

[0121] 使用改进的 QIAamp Media MDx 试剂盒 (一种呈柱格式的基于硅胶吸收的可商购的核酸提取和纯化技术) 来纯化样品。取决于试样类型针对标准方案的改进步骤显示于以下表 8 中。

[0122] 表 8- 取决于试样类型的改进方案

[0123]

试样类型	输入样品体积	针对标准方案的改进步骤	洗提体积
样品输送培养基 (STM)	100 $\mu$ L 或 150 $\mu$ L 变性的	变性试样 $\rightarrow$ 添加 50 $\mu$ L MES 中和缓冲液	100 $\mu$ L
PreservCyt <sup>®</sup>	250 $\mu$ L+	离心 $\rightarrow$ 倾析 $\rightarrow$ 添加 200 $\mu$ L STM	100 $\mu$ L
SurePath <sup>™</sup>	梯度前或稀释样品: 500 $\mu$ L; 梯度后 (来自 3 mL 总样品体积): 300 $\mu$ L	离心 $\rightarrow$ 倾析 $\rightarrow$ 添加 200 $\mu$ L 100 mM pH 值为 8 (或 9) 的 Tris 缓冲液 $\rightarrow$ 在 56 $^{\circ}$ C 下伴以在 600 RPM 下振荡将蛋白酶 K 孵育延长到一小时	100 $\mu$ L

[0124] 实时 PCR 方法

[0125] 随后将经纯化的样品与 HPV16 引物 / 探针组、HPV18 引物 / 探针组和 HPV45 引物探针组 1 以及  $\beta$ -球蛋白探针 / 引物组 1 一起使用。PCR 方法的混合物和条件显示在以下表 9 中。

[0126] 表 9-PCR 混合物和循环条件

[0127]

PCR 混合物	
总反应体积	25 $\mu$ L
模板	5 $\mu$ L
HPV 引物	200 nM
HPV 探针	200 nM
$\beta$ -球蛋白 IC 引物	60 nM
$\beta$ -球蛋白 IC 探针	60 nM
QIAGEN QT 病毒母混合物 (5 $\times$ )	1 $\times$
Rotor-Gene Q 条件	
变性	95 $^{\circ}$ C 持续 5 分钟
退火	95 $^{\circ}$ C 持续 15 秒
延伸	60 $^{\circ}$ C 持续 75 秒
循环	45

[0128] 分析敏感度: 使用质体模型确定每个 HPV16、18 以及 45 多重引物 / 探针组的动态范围。该动态范围经确定为至少 6 个数量级。如在图 1 中所示, 对于 HPV16、18 以及 45 从  $10^7$  到 10 个基因组复本 / 分析一致地获得  $\geq 0.97$  的相关系数 ( $R^2$  值) 和  $\geq .97$  的 PCR 效率。发现在单重分析检测 and 多重分析检测之间每个 HPV 引物 / 探针的 Ct 值和 LOD 是类似的。

[0129] 分析特异性: 以多重形式在每个 HPV 类型质粒  $1 \times 10^7$  个复本 / 分析下测试每个引物 / 探针针对 27HR 和 LR HPV 类型的特异性。结果显示在以下表 10 和 11 中。

[0130] 表 10: 针对 HR HPV 类型的分析特异性

[0131]

HR HPV 标靶	HPV 探针类型		
	16	18	45
16	阳性	阴性	阴性
18	阴性	阳性	阴性
26	阴性	阴性	阴性
31	阴性	阴性	阴性
33	阴性	阴性	阴性
35	阴性	阴性	阴性
39	阴性	阴性	阴性
45	阴性	*阴性	阳性

[0132]

51	阴性	阴性	阴性
52	阴性	阴性	阴性
56	阴性	阴性	阴性
58	阴性	阴性	阴性
59	阴性	阴性	阴性
66	阴性	阴性	阴性
68	阴性	阴性	阴性
71	阴性	阴性	阴性
72	阴性	阴性	阴性
73	阴性	阴性	阴性
82	阴性	阴性	阴性

[0133] \*HPV18 引物和探针以  $\geq 40$  的 Ct 值和  $\geq 5$  个复本 / 分析的检测不一致地检测到  $10^7$  个 HPV45 标靶输入。

[0134] 表 11 : 针对 LR HPV 类型的分析特异性

[0135]

LR HPV标靶	HPV探针类型		
	16	18	45
6	阴性	阴性	阴性
11	阴性	阴性	阴性
40	阴性	阴性	阴性
42	阴性	阴性	阴性
43	阴性	阴性	阴性
2	阴性	阴性	阳性
3	阴性	阴性	阴性
13	阴性	阴性	阴性
44	阴性	阴性	阴性
53	阴性	阴性	阴性
67	阴性	阴性	阴性
69	阴性	阴性	阴性
70	阴性	阴性	阴性
83	阴性	阴性	阴性
30	阴性	阴性	阴性
34	阴性	阴性	阴性
61	阴性	阴性	阴性
81	阴性	阴性	阴性

[0136] 分析特异性 - 多重压制/抑制:为进一步测试多重分析的特异性,从 10 个复本到  $10^7$  个复本将 HPV16、18 以及 45 稀释 10 倍。在每个 HPV 类型  $10^7$  个复本/分析下在 HPV16、18 或 45+HPV39、43、67 以及 83 的质粒池中测试这些稀释物。如在图 2 中所示,对标靶 HPV 类型中的每一种的分析特异性的压制最小。

[0137] 临床样品性能:以多重分析格式测试自 STM、PC 以及 SP 培养基中经 HC2 筛查并经 GP PCR/LMX 基因型分型的超过 1000 个宫颈试样。GP PCR 结果显示在以下表 12-14 中。

[0138] 表 12-GP PCR 的 STM 试样结果

[0139]

试样	HR (+)	LR (+)
STM8517	16	40
STM8545	16、52	阴性
STM8585	16、18	阴性
STM8697	16、68	阴性
STM8643	16、31	13、32、69、86、89、90、6
STM16	16	10、40
STM112	16、45	40、86、87
STM8215	16	阴性
STM8790	16	81

STM8705	16	阴性
STM8525	45	40
STM8550	31	90

[0140] 表 13-GP PCR 的 PC 试样结果

[0141]

试样	HR (+)	LR (+)
PC5635	16、31	74、90
PC56181	16	70
PC56360	16、39	30、72
PC56603	16	阴性
PC56209	16、39	阴性
PC56567	18、16	40、62、74、81
PC56434	16	10、13、32、62、90
PC56533	16、68	阴性
PC53802	16	40
PC54075	16、18	67、89
PC54076	16	89、6

[0142] 表 14-GP PCR 的 SP 试样结果

[0143]

SP10462	16	阴性
SP10556	16、52	阴性

[0144]

SP10583	16、82	阴性
SP10596	16	阴性
SP10505	16、66	阴性
SP10605	16	阴性
SP10472	16	阴性
SP10481	16、18	阴性
SP10606	16	6
SP10693	16	42
SP10704	16、51、56	阴性

[0145] 图 3-5 示出了针对不同样品类型在单重和多重分析中的 HPV16 检测的若干实例。

[0146] 已经以多重和单重形式测试了约 500 个样品。这些测试在基因型分型试样对于标靶 HPV 类型(16、18 以及 45)呈阳性或阴性方面显示类似的结果。

[0147] 使用如例如美国专利号 6, 352, 825 中所述的 GP5+/6+LMX 基因型分型对具有多重 HPV 感染的临床样品进行基因型分型, 该专利的全部披露通过引用结合于此。使用约 25  $\mu$ L 的样品, 使用针对 HPV16、18 以及 45 的引物和探针组来检测 HPV16、18 以及 45 的存在或不存在。结果汇总于下表 15 中。

[0148] 表 15- 具有多重感染的临床样品的实例

[0149]

		Gp 5+/6+ LMX 基因型分型				qPCR, 约 25 $\mu$ L 反应物的复本数		
培养盘来源	培养基类型	样品编号	HR 1	HR 2	HR 3	HPV 16	HPV 18	HPV 45
112409AM 护理 HPV 培养盘 1	DCM	5567	16	18	39	1.21E+05	1.70E+05	
101909AM DCM 样品	DCM	229	16	45		1.01E+05		6.31E+04
101909AM DCM 样品	DCM	239	16	18	56	3.89E+04	6.20E+03	
101909AM DCM 样品	DCM	313	16	45		3.70E+03		1.00E+02
101909AM DCM 样品	DCM	373	18	39	45		1.50E+02	2.50E+01
91109AM 培养盘 2	DCM	338	16	18	51	2.11E+04	2.66E+04	
010710AM ShubingPC	PC	11253	16	18		2.45E+02	2.06E+03	
113009AM 培养盘 1	PC	25136	16	18		1.50E+01	3.50E+01	

[0150]

110409AM 培养盘 1 Surepath	SP	6502	18	35	45		1.80E+03	2.99E+05
011210AM PL1 海地 (Haiti) STM	STM	5567	16	18	39	1.08E+04	6.28E+03	
011410AM PL2 海地 STM	STM	5941	16	18		3.10E+03	4.20E+01	
011410AM PL2 海地 STM	STM	6615	16	18	52	7.50E+01	2.70E+01	
011210AM PL1 海地 STM	STM	6710	16	45		2.40E+04		1.26E+04
042610AM 海地 STM	STM	7336	16	45		3.41E+02		4.23E+03
莫雷利亚 (Morelia)	PC	1-0138	16	45		1.22E+04		2.25E+03

[0151] 4重分析:将针对  $\beta$ -球蛋白的引物和探针作为内部对照物连同针对 HPV16、18 以及 45 的引物 / 探针组一起使用。使用 4 重引物和探针运行不同样品。这些样品汇总于下表 16 中。

[0152] 表 16- 以 4 重形式运行以测试特异性的样品

[0153]



样品
无模板对照物(NTC) = 水
在 $10^3$ c/rxn 和 $10^5$ c/rxn 下的 HPV16 质粒
在 $10^3$ c/rxn 和 $10^5$ c/rxn 下的 HPV18 质粒
在 $10^3$ c/rxn 和 $10^5$ c/rxn 下的 HPV45 质粒
在 52ng/rxn 和 525ng/rxn 下的人基因组 DNA
阴性临床池
阴性临床池 + $10^3$ 个复本 /rxn 的 HPV16 质粒掺入物 (spike)
阴性临床池 + $10^3$ 个复本 /rxn 的 HPV18 质粒掺入物
阴性临床池 + $10^3$ 个复本 /rxn 的 HPV45 质粒掺入物

[0154] 运行这些样品的结果展示在图 6-13 中。这些分析证实：

[0155] ● 橙色通道仅对含有被 ROX 探针检测到的 HPV16DNA 的样品具有特异性；

[0156] ● 黄色通道仅对含有被 HEX 探针检测到的 HPV18DNA 的样品具有特异性；

[0157] ● 绿色通道仅对含有被 FAM 探针检测到的 HPV45DNA 的样品具有特异性；

[0158] ● 红色通道仅对被 Cy5 探针检测到的阴性临床背景 +/-HPV16、18 或 45 质粒具有特异性；

[0159] 因此，证实了每个通道对在包括这些内部对照引物和探针的多重格式中的所选择的荧光团的特异性。

[0160] 除特异性以外，4 重分析还证实了在检测 HPV16、18 和 / 或 45 的存在方面的敏感度。使用这些 4 重引物和探针运行表 17 中所列的以下样品。

[0161] 表 17- 以 4 重形式运行以测试敏感度的样品

[0162]

样品
NTC= 水
在 5、10、100、 $10^3$ c/rxn 下的 HPV16 质粒
在 5、10、100、 $10^3$ c/rxn 下的 HPV18 质粒
在 5、10、100、 $10^3$ c/rxn 下的 HPV45 质粒

[0163] 将这些样品稀释物中的每一种掺入到阴性临床洗出液池中。运行这些样品的结果展示在图 14-19 中。这些引物 / 探针组中的每一个展示敏感度，在 HPV 阴性临床背景存在下，在至少 5 个复本 / 反应的水平下是可检测到的。

[0164] 样品测序：

[0165] 在以上测试的众多样品中，对 34 个样品（17 个多重阳性样品和 17 个多重阴性样品）进行测序。所有样品测序与多重数据匹配，因此提供多重分析的特异性、敏感度以及精确性的进一步验证。

[0166] 应了解以上所披露的以及其他不同的特征和功能或其替代形式可以理想地组合到许多其他不同系统或应用中。同样，其中不同的目前未预见或未预期的替代形式、修改、变化或改进可以随后由本领域的普通技术人员作出，并且也预期被以下权利要求书所涵盖。

[0001]

## 序列表

<110> Rangwala, Sameera  
 Kobayashi, Lori  
 Gay, Tanya

<120> 用于对高风险人乳头瘤病毒进行基因型分型和定量的材料和方法

<130> 2912943-076001

<150> 61/430,797  
 <151> 2011-01-07

<160> 21

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> per 引物

<400> 1  
 agaaccggac agsgcccaatt acaa 24

<210> 2  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> per 引物

<400> 2  
 gcacacaatt cctagtgtgc cca 24

<210> 3  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> per 探针

<400> 3  
 acgcttcggt tgtcgtaca aagca 25

<210> 4  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> per 引物

<400> 4  
 tcatcaacat ttaccagccc gacg 24

<210> 5  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> per 引物

<400> 5  
 gaaacagctg ctggaatgct cgaa 24

<210> 6  
 <211> 26  
 <212> DNA

[0002]

<213> 人工序列	
<220>	
<223> per 探针	
<400> 6	
agccgaacca caacgtcaca caatgt	26
<210> 7	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> per 引物	
<400> 7	
ttagcagatcc aaagcaacga cccct	24
<210> 8	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> per 引物	
<400> 8	
ccctctgigcg ticcacatggt gccct	24
<210> 9	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> per 探针	
<400> 9	
acaagctacc agatttgigc acagaattga	30
<210> 10	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> per 引物	
<400> 10	
tgttaataa ggigcctgcg gtcgc	24
<210> 11	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> per 引物	
<400> 11	
tgtttccctca cgtctgcaa gctct	24
<210> 12	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> per 探针	
<400> 12	
atcacatgttg tgaccaggca cggcaa	26

[0003]

```

<210> 13
<211> 7904
<212> DNA
<213> 人乳头瘤病毒型 16 (Human papillomavirus type 16)

<400> 13
actacaataa ttcattgata aaaciaaggg cgtaccgan atcggitgaa cggaaaccgg      60
ttagtataaa agcagacatt ttatgcacca aaagagaact gcaatgittc aggaccaca      120
ggagcagccc agaaagtac cacagttaig cacagagcig caaacaacta tacatgatat      180
aatattagaa tgttgtaact gcaagcaaca gttaactgca cgtgaggat atgactttgc      240
ttttcgggat ttatgcatag tataagaga tgggaatcca tatgctgat gtagataatg      300
tttaaagtit tattctaaaa ttatgagta tagacattat tgttatagtt tgiatggaac      360
aacattagaa cagcaataca acaaacggtt gtgtgatttg ttaattaggt gtattaactg      420
tcaaaagcca ctgtgtctcg aagaaaagca aagacatcig gacaaaaagc aaagattcca      480
taataaagg ggicggfaga cggctgatg taigtcttgi tgcagatcat caagaacacg      540
tagagaaacc cagctgtaai catgcatgga gatacaccia catlgaatga atatagtta      600
gatttgaac cagagacaac tgaictotac tgttatgagc aattaaatga cagctcagag      660
gaggaggatg aaatagatgg tccagctgga caagcagaac cggacagagc ccattacaat      720
attgtaacct ttgttgcaa gtgtgactct acgcttcggt tgtgctgaca aagcacacac      780
gtagacattc gtaatttga agacctgita atgggcacac taggaatgtt gtagcccatc      840
tgttctcaga aaccataatc taccatggct gatcctgcag gtaccaatgg ggaagagggt      900
acgggatgta atggatggtt ttatgtatag cctgtatggt aaaaaaaaac aggggatgct      960
ataicagatg acgagaacga aaatgacagt gatacaggig aagatttggg agattitafa      1020
glaaatgata atgattatit aacacaggca gaaacagaga cagcacaatc gttgtttact      1080
gcacaggaag caaacaaca tagagatgca gtacaggctc taaaacgaaa gtatttggta      1140
gtccacttag tgatattagt ggatgtgtag acaataatat tagtcctaga ttaaaagcta      1200
tatgtataga aaaaacaagt agagctgcaa aaaggagatt atttgaagc gaagacagcg      1260
ggatgtgcaa tactgaagig gaaactcagc agatgttaca ggtagaaggg cgccatgaga      1320
ctgaaacacc atgtatgtag tatagtggig gaagtggggg tggitgcagt cagtacagta      1380
giggaaagg gggagagggt gtiagigaaa gacacactat atgccaaaca ccactiaca      1440
atattttaa tgtactaaaa actagtaatg caaaggcagc aatgtatgca aaattttaa      1500
agttataceg ggtagtttiti cagaaitag taagaccat taaaagtat aaatcaactg      1560
gttgcgattg gtgtatgct gcaattggac ttacaccag tatagctgac agtataaaaa      1620
cactaitaca acaatattgt ttatatttac acattcaag ttiagcagt tcatggggaa      1680
tggttgtgt acfattagta agatataaat gtggaaaaaa tagagaanca attgaaaaat      1740
tgcctgctaa actattatgt gtgtctccaa tgtgtatgat gatagagcct ccaaaatgc      1800
gtagtacagc agcagcatta tattggtata aacagggtat atcaaatatt agtgaaggtg      1860
atggagacac gccagaatgg atacaagac aaacagtatt acaacatagt ttaaatgatt      1920
gtacatttga attatcacag atggtacaaat ggcctacga taatgacata gttagcgata      1980
gtgaaattgc atataaatat gcacaattgg cagacactaa tagtaatgca atgtcccttc      2040
taaaaagtaa ttacaggca aaaaatgtaa aggatgtgac aacaaigtgt agacattata      2100
aacgagcaga aaaaaaaca atgagiatga gtcaatggat aaaatataga tgtgataggg      2160
tagatgatgg aggtgattgg aagcaaatg ttatgtttit aaggtatcaa ggtgtatggt      2220

```

[0004]

ttaigtcaif ttiaactgca ttaaaaagat ttiigcaagg catacctaaa aaaaatigca	2280
tattactata tgggtcagct aacacaggta aatcattatt tgglatgagt ttaatgaaat	2340
ttctgcaagg gtcigtata tgittigtta attctaaaag ccattitigg ttacaacct	2400
tagcagaigc caaaataggi afgtiagatg atgctacagt gccctigtgg aactacatag	2460
atgacaattt aagaatgca ttggatggaa atttagttic latggaigta aageatagac	2520
catitgtaca actaaaaigc cctccattat taattacac taacattaat gcigtgtacag	2580
attctaggig gccctattta cataatagat tggfngtgit tacatttccet aatgagtttc	2640
catttgacga aaacggaaat ccagigtatg agcttaatga taagaacigg aaatcctttt	2700
tctcaaggac gttgtccaga ttaagtttgc acgaggacga ggacaaggaa aacgatggag	2760
actctttgcc aacgtttaaa tgtgtgtcag gacaaaatc taacacatta tgaanaatgat	2820
agtacagacc tacgtgacca tatagactat tggaaacaca tgcgcctaga atgtgtatt	2880
tattacaagg ccagagaaat gggattttaa catattaac accaagtigt gccaacactg	2940
gctglatcaa agaataaagc attacaagca atlgaactgc aactaacgtt agaacaata	3000
tataactcac aatatagtaa tgaanaagtg acattacaag acgttagcct tgaagtgtat	3060
ttaacigcac caacaggatg tataaaaaaa catggataia cagtggaaat gcagtttgat	3120
ggagacatat gcaatacaat gcattatata aactggacac atatatat tttgtaagaa	3180
gcatacagtaa ctgtgtgtaga gggtaagtt gactattatg gttatatta igttaigaa	3240
ggaatcagaa catattttgt gcagttttaa gatgatgcag aaaaatatag taaaaataa	3300
gtatgggaag tcatgcggg tggtcaggta atattatgtc ctacatcigt gtttagcagc	3360
aacgaagiat cctctcctga aattattagg cagcaacttg ccaaccacc cgcgcgacc	3420
cataccaaag ccgtgcctt gggcacgaa gaaacacaga cgaactacca gcgaccaaga	3480
tcagagccag acaccggaaa cccctgccac accaciaagt tgttcacag agactcagtg	3540
gacagtgctc caatcctcac tgcattaac agctcacaca aaggacggat taactgtaat	3600
agtaacacta cacccatagt acatttaaa ggtgatgcta aacttttaa atgtttiaaga	3660
tatagattta aaaagcattg tacattgtat actgcagigt cgtctacatg gcattggaca	3720
ggacataatg taaaacataa aagtgcaatt gttacactta catatgatag tgaatggcaa	3780
cgtgaccaat ttttgcctca agtlaaaa ccaaaaacta ttacagtgic tactggaitt	3840
atgtctat t gacaaactt galactgcat ccacaacat actggcgtgc ttttgcctt	3900
gctttgtgtg cttttgtgtg tctgcctatt aatacgtccg ctgctttgt ctgtgtctac	3960
atacacatca ttaataat tggtafact atttggata acagcagcct ctgcgtttag	4020
gtgtttatt gtatatatta tatttgitta tataccatta ttttaaac atacacatgc	4080
acgttttia atfacataat gtatgttac ataatgtaat tgttacata atttgtgta	4140
taccataact tactatitit tctttttat ttcatatat aattttttt ttgtttgtt	4200
tgtttgttt ttaataaact gttattactt aacaatgca cacaaactgt ctgcaaaacg	4260
cacaaactgt gcatcgcta cccaacttia taaaacatgc aaacaggcag gtacatgtcc	4320
acctgacat atacctaaagg tgaaggcaa aactatigt gaacaaat tacaalatgg	4380
aagtatgggt gtatititit gttgtttagg aattggaaca gggctgggta caggcggacg	4440
cactgggtat atccatitg gaacaaggcc tcccacagct acagatcac ttgtctctgt	4500
aagacccct ttaacagtag atcctgtggg ccctctgat cctctatag tttctttagt	4560
ggaagaaact agttttatg atgctgtgc accaactct gtaccttca tccccaga	4620

[0005]

tgatcagga ttiagtaita ctacitcaac tgataccaca ccigctaiat tagataitaa	4680
taalaetgtt actactgita ctacacataa laaleccact ttcactgacc catctgtatt	4740
gcagcctcca acacctgcag aaactggagg gcattttaca ctitcatcat ccactatag	4800
tacacataat taigaagaa ttcctatgga tacattitatt gtiagcacia accctaacac	4860
agtaactagt agcacacca laeccaggtc tcgccagig gcacgctag gattatitag	4920
tcgcacaaca caacaggita aagtigtaga cctgtctttt gtaaccactc ccactaaact	4980
tattacatat gataatcctg catatgaagg tatagatgig gataatacat tataatttcc	5040
tagtaatgat aatagtaita atatagctcc agatcctgac tttttggata tagttgcttt	5100
acataggcca gcattaaact ctaggcgtac tggcattagg tacagttaga ttggtaata	5160
acaaacacta cgtactccta gtggaaaac tataggtgct aaggtaactt attattatga	5220
tttaagtact attgatcctg cagaagaaat agaattaca actataacac ctctacata	5280
faciaccact tcacatgcag cctcacctac ttctatiant aatggaiat atgataitfa	5340
tgcagatgac ttattacag atacttctac aaccccgga ccaicctgac cctctacac	5400
tttatcaggt tatattcctg caaatacaac aattcctttt gggtgtcat acaatattcc	5460
tttagiatca ggtcctgata taccattaa tataactgac caagctcctt cattaattcc	5520
tatagttcca ggtctccac aatatacaat tattgctgat gcaggtagct tttatttaca	5580
tctagttaa tacatgttac gaaaacgac taaactgita coataitttt ittcagatgt	5640
ctctttggct ccttagtgag gccactgct acttgctcc tgtcccagta tctaaagttg	5700
taagcacgga tgaatagtt gcaacgcaa acatatatta tcatgcagga acatccagac	5760
facitgcagt tggacatccc taitttcta ttaaaaaacc taacaataac aaaatattag	5820
ttcctaaagt atcaggaita caatcacagg tattttagaat acatttacct gacccaata	5880
agittggttt tcttgacacc tcatittata atccagatac acagcggctg gttgggctt	5940
gtgtagggtt tgaggtaggt cgtggctcgc cattagggtt gggcattagt ggccatcctt	6000
tattaaataa atiggatgac acagaaaat ctagtcttfa tgcagcaat gcagggtgg	6060
ataatagaga atgtatact atggattaca acaaacaca atigtgtta atgggtgca	6120
aaccacctat aggggaacac tggggcaag gatcccactg taccaatgtt gcagtaaatc	6180
caggtaattg tccaccatfa gagtaataa acacagtta tccagatggt gatagggtc	6240
atactggctt tgggtctatg gactttacta cattacaggc taacaaaagt gaagtccac	6300
tggatattg tacatctatt tgcataatc cagattatat taaaatggig tcagaacct	6360
atggcgacag cttaattttt tatttacgaa gggaacaaat gttgttaga catitaita	6420
atagggctgg tactgttggg gaaaatgtac cagacgatt atacattaaa ggctctgggt	6480
ctactgcaa ttiagccagt tcaaatatt ttctacacc tagtggttct atggttacct	6540
ctgatccca aatattcaat aaaccttatt ggttacaacg agcacagggc cacaataatg	6600
gcattttgtg gggtaaccaa ctatttgita ctgttgtga taciacaacg agtacaata	6660
tgtcattatg tcttgccata tctacttcag aaactacata taaaataact aacttiaagg	6720
agfacctacg acatggggag gaatatgatt tacngttat ttitcaactg tgcataata	6780
ctttaactgc agactttatg acatatac atctatgaa ttccactatt ttggaggact	6840
ggaattttgg tctacaacct cccccaggag gcacactaga agalactiat aggtttgtaa	6900
cccaggcaat tctttgtcaa aaacatacac ctccagcacc taaagaagat gatcccctta	6960
aaaatacac tttttggaa gtaaatitaa agaaaagtt ttctgcagac ctgatcagt	7020

[0006]

ttccittagg acgcaaatit ttactacaag caggattgaa gcccacaaca aaaittacat 7080  
 taggaaaacg aaaagciaca cccaccacai calciaccie lacaacigci aaacgcaaaa 7140  
 aacgtaagct gtaagtattg taigtatggt gaattagigt tgtttgtgt gtatatgttt 7200  
 gtaigtgctt gtaigtgcti gtaaatatia agttgtatgt gtgtttgtat gtaigtata 7260  
 aaaaacacgt ggtiatgtgt ttttaaatgc ttgigtact atigtgicat gcaacataaa 7320  
 taaacttatt gtccaacac ctactaatig tgtttgtgt aticattgia tataaactat 7380  
 atttgcata tccigttttt gttttatata tactatatt tgiagegcca ggccatttt 7440  
 gtagcttcaa ccgaattcgg ttgcaigcti ttggcaca aaigtgttt ttttaatagt 7500  
 tctatgtcag caaciatggt ttaacttgt acgtttccg ctigccatgc gtgcaaaac 7560  
 cctgttttcc tgacctgac tgcctgcca ccattccatt gttttttaca ctgcactatg 7620  
 tgcaactact gaacaciat gtacattgig tcatataaaa taaticacta tgcgccaacg 7680  
 cottacatac cgcigttagg cacatatttt tggcttggt taactaacct aatgcatat 7740  
 ttggcataag gtttaactt ctaaggcca cfaaatgca ccttagtca tacaatgaact 7800  
 gigttaaggt tagtcatata ttgttcatit gtaaacicgc acatgggtgt gtcgcaaccg 7860  
 attttgggtt acacatttac aagcaactia tataataata ctac 7904

<210> 14  
 <211> 7857  
 <212> DNA  
 <213> 人乳头瘤病毒型 18

<400> 14  
 attaataact itaacaattg tagtataaa aaaagggagt aaccgaaaac ggicgggacc 60  
 gaaaacggig tataaaaag atgigagaaa cacaccaca tactatggcg cgtttgagg 120  
 atccaacacg cgcacctac aagctacctg atctgtgac ggaactaac acttacctgc 180  
 aagacataga aataacctgt gtatatgca agacagtatt ggaacttaca gaggialttg 240  
 aatttgcat taaagattia ttgtgtgtgt atagagacag tataccgcat gctgcatgcc 300  
 ataanatgt agattttat tctagnatia gaganatia acattattca gactctgtgt 360  
 atggagacac attgaaaaa ctaactaaca ctgggttata caatttata ataagggtcc 420  
 tgcggtgcca gaaaccgtt aaiccagcag aaaaacttag acacctaat gaaaaacgac 480  
 gatttcaaa catagctggg cactatagag gccagtcca ttctgtctgc aaccgagcag 540  
 gacaggaacg acccaacga cgcagagaaa cacaagtata atattangia tgcattgacc 600  
 taaggcaaca ttgcaagaca ttgtattgca tttagagccc caaatgaaa ttccggttga 660  
 cottctatgt cagagcaat taagcgactc agaggaagaa aacgatgaaa tagatggagt 720  
 taatcatcaa cattaccag cccgacgagc cgaaccacaa cgtcacaca tigtgtgtat 780  
 ggttgttaag tgtgaagcca gaattgagct agtagtagaa agctcagcag acgaccttcg 840  
 agcattccag cagctgttcc tgaacacctt gtccittgtg tctccgtgtt gtcctccca 900  
 gcagtaagca acaatggctg atccagaagg tacagacggg gagggcacgg gttgtaacgg 960  
 ctggttttat gtacaagcta tttagacaa aaaaacagga gatgtaaat cagaatgacga 1020  
 ggacgaaaa gcaacagaca cagggtcggg tatgttagat ttatttgata cacaaggaac 1080  
 attttgtgaa caggcagagc tagagacagc acaggcattg ttccatgccc aggaggtcca 1140  
 caatgatgca caagtgtgc atgtttttaa acgaaagttt gcaggagcca gcacagaaaa 1200  
 cagtccatta ggggagcggc tggaggtgga tacagagtta agtccacggt tacaagaaat 1260

[0007]

alcitfaaat aglgggcaga aaaaggcaaa aaggcggcig ttiacaatai cagatagigg	1320
ctatggctgt tcigaagigg aagcaacaca gattcaggia actacaaatg gcgaacaigg	1380
cggcaatgfa tgiatggcgg gcagiacgga ggctatagac aacgggggca cagagggcaa	1440
caacagcagf gtagacggia caagtgacaa tagcaataia gaaaatgiaa atccacaatg	1500
taccatagca caattaaaag acttggtiaa agtaaacat aaacaaggag ctatgttagc	1560
agtatitaaa gacacataig ggctatcaii tacagatita gtagaaatit itaaaagiga	1620
taaaaccacg tftacagatt gggftacagc tatafttggg glaaacccaa caatagcaga	1680
aggattitaa acactaatac agccatttat attatagcc catatitcaat gcttagactg	1740
taaatgggga gtatitaaia tagccctgii gcgtiacaia tgggtaaga gtagactaac	1800
agttgctaaa ggtitaaagta cgttgttaca cgtacctgaa actigtatgt taattcaacc	1860
accaaaatig cgaagtagtg ttgcagcact atattggtat agaacaggaa tatcaaatat	1920
tagtgaagia atgggagaca caccigagtg gatacaaga ctitactaita tacaacatgg	1980
aatagatgat agcaattitg atttgcaga aatggtaaaa tgggcattig ataatgagct	2040
gacagatgaa agcgatagc cattigaata tgccttatta gcagacagca acagcaatgc	2100
agctgccitf ttaaaaagca atigccaagc taatattia aaagattigt ccacaatgig	2160
caacatitaf agggagccc aaaaacgaca aatgaatag tcacagtggg tacgatttag	2220
aigtcaaaa atagatgaag ggggagatig gagaccaia giccaatcc tgcgatacca	2280
acaaaagag ttiataacat ttttaggagc cttaaatca tttitaaaag gaaccccaa	2340
aaaaattgt ttagtatiti gttgaccagc aaatacagga aatcatatit ttggaatgag	2400
ttttatcac tttatacaag gaccagiatf atcatttggg aatccacta gtcatttttg	2460
gttggaaacc ttaacagata ctaagggtgc catgttagat gatgcaacga ccaagigtig	2520
gacatactit gatacctata tgagaaatgc gttagaiggc aatccaataa gtattgatag	2580
aaagcacaia ccattiaatac aactaaaatg tcttccaata ctactaacca caaatataca	2640
tccagcaaa gataatagat ggccatattt agaaagtaga ataacagiat ttgaatttcc	2700
aaatgcaitt ccattigata aaaaiggcaa tccagiatat gaaataaatg acaaaaatig	2760
gaaatgttit ttgaaagga catggfccag attagattig cagcaggaag aggaagatgc	2820
agacaccgaa ggaaccccti tccgaacggt taagtgcggt gcaggacaaa atcatagacc	2880
actatgaaaa igacagtaaa gacatagaca gccaaataca gtattggcaa ctaatacgtt	2940
gggaaaatgc aatattcitt gcagcaaggg aacatggcat acagacaita aaccaccagg	3000
tgtgtccagc ctataacatt tcaaaaagta aagcacataa agctattgaa ctgcaaatgg	3060
ccctacaagg ccitgcacaa agtgcataca aaaccgagga tggacactg caagacacai	3120
gcgaggaact atggaatata gaacciaact actgcittaa aaaagggtggc caaacagiac	3180
aagtatattt tgaatggcaac aaagacaatt gtaigacctt tgiagcaatg gacagigtgt	3240
attatatgac tgaatgcagga acatgggaca aaaccgctac ctigttaagt cacaggggat	3300
tgtattatgt aaaggaaggg tacaacacgt tttatitaga attitaaaag gaatgigaaa	3360
aataigggaa cacaggtaac tgggaagtae attttgggaa taalgiaatf gatgtiaatg	3420
actctatgtg cagtaaccgt gacgacacgg tatccgctac tcagcttgtt aaacagctac	3480
agcacacccc ctcaccgtat tccagcaccg tgtccgtggg caccgcaaaag acctaccgcc	3540
agacgtcggc tgcfacacga cctggacact gttgactcgc ggagaagcag caatgtggac	3600
ctgtcaacc ccttctcgtg gcagctacac ctacaggcaa caacaaaaga cggaaactct	3660

[0008]



```

gtagtggtaa cactacgctt ataatacatt taaaaggiga cagaacacagt itaaaatggt 3720
tacggiaacag atlgecaaaa calagcgacc aciatagaga lataicaicc acciggecatt 3780
ggacagggtgc aggcaatgaa aaaacaggaa tactgactgt aacataccat agtgaaacac 3840
aangaacaaa atttttaaact actgttgcaa ttccagatag tgiacaaata ttgggtggat 3900
acatgacaat gtaatacata tgcgttagta ccaatatgtt atcaacttatt tttttatttt 3960
gcttttfgt atgcatgtat gtgtgcgtcc atgtcccgct ttgcccactt gtcgtiatgt 4020
gtgcgtatgc atgggtatlg gtatttgggt atatttgggt aataacgicc ccigccacag 4080
caitcacagt atatgtattt tgttttttat tgcctatgtt aciatgcat atacatgcta 4140
tattgcttt acagtaatlg tataggttgt ttatcacagt gtattgtaca ttgtatattt 4200
tgttttatac cttttatgct ttttgtattt ttgtaataaa agtatgggat cccaccgtgc 4260
cgcacgacgc aaacgggctt cggtaaciga cttatataaa acatgtaaac aatcgtgtac 4320
atgtccacct gatgttggtc ctaaggigga gggcaccacg ttagcagata aaatatigca 4380
atggtaaac cttgtatata ttttgggigg acttggcata ggiactgca gtggiaacag 4440
gggtcgtaca ggttacatc catigggigg gcgttccaat acagiggigg atgttggtec 4500
tacacgtccc ccagtggta ttgaacctgt gggccccaca gaccatcta ttgttacatt 4560
aatagaggac tccagtgtg ttacatcagg tgcacctagg cciaacgita ctggcaegtc 4620
tgggtttgat ataacatctg cgggtacaac tacacctgcg gtttggata tcacaccttc 4680
gtctacctct gtgtctattt ccacaacaa ttttaccat cctgcatitt ctgatccgtc 4740
cattatigaa gtccacaaa ctggggagggt ggcagglaat gtatttgtg gtacccctac 4800
atctggaaca catgggtatg aggaaatacc tttaacaa ca ttgcttctt ctgttacggg 4860
ggaggaaccc attagtagta cccattgccc tactgtgcgg cgtgtagcag gtccccct 4920
ttacagttagg gcttaccaac aaggtcaggt ggcataacct gatttctta cactccate 4980
ctcttaatt acatagaca acccggcctt ttagcctgtg gacactacat taacattga 5040
tccctgtagt gatgttctg attcagattt tatgtatatt atccgtctac ataggcctgc 5100
tttaacatcc aggcgtggga ctgttgcctt tagtagatta ggtcaacggg caactatgtt 5160
taccgcagc ggtacacaaa taggtgtag ggttcacitt tatcatgata taagtcetat 5220
tgcaccttcc ccagaatata ttgaactgca gccttagta tctgccacgg aggacaatga 5280
ctgtttgat atatatgag atgacatgga cctgtcagtg cctglacct cgcgttctac 5340
tacctcttt gcattttita aatattgcc cactatctct tctgctcttt cctatagtaa 5400
tgiacggtc ccttiaacct cctctggga tgtcctgta tacacgggtc ctgataaac 5460
attaccatct actacctctg tatgcccct tgtatcacc acggccccctg cctctacaca 5520
gtataatggt atacatgta cacattata ttgtggcca ttatattait ttattctaa 5580
gaaacgtaaa cgtgttccct attttttgc agatggcttt gtggcggcct agtgacaata 5640
ccgtatctct tccacctctt tctgtggcaa gatttataaa taccgatgat tatgtgaccc 5700
gcacaagcat atttatcat cctggcagct ctgattatt aactgttgggt aatccatatt 5760
ttagggttcc tgcaggttgt ggcaataage aggatattcc taaggttctt gataccaat 5820
atagagtatt taggtgtcag ttaccigacc caaataaait tggttacct gatactagta 5880
tttataatcc tgaacacaaa cgtttagigt gggccctgtc tggagtgaa atggccogig 5940
gtcagccttt aggtgttgc cttagtgggc atccatttta taataaatta gatgacacig 6000
aaagtccca tgcgccacg tctaagtitt ctgaggacgt tagggacaat gtgtctgtag 6060

```

[0009]

attataagca gacacagtia igtatitigg gctgtgcccc igtatitggg gaacacitggg 6120  
 ctaaaggcac tgccttataa tccgctcctt taccacaggg cgaatgcccc ccittagaac 6180  
 ttaaaaacac agttttggaa gatggtgata igttagatac igtatitggg gccatggact 6240  
 ttagtacatt gcaagatact aaatgtgagg taccatigga tatttgcag tctatitgta 6300  
 aatatacota ttatttaca atgtctcag atccttatgg ggatccaatg ttttttggc 6360  
 tacggcgiga gcagcttttt gctaggcatt ttgggaatag agcaggtacl atgggigaca 6420  
 cgtgacctca atccttata attaaaggca caggtaicgc igtctacact ggcagctgg 6480  
 igtattccc cctccaagt ggcctatig ttaccctga ctcccagtg tttaataaac 6540  
 catattggtt acataaggca cagggtcata acantgggtg ttgctggcat aatcaattat 6600  
 ttgtactgt ggtagatacc actcgcagta ccaatitac aatitgigt tctacacagt 6660  
 ctctgtacc tggcaatg gatctacca aatttaagca gtatagcaga caigtigagg 6720  
 aatagattt gcagttatt ttccagtgt gtactatc tttaactga gaigtatgt 6780  
 cctatatca tagtatgat agcagtatt tagaggatg gaactttggt gtccccccc 6840  
 cgccaactac tagttggg gatataatc gtttggta atctgtgct atacctgic 6900  
 aaaaggatgc tgcaccgct gaaaataagg atccctatga taagttaag ttitggaatg 6960  
 tggatttaa ggaaaagttt ctctagact tagatcaata icccctigga cgtaaaattt 7020  
 tggctcagc tggattgct cgcaagcccc ccataggccc tgcacaact tctgtccat 7080  
 ctgccactac gtctctaaa cctgccaac gtgtgctgt acgtgccagg aagtaataig 7140  
 tgtgtgtgta tataatata catctatgt tgtgttga igtctgtgt ttgtgtgt 7200  
 tgtatgatt cattgtatg tatgtatgt tgtgttga igtgtatgt tactatatt 7260  
 gttgtatgt ggcattaaat aaaatattt ttgtgttct gtgtgtatg tggttgcgc 7320  
 ctagttagta acaactgat ttgtttgt ggtatgggtg ttgtttgt ggtatata 7380  
 tgtctgtat ttaagtatt aaaactgcac acctacagc atccattta tctacaatc 7440  
 ctccatttg ctgtcaacc gatttgggtt gctttgggt tatgtctgt gtttctgca 7500  
 caatacagta cgttggcact attgcaact ttaactttt gggcactgt cctacatatt 7560  
 ttaacaatt ggcgcgcctc ttggcgcctc ataaggcgc cctgttata gtcatttcc 7620  
 tgtccagggt cgtacaaca attgcttga taactatac cactccctaa gtaataaac 7680  
 tgttttagg cacatattt agttgttt tacttaaget aatgcatac ttggcttga 7740  
 caactactt catgtcaac attctgtc ccttaacat gaactataat atgactaagc 7800  
 tgtcataca tagttatgc aaccgaaata gttgggcag cacatactat actttc 7857

<210> 15  
 <211> 7858  
 <212> DNA  
 <213> 人乳头瘤病毒型 45

<400> 15  
 aatactttta acaattatc tacataaaaa aggggtgtaac cgaaacggg tgcaccaaa 60  
 aacgggtgat aaaaaagctt igtggaaaag tgcattacag gatggcgcgc ttgacgac 120  
 caaagcaac accctacaag ctaccagatt tgtgcacaga atgaaatac tcaactacaag 180  
 acgtatctat tgcctgtgta tattgcaag caacatigga acgcacagag giatatcaat 240  
 ttgcttttaa agattatgt atagtgtata gagactgtat agcatatgct gcatgccata 300  
 aatgtataga cttttatcc agaattagag aattaagata ttattcaaac tctgtatag 360  
 gagagacact ggaaaaata actaatacag agttgtataa ttigttaata aggtgcctgc 420

[0010]

ggigccagaa accattgaac ccagcagaaa aacgtagaca cctlaaggac aaacgaagat	480
ttcacagcat agctggacag taccgagggc agtgaatac atgtttgtac caggcacggc	540
aagaaagact tgcagacgt agggaaacac aagtatagca ataagtaigc atggaccccg	600
ggaaacactg caagaaatig taitgcattt ggaacctcag aatgaatlag atcctgttga	660
cctgtttgtt tacgagcaat taagcagatc agaggaggaa aacgatgaag cagatggagi	720
tagtcatgca caactaccag cccgacgagc cgaaccacag cgtcacaaaa ttttgggtgt	780
atgtttgtaag tgtgacggca gaattgagct tacagtagag agctcggcag aggaccttag	840
aacactacag cagctgtttt tgagcacctt gtccittgtg tctccgttgg gtgcaactaa	900
ccaataatct acaatggggc atccagaagg taccgacggg gagggaacgg ggigtatgg	960
ctgtttcttt gtagaacaaa ttgtagagaa aaaaacaggg gatgtaatat cagatgatga	1020
ggatgaaact gcaacagata cagggctgga tatggtagat tttatigaca cacaattatc	1080
caitttgtaa caggcagagc aagagacagc acaggcatig ticcattgctc aggaagitca	1140
gaatgatgca cagggttgc atctttttaa acgaaagtll gcaggaggca gcaaggaaaa	1200
cagtcactta ggggagcagc taagtgtgga tacggaicta agtccacggt tacaagaaat	1260
ttcattaaat agtgggcaca aaaaagcaaa acgacggttg tttaacaat cagatagtgg	1320
ctatgctgtt tctgaagtgg aagctgcaga gactcaggta actgtaaaca ctaatgcgga	1380
aaatggcggc agtgcacata gtacacaaag tagtgggtgg gatagtagtg acaatgcaga	1440
aaatgtagat ccgcatgca gtattacaga actaaaggag ctattacaag caagtaacaa	1500
aaaggtgca atgctggcag tatttaaaga catatattgg ctgtcattta cggatttgg	1560
tagaaatit aaaagtgata aaacaacatg tacagattgg gtaatggcta tatttggagi	1620
taatccaacg gtagcagaag gcittaaaac attaattaa ccagcaacgt tatacggcca	1680
taiccaatgt ttgatgtga aaiggggagt attaatatta gcittattaa gatataaatg	1740
tggcaaaaat agactaactg ttgcaaaagg ctttaagcaca ttgttgcaag tacctgaaac	1800
atgtagtga atigaaccac caaaattgac aagttagtgt gcagcattat actggatag	1860
aacaggtata tccaatatta gtgaagtaag tggagacaca cctgagtgga tacaagact	1920
gacaattatt caacatgga ttgacgatag taattttgat ttgtcagaca tggtgcaatg	1980
ggcatttgal aatgacctta cagatgaaag tgatagggca ttccaatag cccaattagc	2040
agactgcaac agtaatgagc ctgcattitl aaaaagiaac tgccaagcca aatattttaa	2100
agattgtgct gtaatgtgta gacattataa aagagcaca aaacgcaaaa tgaatatgtc	2160
tcaatggatt aaatagat gtccaaaaat agatgaaggf ggggattgga gacctatgt	2220
acaattccta agatattcagg gactagaatt tattagcttt ttaagggcac taaaggaaat	2280
tcttaaagga acaccaaaaa aaaattgtat actgttatat ggacctgca atacaggaaa	2340
atcgtatitl ggaatgagtt ttatcattt cctacaaggf gcaataaat catitgtaa	2400
ttcaaacagc catttttggg tagaacggtt agcagatact aaggtagcca tgitggatga	2460
tgccacacac acgtgttggc catatitga taattataig agaaatgat tagatggtaa	2520
tcttanaat atagacagaa agcaiaaacc attaitacag ctanaatgtc ctccaatct	2580
attaacatcc aatatgatc cagcaaaaga taataaatgg ccaatitlag aaagtagggt	2640
gacggtatit acatttccac atgcaittcc atttgataaa aatggiaaic cagiatatga	2700
aataaatgat aaaaattgga aatgtttttt tgaaggaca tggccagat tagatttga	2760
cgaggacgat gaagatgag acaccgaagg aatcccttic ggaacgitta agtgcgttac	2820

[0011]

aggacaaa	actagaccac	taigaaaatg	acagtaaaga	cafaaacagc	caaataagti	2880
attggcaact	tatacgtttg	gaaaatgcaa	tactatttac	agcaagggaa	catgggtatta	2940
ccaaactaaa	ccaccaggtg	gtgccctccta	ttaacatttc	aaaaagcaaa	gcacataaag	3000
ctattgaact	gcaaatggcc	ttanagggcc	ttgcacaaaag	caagtataac	aatgaggaat	3060
ggacactgca	agatcacatgc	gaggaactat	ggaatacaga	accgtcgcag	tgittiaaaa	3120
aaggcggtaa	aaccgtgca	gtatactttg	atggcaacaa	ggacaacigt	atgaactatg	3180
tagtatggga	cagtataat	tataatactg	agacagggat	atgggacaaa	acagcagcat	3240
gtgttagctc	ttgggtgta	tattatataa	agatggaga	taccacat	taigtacaat	3300
tiaaaagcga	atgtgagaaa	taiggaata	giaatacgtg	ggaagtacaa	taigggggca	3360
atgtaattga	ttgtaatgac	tctatgtgca	gtaccagtga	cgacacggta	tccgtactc	3420
agattgttag	acagctacaa	caagcctcca	cgtagcccc	caaaaccgca	tccgtgggca	3480
ccccaaaacc	ccacaccag	acgcccgtca	ctaagcgacc	tagacagigt	ggactcacag	3540
agcagacca	cggacgtgic	aacaccacg	tgacaacce	gtctctgtgt	lcaagtacaa	3600
giaacaacaa	aagaaggaaa	gtgtgtagtg	gtaacactac	gccataata	cacttaaaag	3660
gtgacaaaa	cagtttga	tgtttaagat	ataggtacg	caaatatgca	gaccattact	3720
cagaaatc	ctccacctgg	catggacag	gtgttaata	aaacactggt	atattaactg	3780
taacataaa	tagtgaggta	caaagaata	ctttttgga	tgtagttact	attociaaca	3840
gtgtacaaat	ctcgtggga	tacatgacta	taigaatctg	tatattgtat	acagtaigta	3900
acattactat	gctatcttta	gtgtttttat	tgtcttttc	tgtgtgctt	tatgtgtgct	3960
gcaatgiccc	gcttgtgcag	tcgtctatg	tggtgtctt	tgcitggttg	ttgggtttc	4020
tttttatagt	tgttattaca	tcccattaa	cagcatttgc	tgatatactt	tgttgctatt	4080
tactacctat	gtttgtatta	calatgcaig	ctttacacac	catacaataa	ttactataat	4140
gtacagtaca	gtgtaacata	ctgtgatgt	gcatgttgt	gtattttgt	atttttgtat	4200
ttttgtatt	ttgtatttta	tagtttta	aaaccatggt	atcccacctg	gcagcacgtc	4260
gcaagcgggc	ctctgcaact	gacttatata	gaacatgta	gcaatccggt	acgtgcccc	4320
ctgatgttat	taacaaagtg	gaaggcaca	ctttagctga	taaaatttta	cagtggctca	4380
gccctgggat	atttttgggt	ggccttggca	ttggaccgg	cagttgtct	ggagccgta	4440
cgggctaigt	acccttaggg	ggcaggctca	atctgttgt	ggatgttggc	cccactaggc	4500
cacctgtggt	tattgaacct	gtaggcccta	ctgatccaic	tattgttacc	ttggtagagg	4560
attccagtgt	tgttgctct	gggtctccg	ttcccacat	taccggaacc	cttgggtttg	4620
aaattacgtc	ttctggta	accacaccag	ctgtgttgg	caicacacct	accgtggact	4680
ctgtttctat	ttctgcaact	agttttacaa	atctgcaat	ttctgatccc	tctattattg	4740
agggtcccca	aacaggggag	gtatcaggta	atataattgt	tggtacacca	acaicgggca	4800
gccatggata	tgaggaaata	cttttacaaa	catttgcaic	ttcigggtca	ggtaacggaac	4860
ccattagtag	tacccccctc	ctcactgtgc	ggcgggtacg	gggtccccgc	ctgtatagta	4920
ggcctaata	acaggtccgt	gtgtccacct	cacngtttt	aacacatccc	tcactgttgg	4980
ttacatttga	taatccagct	tatgagcccc	tggacaccac	actatccctt	gagcttacca	5040
gtaatgttcc	tgattccgat	tttaaggata	ttattcgttt	gcalaggcca	gcattatcct	5100
ctagacgtgg	cactgtttag	tttagtagat	ttgggtcaaa	ggcaacctatg	tttacacgta	5160
gtggtaaaca	aataggggtg	agggtacatt	tttaccatga	tataagcccc	attgtctgta	5220

[0012]

cagaggaaat ignaattgcag ccittiaatta gigtacaaa igaiagtgc cgtttgatg	5280
tatatgcaga ctteccacct cctgggtcca ctacacctag cactatacac aaatcattta	5340
catatccaaa gtattccttg accatgcoit ctactgctgc atcctcttac agtaaigtta	5400
cagtaccatt aacatctgca tgggatgtac ctatatafac tggcccggac attatattgc	5460
catcccatac tccfatgttg cclagtacat ctcttaecaa tgccttaacc accacctata	5520
taggtattca tggcacacaa tattatttat ggccatgta ttattatttt cctaaaaaac	5580
gtaaacgtat tccctatttt ttgacagatg gctttgtggc ggccctagga cagtacggta	5640
tatcttccac cacctctctg ggccagattt gtcagcactg atgattatgt gctctgcaca	5700
agcatatttt atcatgcagg cagttccga ttattaacig taggcaatcc atattttagg	5760
gttgtacctt atgttgacgg taataaacag gctgttccct agglatccgc atatcagtat	5820
agggtgttta gagttagctt acccgatcct aataaatttg gattaccgta ttctactata	5880
tataatccctg aaacacaacg ttgtgtttgg gcatgtgtag gtatggaat tggctgtggg	5940
cagcccttag gtattggcct aagtggccat ccattttata ataaatttga tgatacagaa	6000
agtgcaatg cagctacagc tgttattacg caggatgta gggataatgt gtcagttagt	6060
tataagcaaa cacagctgtg tatttttagt tgtgtaccig ctattggiga gcactggggc	6120
aagggcacac ttgttaaacc tgcacaattg caacctggig actgtcctcc ttgtgaactt	6180
aaaaacacca ttattgagga tgggtatgtg gttgatacag gtatggggc aatggatttt	6240
agtacattgc aggtatacaa gtgcgaggtt ccattagaca ttgtcaatc catctgtaaa	6300
tatccagatt atttgcaaat gctgctgat ccctatgggg attctatgtt tttttgcta	6360
cgccgtgaac aactgtttgc aagacatttt tggataggg cagggttat gggtagacaa	6420
gtacctaccg acctatatac laaaggcaat agcgttaata tgcgtgaac ccctggcagt	6480
tgtgtgtatt cccctctcc cagtggctct attattactt ctgattctca attatttaat	6540
aagccatatt ggttacataa ggcccagggc catacaaatg gtatttgtg gcataatcag	6600
ttttttgta ctgtagtga cactaccgc agtactaatc taacattatg tgcctctaca	6660
caaaatccctg tgcgaagtac atatgacctt actaagttaa agcagiatag tagacaigtg	6720
gaggaatag atttacattt tatttttcag ttgtgcacta ttactttaac tgcagagggt	6780
atgicalata tccatagtat gaatagtagt atattagaaa attggaattt tgggtccct	6840
ccaccacctt ctacaagttt ggtggataca tatcgttttg tgcacacagt tgcgttacc	6900
tgtcaaaagg atactacacc tccagaaaag caggatccat atgataaatc aaagtitttg	6960
actgttagcc taaaggaata atttctctcc gatttggatc aatatccctt tggctgaaag	7020
tttttagttc aggtgggtt acgtcttagg cctaccatag gacctctaa gcgtctctct	7080
gcttccactt ctactgcact tactgcactt aggcctgcca aacgtgtacg tatacgtagt	7140
aagaaataat atgttagcac atatagtat gtttgtatgt atggttttgt atgttgtatg	7200
tatgtatgta ttigtgtgat atattactgt atttgttttg ttgtcgtgcg tgiatgtatg	7260
aatgtccctt gtggcatgta tgggttactt gtacataatc gttgtattaa ataaagtatg	7320
ctaatagtgt tgtgtagggt tgcaccttgg tgagtaacaa tactatttgt gigtatgigt	7380
attgctttgt acctatattt ctctctctga ttcaagttaa taaacttgcata tactacacag	7440
catccatttt actatataac ctccattttg ctgtgcaacc gatttccgtt gccctgtgct	7500
tatagtgac cttttaacaa taatacctaa actggcaatc ttacaacccc tactatgitt	7560
aacctactgg cgcgctctct tggcgtacat gtggcacacc tggattatgt catttctctg	7620

[0013]

tcaggigia ctanaacaat ggcctgcaca actgtaacca caccctaigt aataaaactg	7680
cttttaggca catattttag tcgtttttta cctgtgctaa ttgtataatt ggcgtgtaga	7740
accacittct tatccaaca tcigtctact tgttacataa actataaact gactcactta	7800
tacatacata gtttatgca cggaaaaagg ttgggcccta taacacatac cttttctt	7858
<210> 16	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> per 引物	
<400> 16	
gaagagccaa ggacaggtac	20
<210> 17	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> per 引物	
<400> 17	
caacttcac cagttcacc	20
<210> 18	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> per 探针	
<400> 18	
ccctagggtt ggccaatcfa etc	23
<210> 19	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> per 引物	
<400> 19	
acacaacigt gttcactagc	20
<210> 20	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> per 引物	
<400> 20	
caacttcac cagttcacc	20
<210> 21	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> per 探针	
<400> 21	
tcaaacagac accaiggtgc atcigactcc	30

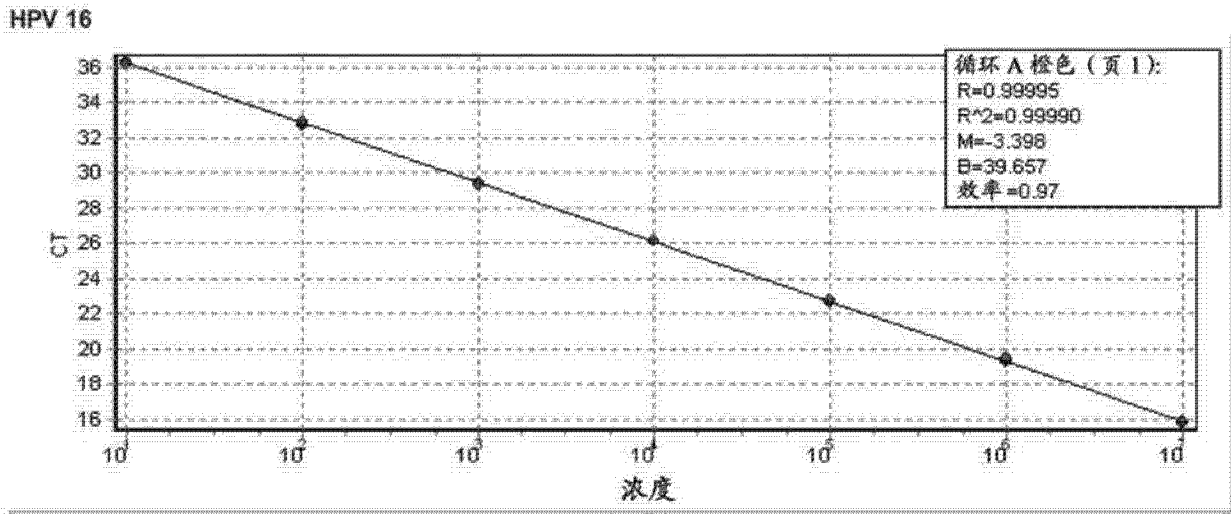


图 1

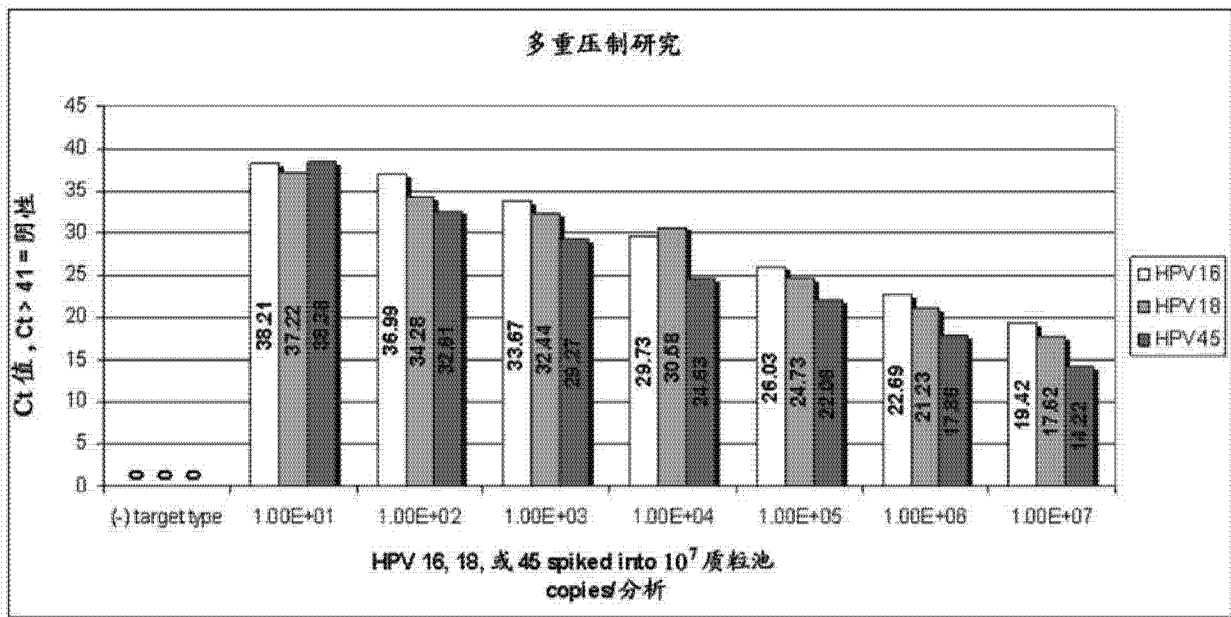


图 2

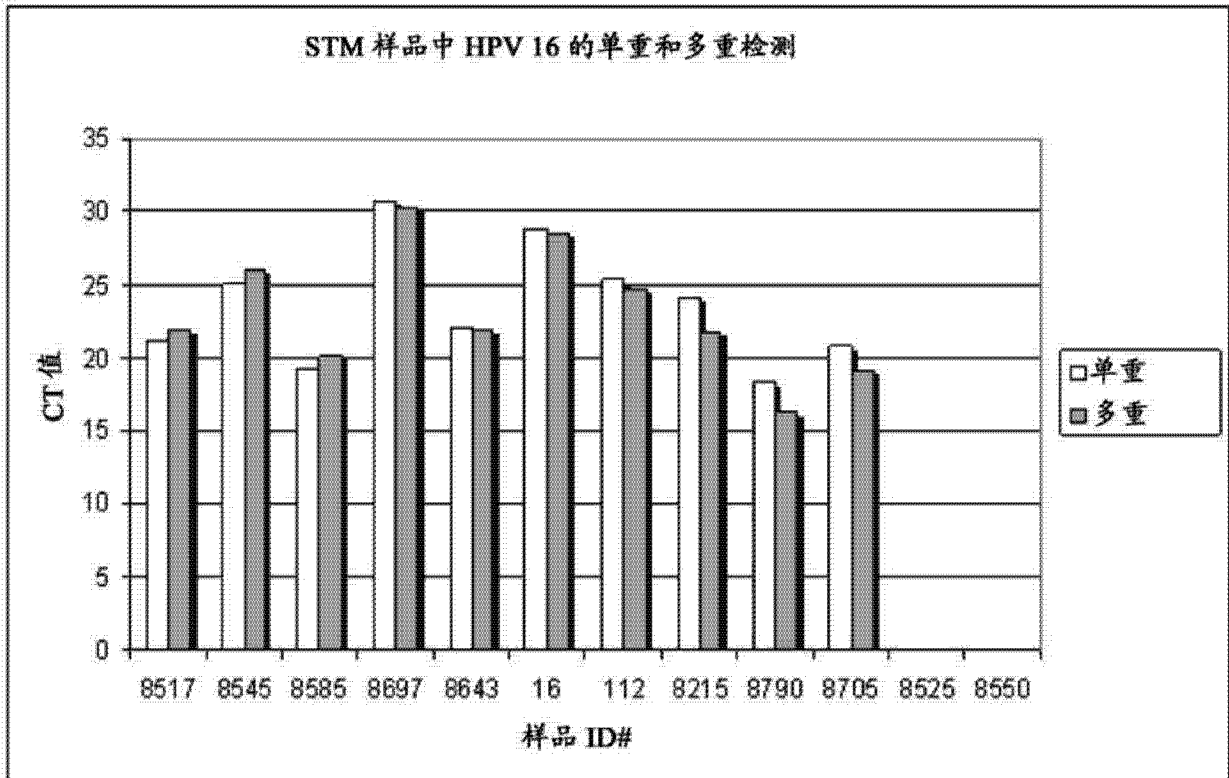


图 3

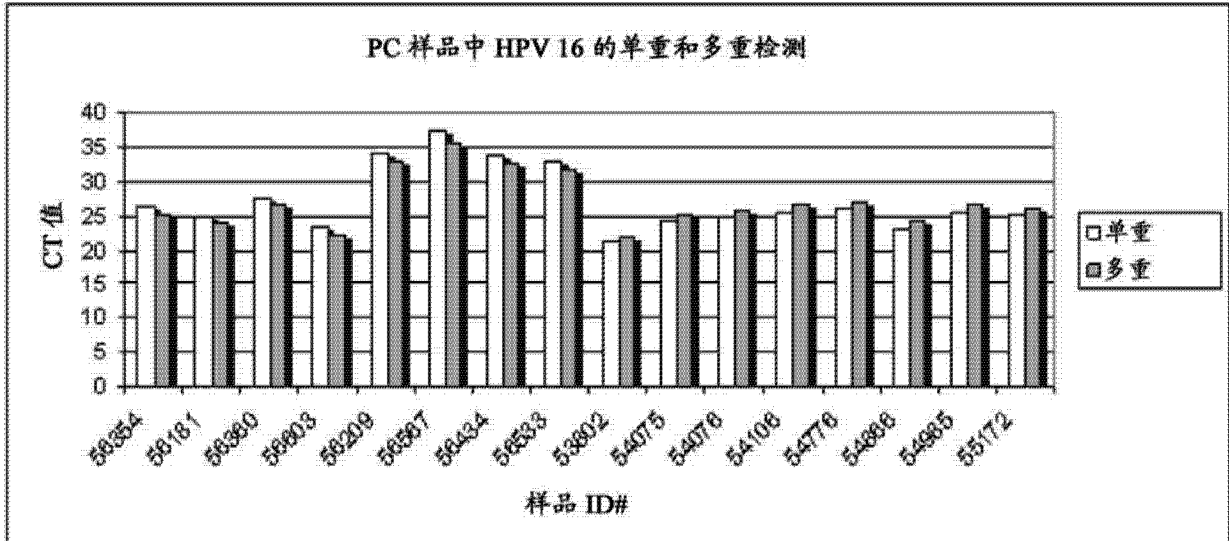


图 4



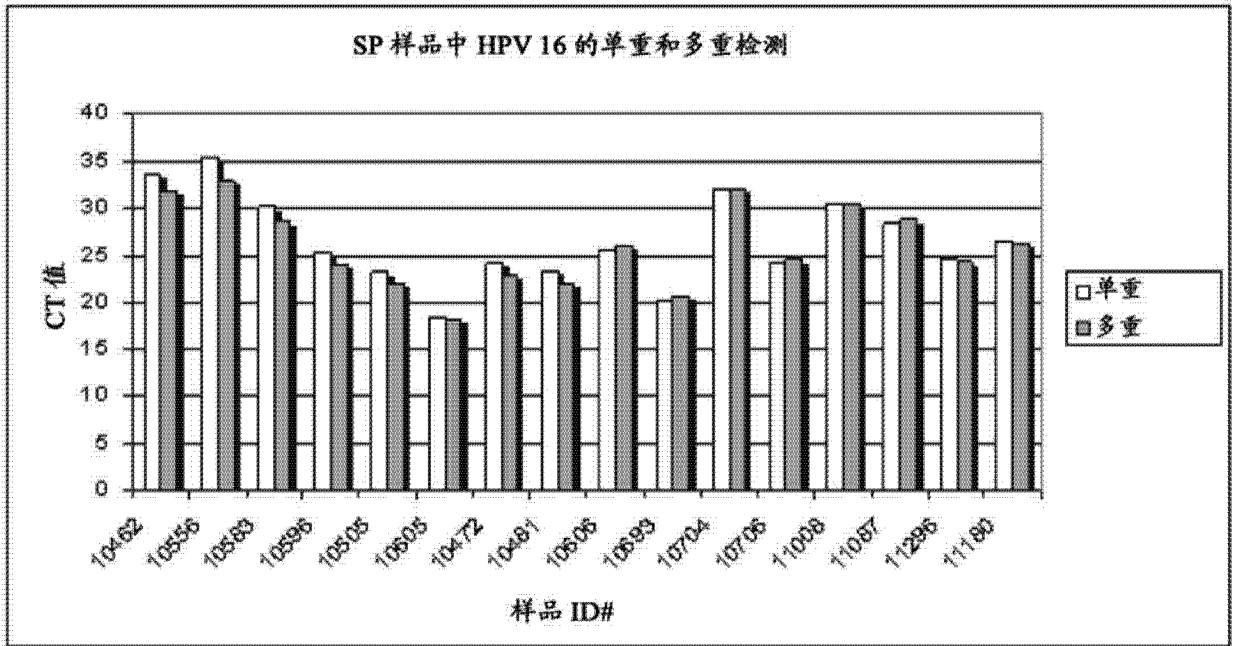


图 5

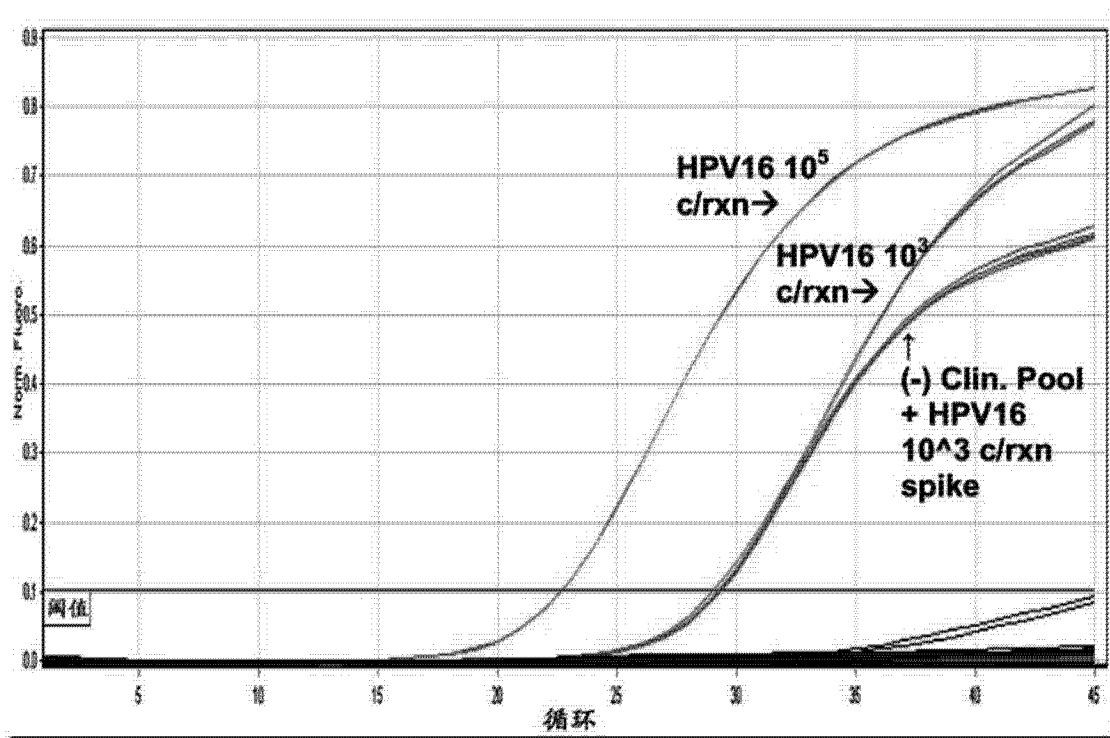


图 6

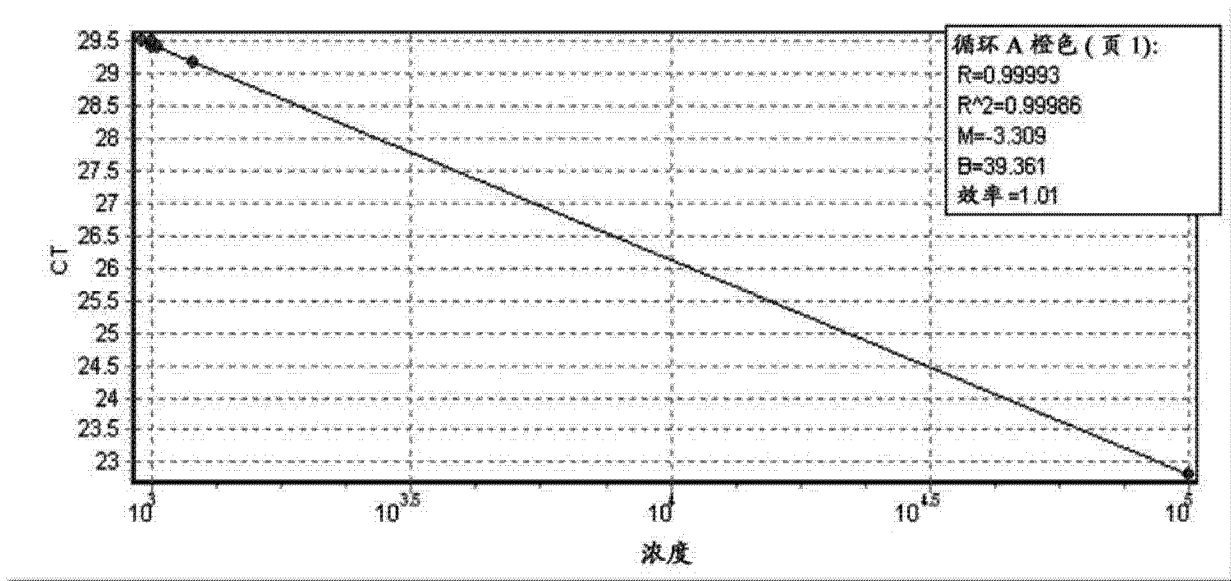


图 7

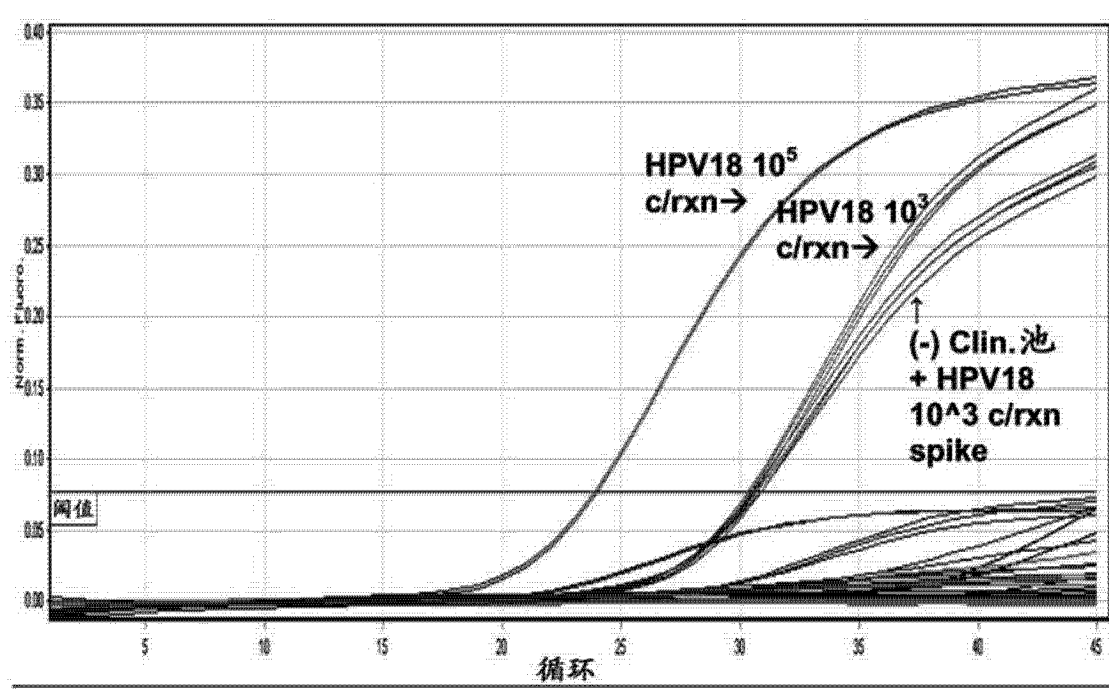


图 8

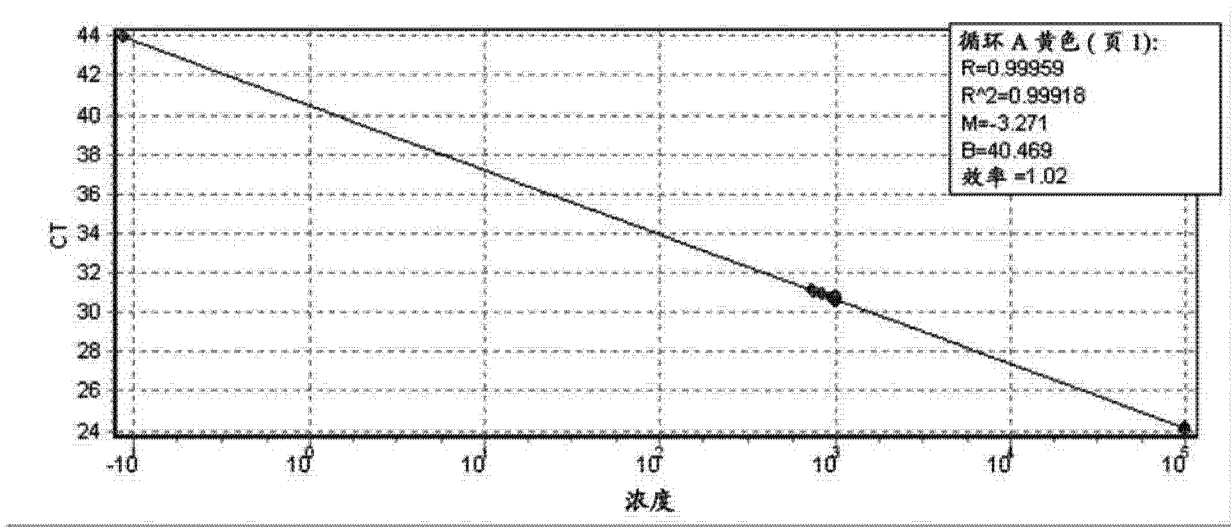


图 9

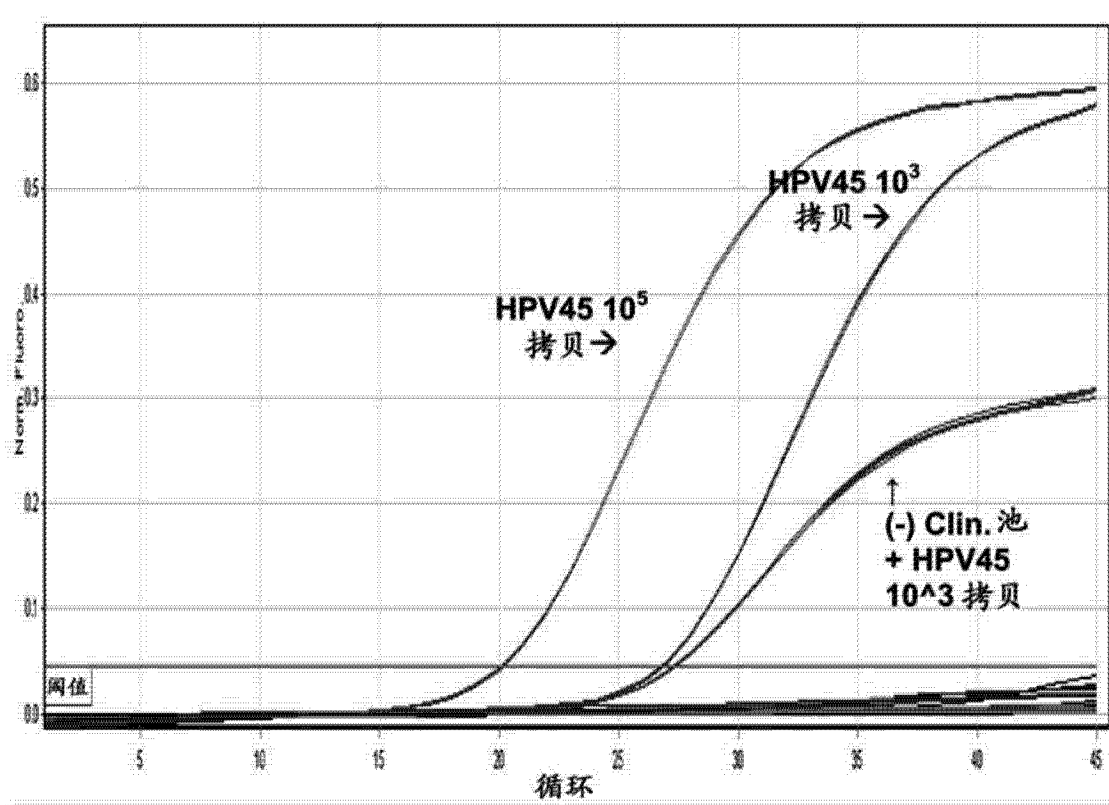


图 10

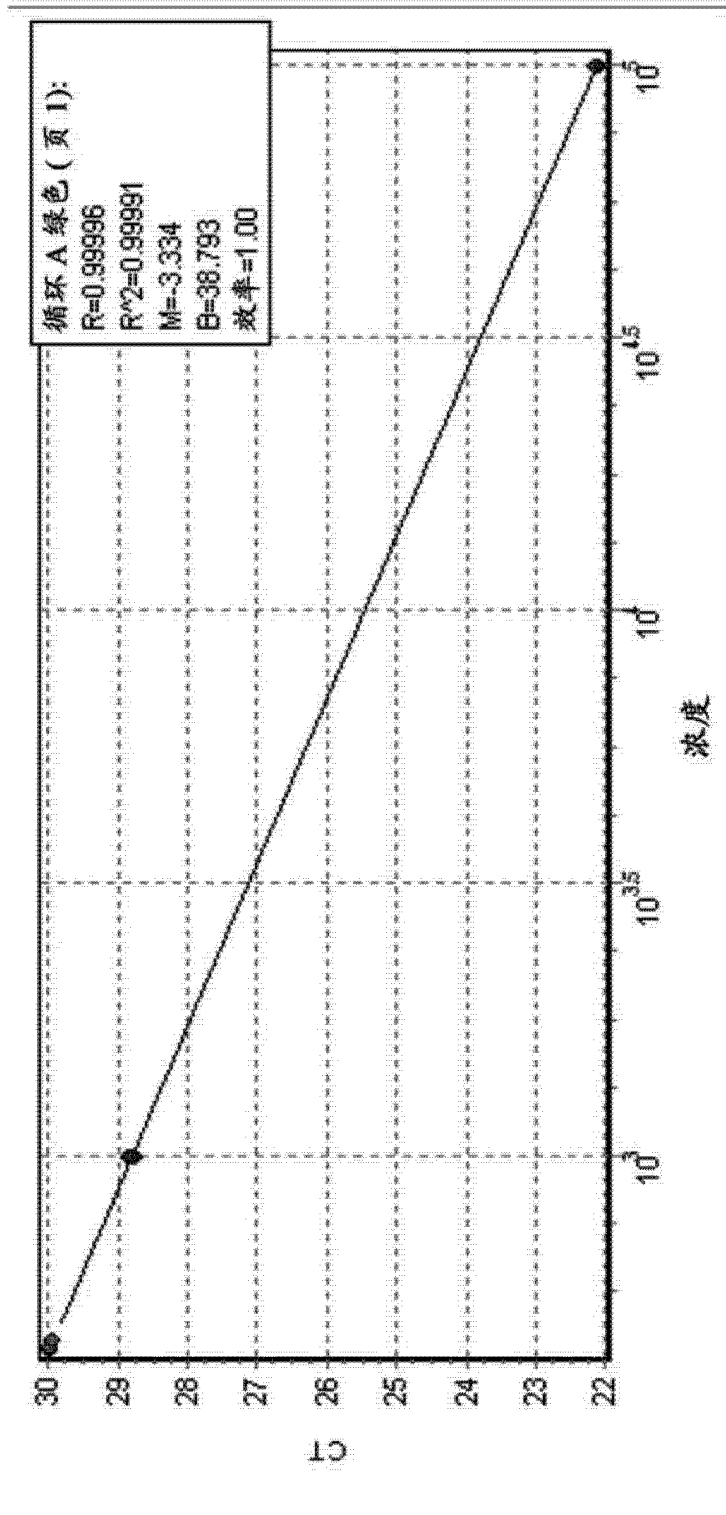


图 11

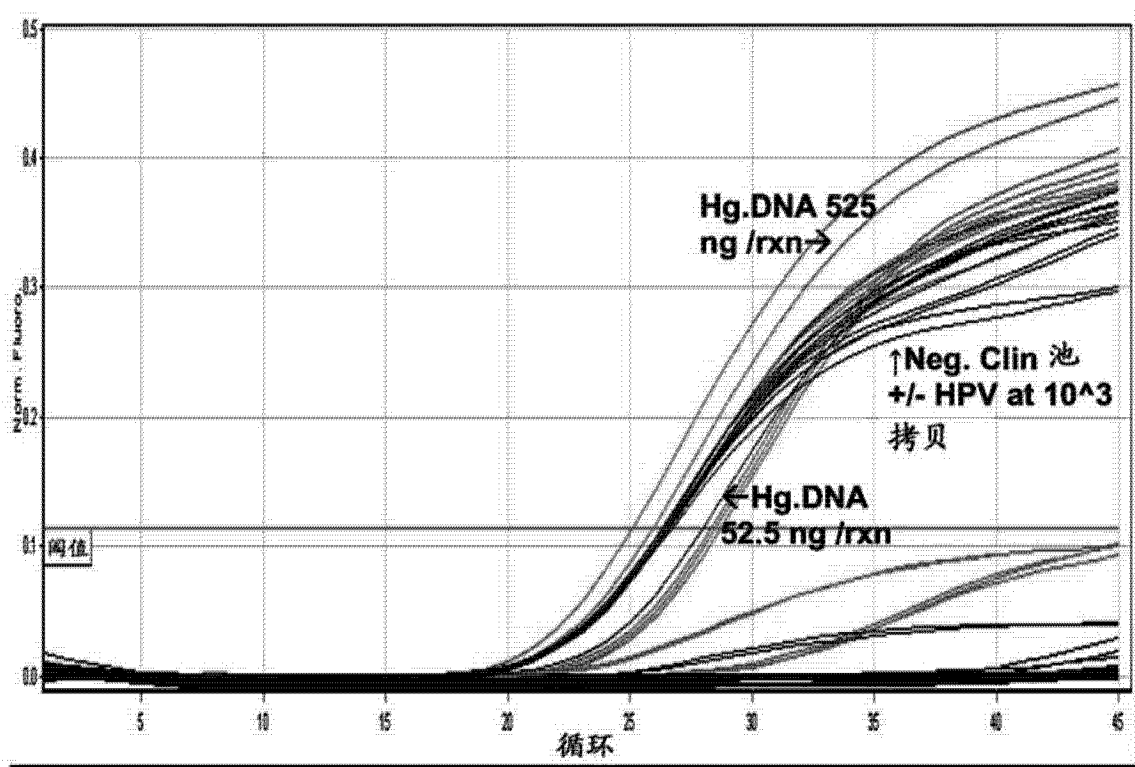


图 12

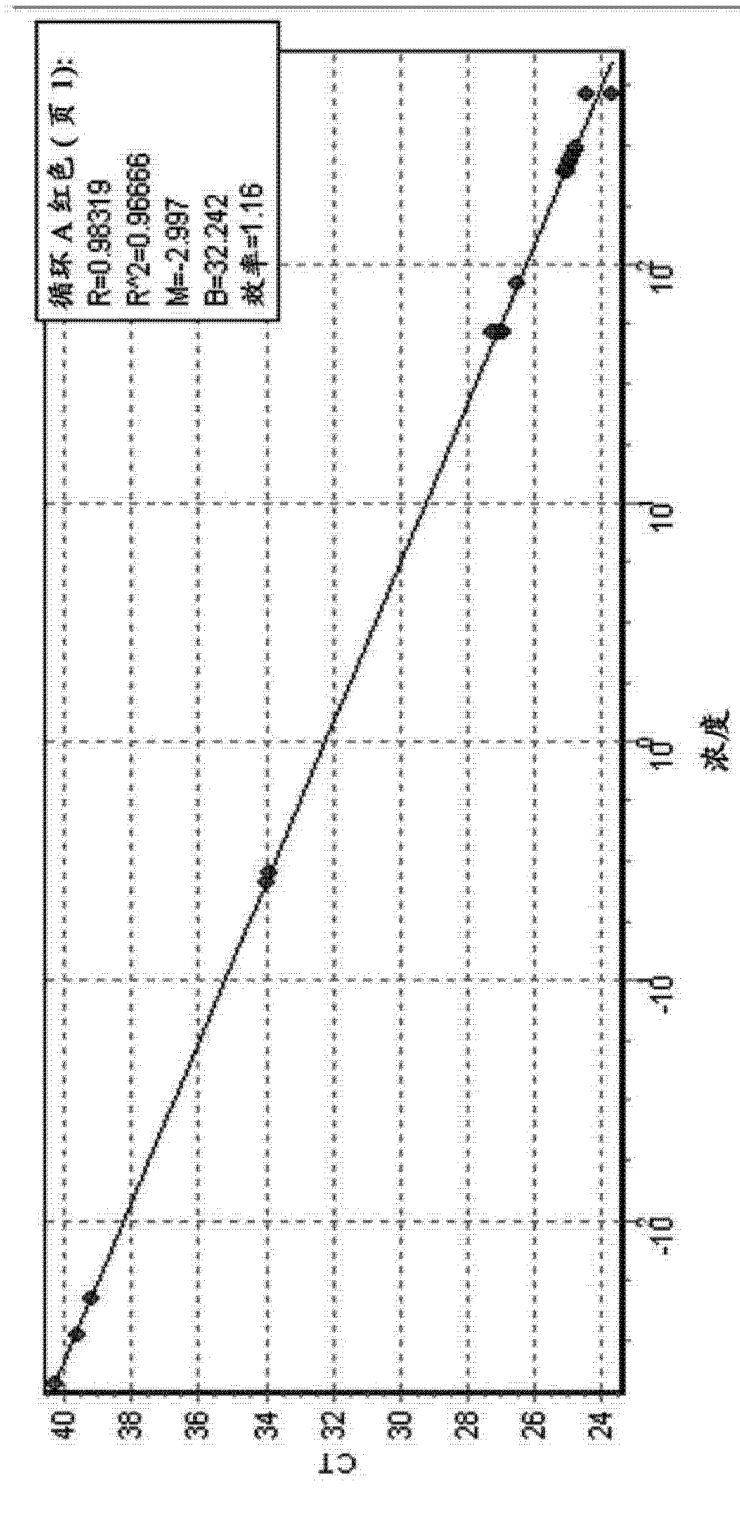


图 13

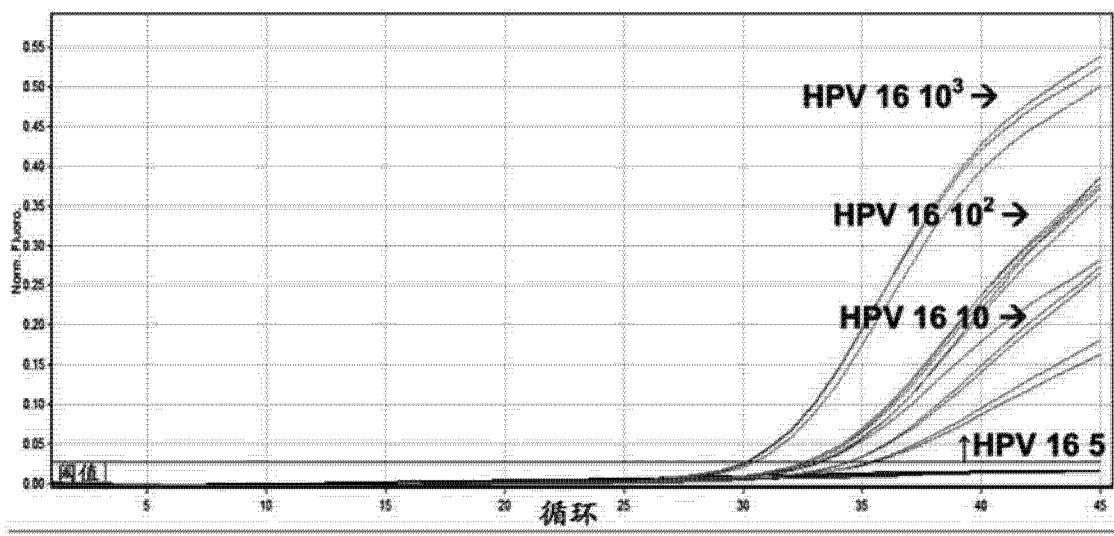


图 14

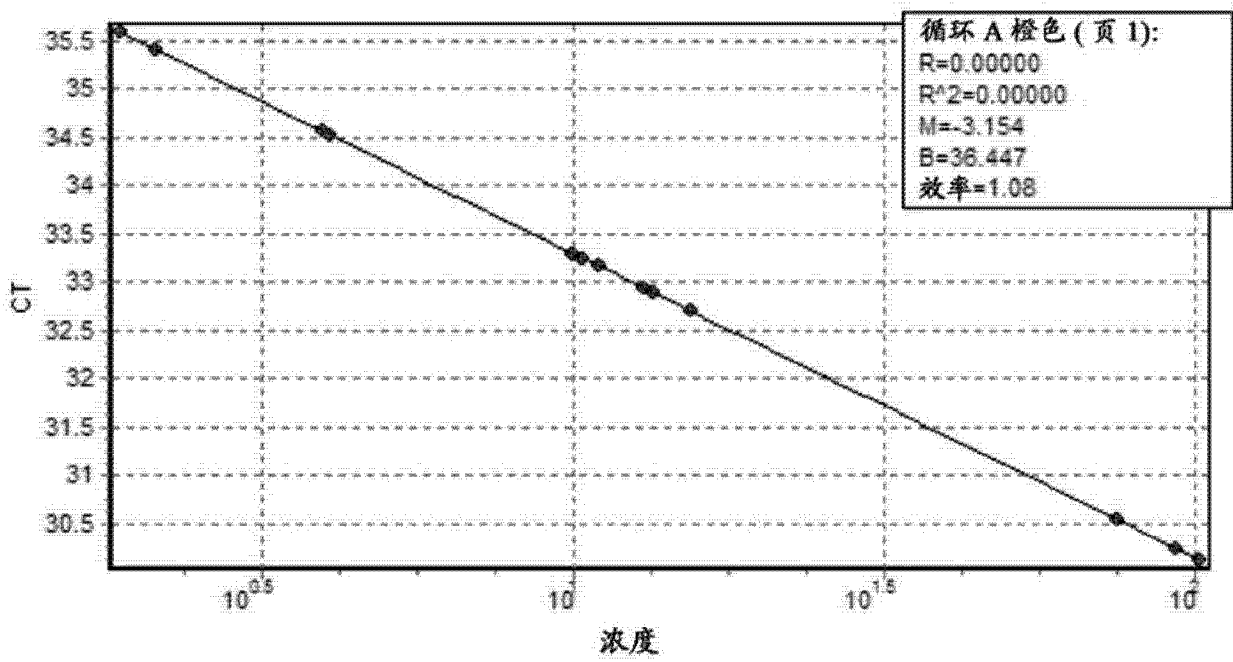


图 15

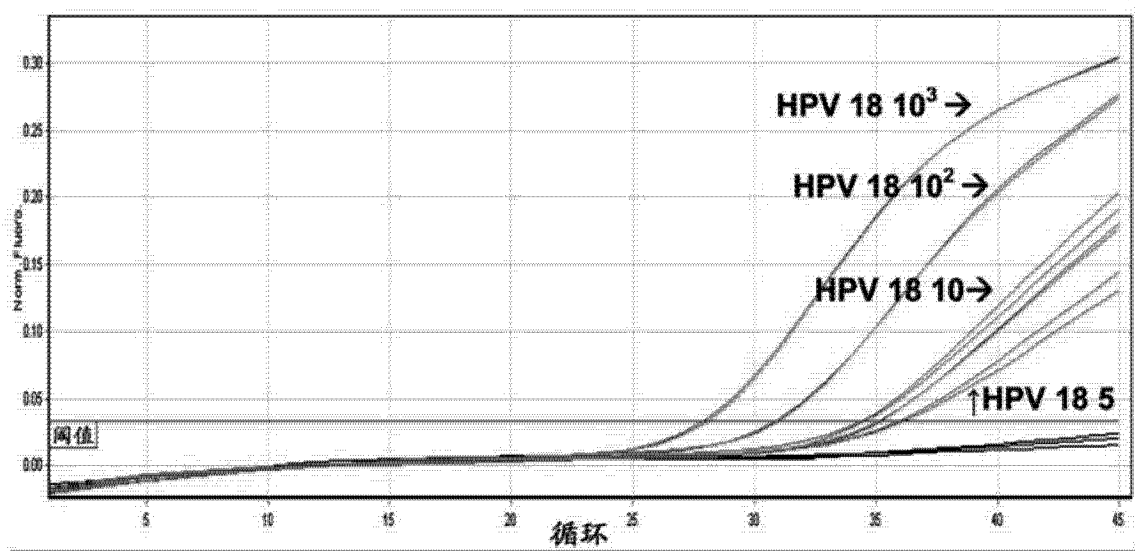


图 16



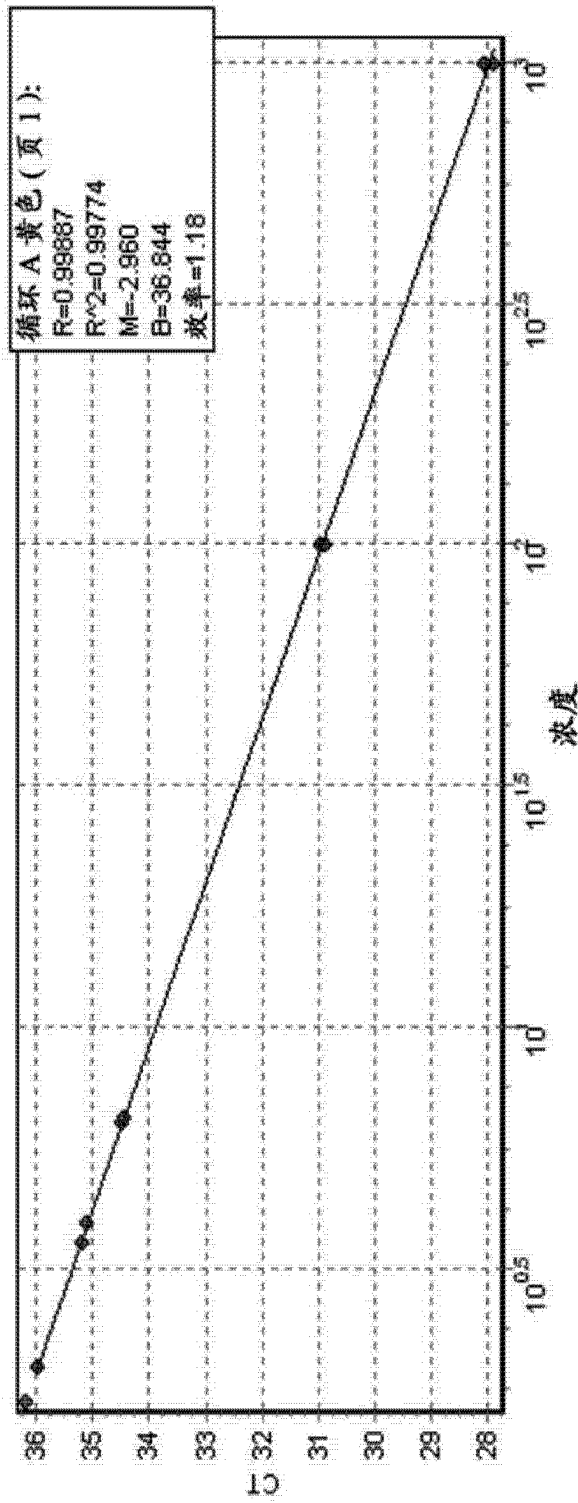


图 17

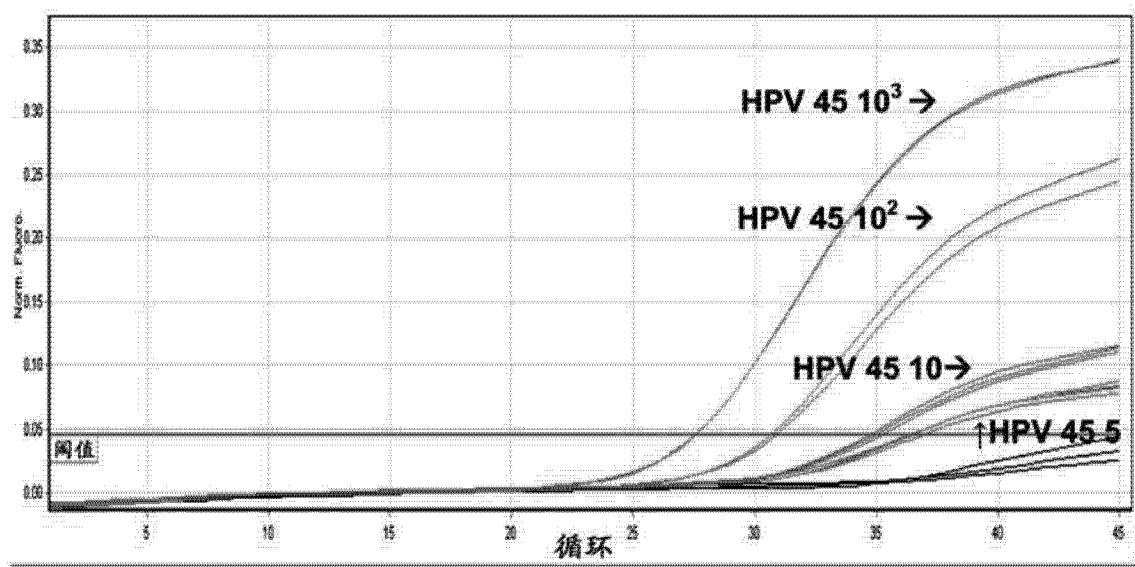


图 18

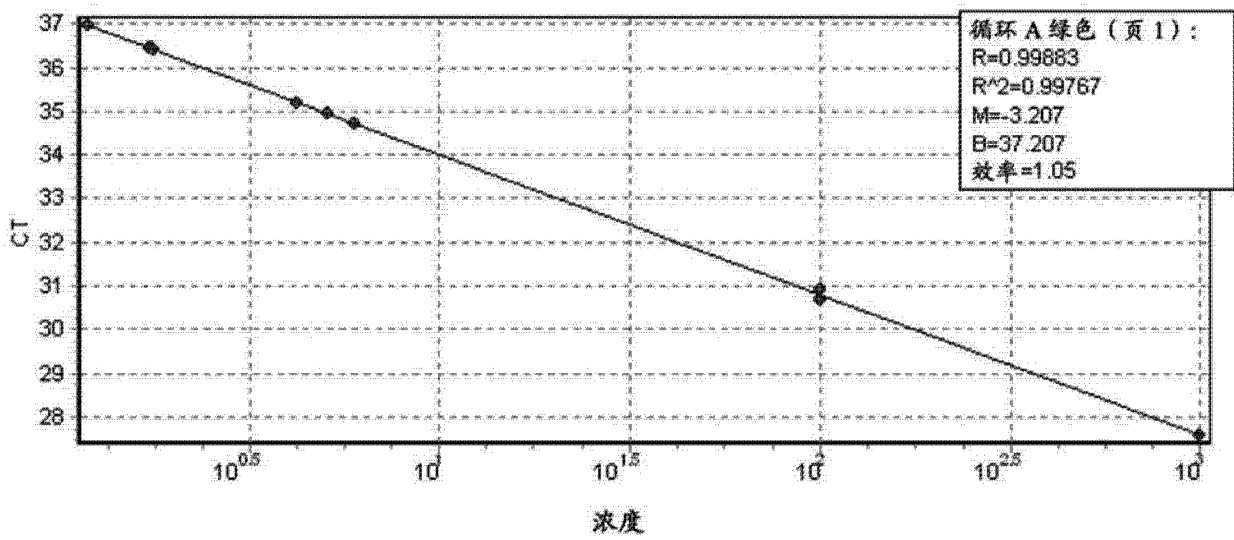


图 19