

HR-HPV E6/E7基因SNP检测的固相芯片和探针以及检测试剂盒

申请号 CN201210152151. X

申请日 2012. 05. 16

公开（公告）号 [CN102703606A](#)

公开（公告）日 2012. 10. 03

分类号 C12Q1/70(2006. 01);C12Q1/68(2006. 01);C40B40/06
(2006. 01);C12N15/11(2006. 01);C12R1/93(20....

申请（专利权）人 王新宇;浙江大学医学院附属妇产科医院



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102703606 A

(43) 申请公布日 2012. 10. 03

(21) 申请号 201210152151. X

C12R 1/93(2006. 01)

(22) 申请日 2012. 05. 16

(71) 申请人 王新宇

地址 310006 浙江省杭州市学士路 1 号

申请人 浙江大学医学院附属妇产科医院

(72) 发明人 王新宇 丁田

(74) 专利代理机构 杭州丰禾专利事务所有限公
司 33214

代理人 王从友

(51) Int. Cl.

C12Q 1/70(2006. 01)

C12Q 1/68(2006. 01)

C40B 40/06(2006. 01)

C12N 15/11(2006. 01)

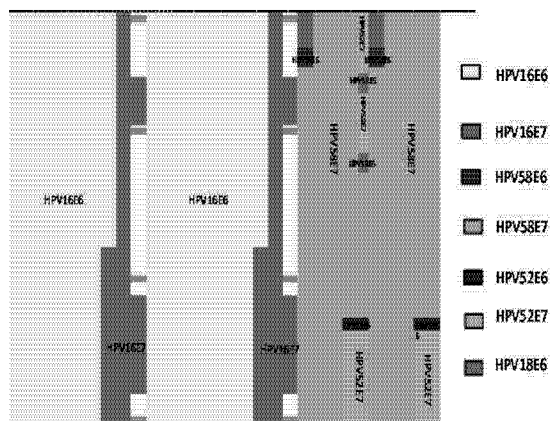
权利要求书 7 页 说明书 26 页 附图 1 页

(54) 发明名称

HR-HPV E6/E7 基因 SNP 检测的固相芯片和探
针以及检测试剂盒

(57) 摘要

本发明属生命科学和生物技术领域,具体是
涉及 HR-HPVE6/E7 基因 SNP 检测固相芯片和探
针以及检测试剂盒。本发明的第一个目的是提
供一种 HR-HPVE6/E7 基因 SNP 检测的固相芯片,
该固相芯片的探针具有 SEQIDNo. 1-225 的核苷
酸序列,该固相芯片包含 65 个 HR-HPV16、58、18、
52E6/E7SNP 位点,可以弥补单纯 HPV-DNA 检测低
特异性和低阳性预测值,检测具有快速、高通量
的特点,从而更好的用于宫颈癌的筛查,做到宫颈
癌的早期诊断和治疗。本发明的第二个目的是提
供 HR-HPVE6/E7 基因 SNP 检测的探针引物。本发
明的第三个目的是提供一种用于 HR-HPVE6/E7 基
因 SNP 检测的试剂盒。



1. HR-HPV E6/E7 基因 SNP 检测的固相芯片,该基因芯片包括固相载体和固定于其上的检测探针,其特征在于:所述的 HR-HPV E6/E7 基因的一个基因具有多个突变 SNP 位点,每个突变 SNP 位点设计若干条的检测探针序列,所述的 HR-HPV E6/E7 基因的一个基因具有所述检测探针序列的一条或多条检测探针;所述的基因、突变 SNP 位点、检测探针序列如下所示:

基因	突变	探针序列
HPV16E6	12 (G/A)	tgcacccaaaagagaactgcaa
		tgcacccaaaaagaactgcaa
	29 (A/C)	gcaatgttttcaggacccacag
		gcaatgttttcCggacccacag
	42 (G/A)	tgttttcaggacccacaggagc
		tgttttcaggacccacaggaac
		tgttttcaggacccacaggagc
		tgttttcaggacccacaggaac
	49 (A/C)	aggacccacaggaacgaccca
		aggacccacaggaacgacccc
		aggacccacaggagcgaccca
		aggacccacaggagcgacccc
		cggacccacaggaacgaccca
		cggacccacaggaacgacccc
		cggacccacaggagcgaccca
		cggacccacaggagcgacccc
	50 (G/C)	gaccacaggaacgaccacaa
		gaccacaggaacgaccacaa
		gaccacaggaacgaccccca
		gaccacaggaacgaccccga
		gaccacaggagcgaccacaa
		gaccacaggagcgaccacaa
		gaccacaggagcgaccccca
		gaccacaggagcgaccccga
	55 (T/G)	ggtaccacagtattgcacaga
		ggtaccacagtattgcacaga
		ggtaccacattttatgcacaga
		ggtaccacattttatgcacaga
	63 (G/T)	taccacagtattgcacagagc
		taccacattttatgcacagagc
	80 (A/C)	tatgcacagagctgcaaacaa
		tatgcacagagctgccaacaa
	86 (C/G)	cacagagctgcaaacactat
		cacagagctgcaaacagtat
		cacagagctgccaacactat
		cacagagctgccaacagtat

	91 (C/A)	cagagctgcaaacaactatac
		cagagctgcaaacaactataa
		cagagctgcaaacaagtatac
		cagagctgcaaacaagtataa
		cagagctgccaacaactatac
		cagagctgccaacaactataa
		cagagctgccaacaagtatac
		cagagctgccaacaagtataa
	96 (T/G)	ctgcaaacaactatacatgat
		ctgcaaacaactatacatgag
		ctgcaaacaactataaatgat
		ctgcaaacaactataaatgag
		ctgccaacaagtataaatgat
		ctgccaacaagtataaatgag
		ctgcaaacaagtataaatgat
		ctgcaaacaagtataaatgag
		ctgcaaacaagtatacatgat
		ctgcaaacaagtatacatgag
		ctgccaacaactatacatgat
		ctgccaacaactatacatgag
		ctgccaacaagtatacatgat
		ctgccaacaagtatacatgag
		ctgccaacaactataaatgat
		ctgccaacaactataaatgag
	101 (T/C)	acaactataaatgatataaca
		acaactataaatgatataata
		acaagtatacatgatataaca
		acaagtatacatgatataata
		acaagtatacatgagataaca
		acaagtatacatgagataata
		acaactatacatgagataaca
		acaactatacatgagataata
		acaactataaatgagataaca
		acaactataaatgagataata
		acaactatacatgatataaca
		acaactatacatgatataata
		acaagtataaatgatataaca
		acaagtataaatgatataata
		acaagtataaatgagataaca
		acaagtataaatgagataata
	103 (T/G)	agtacaatgtgtgtactgcaa
		attacaatgtgtgtactgcaa
		agtacaatgtgtgtactgcga
		attacaatgtgtgtactgcga

	agtagaatgtgtgtactgcaa
	attagaatgtgtgtactgcaa
	agtagaatgtgtgtactgcga
	attagaatgtgtgtactgcga
106 (G/C)	agtacaatgtgtgtactgcaa
	agtagaatgtgtgtactgcaa
	attacaatgtgtgtactgcaa
	attagaatgtgtgtactgcaa
	agtacaatgtgtgtactgcga
	agtagaatgtgtgtactgcga
	attacaatgtgtgtactgcga
	attagaatgtgtgtactgcga
121 (A/G)	tgtgtactgcaagcaacagtt
	tggtgtactgcgagcaacagtt
158 (C/G)	gaggtatatgactttgctttt
	gaggtatatgactttggtttt
163 (C/T)	ttttcgggatttatgcatagt
	tttttgggatttatgcatagt
187 (G/A)	agtatatagagatgggaatcc
	agtatatagaaatgggaatcc
194 (A/G)	atgggaatccatatgctgtat
	atgggagtcctatatgctgtat
203 (C/G)	tccatatgctgtatgtgataa
	tccatatgggtgtatgtgataa
235 (A/G)	gttttattctaaaattagtga
	gttttattctgaaattagtga
253 (C/T)	gagtatagacattattgtttat
	gagtatagatatattattgtttat
268 (T/G)	attgtttatagtgtgtatggaa
	attgtttatagtttgtatggaa
278 (C/T)	tgtatggaacaacattagaac
	tgtatggaataacattagaac
337 (T/G)	gtgtattaactgtcaaaagcc
	gtgtattaacgggtcaaaagcc
367 (C/G)	cctgaagaaaaccaaagaca
	cctgaagaaaagcaaagaca
	cctgcagaaaaccaaagaca
	cctgcagaaaagcaaagaca
375 (T/G)	aaagacagctggacaaaaagc
	aaagacatctggacaaaaagc
425 (G/A)	ggtggaccgggtcaatgtatgt
	ggtggaccgggtcgatgtatgt
434 (C/G)	atgtatgtcttgttcagatc
	atgtatgtgttgttcagatc

HPV16E7	45 (G/T)	tgtagatttgcaaccagaga
		tgtagattttcaaccagaga
	85 (A/C)	tgtagagcaattaaatgac
		tgtagagcaattacatgac
		tgtagagcaattacgtgac
	86 (A/G)	tgtagagcaattaagtgac
	136 (G/A)	tggacaagcagaaccggacag
		tggacaagcaaaaccggacag
	151 (C/A)	ggacagagcccattacaatat
		ggacagagccaattacaatat
	169 (T/C)	cccattacaatatgtaacct
		cccattacaatatgtaacce
		ccaattacaatatgtaacct
		ccaattacaatatgtaacce
	171 (T/C)	taaccttttggtgcaagtgtg
		taaccttctggtgcaagtgtg
		taaccttttggtgcaagtgtg
		taaccttctggtgcaagtgtg
	188 (C/T)	aagtgtgactctacgttcgg
		aagtgtgactttacgttcgg
	196 (C/T)	tacgttcggttggtgcgtaca
		tacgttttggttggtgcgtaca
	223 (G/A)	acacacgtagacattcgtact
		acacacgtaaacattcgtact
	258 (A/G)	taatgggcacactaggaattg
		taatgggcacgctaggaattg
	262 (G/A)	ctaggaattgtgtgccccatc
		ctaagaattgtgtgccccatc
HPV58E6	94 (G/C)	gaaatgcgttgaaatgcaaaaa
		gaaatgcgttcaatgcaaaaa
	258 (C/A)	tatatggagaaacattagaac
		tatatggagacacattagaac
	279 (A/C)	aaacactaaaaaagtgtttaa
		aaacactaaacaagtgtttaa
HPV58E7	26 (G/A)	ccaacgctaagagaatatatt
		ccaacgctaaaagaatatatt
	40 (G/A)	atatattttagatttacatcc
		atatattttaatttacatcc
	121 (G/A)	aggcttgacgggcagatgg
		aggcttgacagggcagatgg
	187 (G/A)	ttacacttggtggcaccacggt
		ttacacttgtagcaccacggt
	220 (A/G)	gtgtatcaacagtacaacaac
		gtgtatcaacagtacagcaac

	225 (C/T)	atcaacagtacaacaaccgaa
		atcaacagtacaacaactgaa
		atcaacagtacaacaaccgac
		atcaacagtacaacaactgac
		atcaacagtacagcaaccgaa
		atcaacagtacagcaactgaa
		atcaacagtacagcaaccgac
		atcaacagtacagcaactgac
	228 (C/A)	atcaacagtacaacaaccgaa
		atcaacagtacaacaaccgac
		atcaacagtacaacaactgaa
		atcaacagtacaacaactgac
		atcaacagtacagcaaccgaa
		atcaacagtacagcaaccgac
		atcaacagtacagcaactgaa
		atcaacagtacagcaactgac
	230 (T/C)	gaagtaccaaccctacagcag
		gaagcaccaaccctacagcag
		gaagtacgaaccctacagcag
		gaagcacgaaccctacagcag
		gacgtaccaaccctacagcag
		gacgcaccaaccctacagcag
		gacgtacgaaccctacagcag
		gacgcacgaaccctacagcag
	233 (G/C)	gaagtacgaaccctacagcag
		gaagtaccaaccctacagcag
		gaagcacgaaccctacagcag
		gaagcaccaaccctacagcag
		gacgcacgaaccctacagcag
		gacgcaccaaccctacagcag
		gacgtacgaaccctacagcag
		gacgtaccaaccctacagcag
	251 (T/A)	cagcagctgcttatgggcaca
		cagcagctgcatatgggcaca
	272 (T/G)	tgtaccatttgtgtgccctagc
		tgtaccattgggtgccctagc
HPV18E6	49 (C/T)	gctacctgatctgtgcacgga
		gctacctgatttgtgcacgga
	183 (C/G)	acagtatacccatgctgcat
	445 (C/A)	acgacaggaacgactccaacg
HPV52E6		acgacaggaagactccaacg
	90 (T/C)	ggctgcagtggtgcagtgca
HPV52E7		ggctgcagtcgtgcagtgca
	110 (C/T)	gaggaggatacagatggtgtg

		gaggaggatatagatggtgtg
175 (T/G)		tactacattgtgacatatgt
		tactacattgtgacagattgt
181 (C/T)		gtgacagattgtcacagttgt
		gtgacagattgttacagttgt
		gtgacatatgtcacagttgt
		gtgacatatgttacagttgt
190 (G/A)		acagttgtgatagcacactac
		acagttgtaatagcacactac
249 (A/G)		ctctacagcaaagtctgttgg
		ctctacagcagatgctgttgg
296 (T/G)		cccggctgtgcacggctataa
		cccggctgtgcacggcgataa

2. HR-HPV E6/E7 基因 SNP 检测的探针,其特征在于:该探针具有 SEQID No. 1-225 的核苷酸序列之一的序列。

3. 一种用于 HR-HPV E6/E7 基因 SNP 检测的试剂盒,其特征在于该试剂盒包括:

- 1) 包含 HR-HPV 样品的裂解液;
- 2) 掺入荧光的多重 PCR 反应液;
- 3) 权利要求 1 所述的固相芯片。

4. 根据权利要求 3 所述的用于 HR-HPV E6/E7 基因 SNP 检测的试剂盒,其特征在于多重 PCR 的引物如下所示:

HPV16E6F	CGAAACCGTTAGTATAA
HPV16E6R	GTATCTCCATGCATGATT
HPV16E7F	CTGAAGAAAAGCAAAGACATC
HPV16E7R	CATTACATCCCGTACCCTC
HPV58E6F	AATGCCAAATCTTGTA AAACTAGG
HPV58E6R	CATAATTGCTCATAGCAGAA
HPV58E7F	ACAAGTGTAACCTGTAACAACGC
HPV58E7R	TTGTACCTCAGGGTCATCCA
HPV52E6F	TAACCGAAAACGGTCAGA
HPV52E6R	GTTTCAGGTTGCAGATCTAAT
HPV52E7F	ATATTATGGGTCGTTGGACA

HPV52E7R	CCTGTACATCCCTCCCTTTC
HPV18E6F	GAAAACGGTGTATATAAAAGATGTG
HPV18E6R	GTCAACCGGAATTTTCATTTTG

5. 根据权利要求3所述的用于HR-HPV E6/E7 基因 SNP 检测的试剂盒,其特征在于裂解液的成分为 0.01M Tris-HCL pH 8.0, 0.005M EDTA pH 8.0, SDS 0.5%。

6. 根据权利要求3所述的用于HR-HPV E6/E7 基因 SNP 检测的试剂盒,其特征在于多重PCR 反应液包括:

Onetaq	5u/μl
DATP	100mM
DTTP	100mM
DGTP	100mM
DCTP	100mM
CY3-DCTP	1nm/ul
20×SSPE	
SDS	
100×BSA	
EDTA	
Nuclease-free water	
HCONH ₂	
PCR 产物纯化试剂盒	
无水乙醇	

7. 根据权利要求3所述的用于HR-HPV E6/E7 基因 SNP 检测的试剂盒,其特征在于掺入荧光物质为 cy3-dCTP。

8. 根据权利要求3所述的用于HR-HPV E6/E7 基因 SNP 检测的试剂盒,其特征在于该试剂盒的阳性对照为人 β-globin 基因,其扩增引物如下,与 HRHPVE6/E7 同时扩增,同时检测:

β-globin GH20 5'-TTCCAGCCTTCCTTCCTGG-3'

β-globin PC04 5'-TTGCGCTCAGGAGGAGCAAT-3'。

HR-HPV E6/E7 基因 SNP 检测的固相芯片和探针以及检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属生命科学和生物技术领域,具体是涉及 HR-HPV E6/E7 基因 SNP 检测固相芯片和探针引物以及检测试剂盒。

背景技术

[0002] 宫颈癌是女性第二大常见恶性肿瘤,高危人乳头瘤病毒 (HR-HPV) 感染是宫颈癌发病的必要因素,已经在 99.7% 的宫颈癌组织中证实 HPV DNA 的存在。大量研究已证实,高危人乳头瘤病毒 (HR-HPV) 持续感染和特定的 HR-HPV 型内变异体 (对某一特定的 HPV 型别,与原型相比其基因组的编码区有小于 2% 差异,非编码区小于 5% 的差异) 能增加宫颈癌 (CC) 及宫颈上皮内瘤变 (CIN) 的发病危险。

[0003] 目前,宫颈癌发生的三步模式是: HPV 感染,高级别癌前病变的进展,宫颈癌。因此, HPV 检测能做到更早期的发现具有潜在病变危险的病人,从而做到早期的诊断和治疗。宫颈癌是世界卫生组织建议在全世界范围内开展筛查的唯一恶性肿瘤,是目前唯一通过常规筛查几乎完全可预防因此得到早期治疗的疾病。

[0004] 从 1941 年巴氏细胞涂片技术开始用于临床常规筛查,但是这项技术的准确性却受到标本收集、制备、染色和阅片等很多方面的影响,使其检测潜在癌前病变的敏感性仅有 50% 左右,为了克服其敏感性低的缺点,液基细胞学 (LBC) 取代传统涂片成为标准初筛方法,但有文献经过 Meta 分析表明无论是在检出率还是在降低样本的不满意度上 LBC 并未优于传统涂片,并且细胞学为基础的筛查方法具有高度的主观性并且具有资源和劳动力密集型的特点,因此,在资源缺乏的地区不适合采用。肉眼检测包括醋酸白实验 (VIA) 和碘染色法 (VILI) 是一种经济有效的筛查方法,但敏感性低,主观性强。因此,改进目前已存在的筛查技术就尤为重要。

[0005] 在那些宫颈细胞学无异常的妇女中, HR-HPV 阳性妇女患 CIN2-3 和原位癌的风险是未检测到 HPV 妇女的 58-71 倍。 HPV-DNA 检测克服了细胞学筛查的主观性,最近的研究表明 HPV 检测作为一种初筛方法在检测癌前病变上比细胞学具有更高的敏感性 (高于 25-35%) 和阴性预测值,但特异性 (5-10%) 和阳性预测值较细胞学低,因此,寻找一种能增加 HPV-DNA 检测特异性的方法很有必要。

[0006] 最近越来越多的流行病学的数据表明 HR-HPV 基因组型内变体通过改变转化能力或是免疫反应能力影响 HR-HPV 的致癌力。 HR-HPV 特定的型内变异体与病毒持续感染和宫颈病变进展关系密切,并且存在地区差异。目前对 HPV16、HPV18、HPV58 和 HPV52 变体研究的最多,如有研究表明,在瑞典、意大利和法国人群中, HPV16E6L83V 与 HPV 持续感染、宫颈癌及宫颈高级别瘤变的发展相关,而在日本和中国人群中, HPV16E6D25E 与宫颈癌及宫颈高级别瘤变的发展相关。

[0007] 以上的研究提示,将 HPV 型内基因组变异体作为生物学标记,即通过检测 HR-HPV 阳性病人的病毒基因组变异来预测其发展为持续感染和引起宫颈病变的危险性是合理的、

可行的,并且可以弥补单纯 HPV-DNA 检测特异性和阳性预测值低的缺点。我们之前的研究也表明某些特定的 E6/E7 变异可能有更高的致癌性,具体详见文章 (Gynecol Oncol 2010 ; 119 :436-43 Int J Gynecol Cancer 2010 ;20 :1391-8)。

[0008] 中国发明专利申请 (申请号 :201010151982.6 申请日 :2010-04-20) 公开了检测人乳头瘤病毒的基因芯片及试剂盒,基因芯片包括固相载体和固定在该固相载体上的人乳头瘤病毒检测探针,所述检测探针包括 SEQ ID No. 9-37 的核苷酸序列 ;包括 27 种 HPV 亚型特异性探针,对应包括了 22 种高危及中危型 HPV,5 种低危型 HPV 和 2 种高危型 HPV 整合 (HPV16/HPV18)。该专利包含的基因芯片是针对亚洲地区常见的 HR-HPV16、58、18、52 四种型别的 E6/E7 基因变异位点构建含有特定 SNP 位点的芯片,通过此芯片不仅可以检测样品中存在的 HR-HPV16、58、18、52 四种亚型,而且最主要的是检测四种亚型 E6/E7 基因特定位点的变异情况 (野生型或突变型)。本发明所建立的基因芯片是针对 HPV 类型设计的,探针设计在 L1 区域,主要检测样品中的 HPV 亚型 (如 HPV6、11、16、18、31、33 等)。

发明内容

[0009] 针对现有筛查技术敏感性低及主观性强以及 HPV-DNA 检测的低特异性和低阳性预测值,本发明的第一个目的是提供一种 HR-HPV E6/E7 基因 SNP 检测的固相芯片,该固相芯片包含 65 个 HR-HPV16、58、18、52E6/E7SNP 位点,可以弥补单纯 HPV-DNA 检测低特异性和低阳性预测值,检测具有快速、高通量的特点,从而更好的用于宫颈癌的筛查,做到宫颈癌的早期诊断和治疗。本发明的第二个目的是提供 HR-HPV E6/E7 基因 SNP 检测的探针引物。本发明的第二个目的是提供种用于 HR-HPV E6/E7 基因 SNP 检测的试剂盒。

[0010] 为了实现上述的第一个目的,本发明采用了以下的技术方案 :

[0011] HR-HPV E6/E7 基因 SNP 检测的固相芯片,该基因芯片包括固相载体和固定于其上的检测探针,其特征在于 :所述的 HR-HPV E6/E7 基因的一个基因具有多个突变 SNP 位点,每个突变 SNP 位点设计若干条的检测探针序列,所述的 HR-HPV E6/E7 基因的一个基因具有所述检测探针序列的一条或多条检测探针 ;所述的基因、突变 SNP 位点、检测探针序列如下所示 :

[0012]

[0013]

基因	突变	探针序列
HPV16E6	12 (G/A)	tgcaccaaaaagagaactgcaa
		tgcaccaaaaaagaactgcaa
	29 (A/C)	gcaatgttttcaggacccacag
		gcaatgttttcCggacccacag
	42 (G/A)	tgtttcaggacccacaggagc
		tgtttcaggacccacaggaac
		tgtttcaggacccacaggagc
		tgtttcaggacccacaggaac
	49 (A/C)	aggacccacagggaacgaccca
		aggacccacagggaacgacccc
		aggacccacaggagcgaccca
		aggacccacaggagcgacccc
		cggacccacagggaacgaccca
		cggacccacagggaacgacccc
		cggacccacaggagcgaccca
		cggacccacaggagcgacccc
	50 (G/C)	gacccacagggaacgacccaca
		gacccacagggaacgacccaga
		gacccacagggaacgaccccca
		gacccacagggaacgaccccga
		gacccacaggagcgacccaca
		gacccacaggagcgacccaga
		gacccacaggagcgaccccca
		gacccacaggagcgaccccga
	55 (T/G)	ggtaccacagttatgcacaga
		ggtaccacagttatgcacaga
		ggtaccacatttatgcacaga
		ggtaccacatttatgcacaga
	63 (G/T)	taccacagttatgcacagagc
		taccacatttatgcacagagc
	80 (A/C)	tatgcacagagctgcaaaca
		tatgcacagagctgccaaca
	86 (C/G)	cacagagctgcaaacaactat
		cacagagctgcaaacaagtat
		cacagagctgccaacaactat
		cacagagctgccaacaagtat
	91 (C/A)	cagagctgcaaacaactatac
		cagagctgcaaacaactataa
		cagagctgcaaacaagtatac
		cagagctgcaaacaagtataa
		cagagctgccaacaactatac
		cagagctgccaacaactataa
		cagagctgccaacaagtatac
		cagagctgccaacaagtataa

[0014]

96 (T/G)	ctgcaaacaactatacatgat
	ctgcaaacaactatacatgag
	ctgcaaacaactataaatgat
	ctgcaaacaactataaatgag
	ctgccaacaagtataaatgat
	ctgccaacaagtataaatgag
	ctgcaaacaagtataaatgat
	ctgcaaacaagtataaatgag
	ctgcaaacaagtatacatgat
	ctgcaaacaagtatacatgag
	ctgccaacaactatacatgat
	ctgccaacaactatacatgag
	ctgccaacaagtatacatgat
	ctgccaacaagtatacatgag
	ctgccaacaactataaatgat
	ctgccaacaactataaatgag
	101 (T/C)
	acaactataaatgatataaca
	acaactataaatgatataata
	acaagtatacatgatataaca
	acaagtatacatgatataata
	acaagtatacatgagataaca
	acaagtatacatgagataata
	acaactatacatgagataaca
	acaactatacatgagataata
	acaactataaatgagataaca
	acaactataaatgagataata
	acaactatacatgatataaca
	acaactatacatgatataata
	acaagtataaatgatataaca
	acaagtataaatgatataata
	acaagtataaatgagataaca
	acaagtataaatgagataata
	103 (T/G)
	agtacaatgtgtgtactgcaa
	attacaatgtgtgtactgcaa
	agtacaatgtgtgtactgcaa
	attacaatgtgtgtactgcaa
	agtacaatgtgtgtactgcaa
	attacaatgtgtgtactgcaa
	agtacaatgtgtgtactgcaa
	attacaatgtgtgtactgcaa
	106 (G/C)
	agtacaatgtgtgtactgcaa
	agtacaatgtgtgtactgcaa
	attacaatgtgtgtactgcaa
	attacaatgtgtgtactgcaa

[0015]

		agtacaatgtgtgtactgcga
		agtagaatgtgtgtactgcga
		attacaatgtgtgtactgcga
		attagaatgtgtgtactgcga
121 (A/G)		tgtgtactgcaagcaacagtt
		tgtgtactgagcaacagtt
158 (C/G)		gaggtatatgactttgctttt
		gaggtatatgactttggtttt
163 (C/T)		ttttcgggatttatgcatagt
		tttttgggatttatgcatagt
187 (G/A)		agtatatagagatgggaatcc
		agtatatagaaatgggaatcc
194 (A/G)		atgggaatccatatgctgtat
		atgggagtcacatatgctgtat
203 (C/G)		tccatatgctgtatgtgataa
		tccatatggtgtatgtgataa
235 (A/G)		gttttattctaaaattagtga
		gttttattctgaaattagtga
253 (C/T)		gagtatagacattattgttat
		gagtatagatattattgttat
268 (T/G)		attgttatagtgtgtatggaa
		attgttatagtttgtatggaa
278 (C/T)		tgtatggaacaacattagaac
		tgtatggaataacattagaac
337 (T/G)		gtgtattaactgtcaaaagcc
		gtgtattaacggtcaaaagcc
367 (C/G)		cctgaagaaaaccaaagaca
		cctgaagaaaagcaaagaca
		cctgcagaaaaccaaagaca
		cctgcagaaaagcaaagaca
375 (T/G)		aaagacagctggacaaaaagc
		aaagacatctggacaaaaagc
425 (G/A)		ggtggaccggtcaatgtatgt
		ggtggaccggtcgatgtatgt
434 (C/G)		atgtatgtcttgttgcagatc
		atgtatgtgttgttgcagatc
HPV16E7	45 (G/T)	tgttagatttgcaaccagaga
		tgttagattttcaaccagaga
	85 (A/C)	tgttatgagcaattaaatgac
		tgttatgagcaattacatgac
		tgttatgagcaattacgtgac
	86 (A/G)	tgttatgagcaattaaagtac
	136 (G/A)	tggacaagcagaaccggacag
		tggacaagcaaaaccggacag

[0016]

	151 (C/A)	ggacagagcccattacaatat
		ggacagagccaattacaatat
	169 (T/C)	cccattacaatatattgtaacct
		cccattacaatatattgtaaccc
		ccaattacaatatattgtaacct
		ccaattacaatatattgtaaccc
	171 (T/C)	taaccttttgttgcaagtgtg
		taaccttctgttgcaagtgtg
		taaccctttgttgcaagtgtg
		taaccctctgttgcaagtgtg
	188 (C/T)	aagtgtgactctacgcttcgg
		aagtgtgactttacgcttcgg
	196 (C/T)	tacgcttcggttggtgcgtaca
		tacgctttggttggtgcgtaca
	223 (G/A)	acacacgtagacattcgtact
		acacacgtaaacattcgtact
	258 (A/G)	taatgggcacactaggaattg
		taatgggcacgctaggaattg
	262 (G/A)	ctaggaattgtgtgccccatc
		ctaagaattgtgtgccccatc
HPV58E6	94 (G/C)	gaaatgcggtgaatgcaaaaa
		gaaatgcggtcaatgcaaaaa
	258 (C/A)	tatatggagaaacattagaac
		tatatggagacacattagaac
	279 (A/C)	aaacactaaaaaagtgtttaa
HPV58E7		aaacactaaacaagtgtttaa
	26 (G/A)	ccaacgctaagagaatatatt
		ccaacgctaaaagaatatatt
	40 (G/A)	atatatttttagatttacatcc
		atatatttttaaatttacatcc
	121 (G/A)	aggcttggacgggccagatgg
		aggcttggacaggccagatgg
	187 (G/A)	ttacacttgtggcaccacggt
		ttacacttgtagcaccacggt
	220 (A/G)	gtgtatcaacagtacaacaac
		gtgtatcaacagtacagcaac
	225 (C/T)	atcaacagtacaacaaccgaa
		atcaacagtacaacaactgaa
		atcaacagtacaacaaccgac
		atcaacagtacaacaactgac
		atcaacagtacagcaaccgaa
		atcaacagtacagcaactgaa
		atcaacagtacagcaaccgac
		atcaacagtacagcaactgac

[0017]

	228 (C/A)	atcaacagttacaacaaccgaa
		atcaacagttacaacaaccgac
		atcaacagttacaacaactgaa
		atcaacagttacaacaactgac
		atcaacagttacagcaaccgaa
		atcaacagttacagcaaccgac
		atcaacagttacagcaactgaa
		atcaacagttacagcaactgac
	230 (T/C)	gaagtaccaaccctacagcag
		gaagcaccaaccctacagcag
		gaagtacgaaccctacagcag
		gaagcacgaaccctacagcag
		gacgtaccaaccctacagcag
		gacgcaccaaccctacagcag
		gacgtacgaaccctacagcag
		gacgcacgaaccctacagcag
	233 (G/C)	gaagtacgaaccctacagcag
		gaagtaccaaccctacagcag
		gaagcacgaaccctacagcag
		gaagcaccaaccctacagcag
		gacgcacgaaccctacagcag
		gacgcaccaaccctacagcag
		gacgtacgaaccctacagcag
		gacgtaccaaccctacagcag
	251 (T/A)	cagcagctgcttatgggcaca
		cagcagctgcatatgggcaca
	272 (T/G)	tgtaccatttgtgtgccctagc
		tgtaccattgggtgccctagc
HPV18E6	49 (C/T)	gctacctgatctgtgcacgga
		gctacctgatttgtgcacgga
	183 (C/G)	acagtatacccatgtgtgcat
	445 (C/A)	acgacaggaacgactccaacg
HPV52E6		acgacaggaagactccaacg
	90 (T/C)	ggctgcagtggtgtgcagtgca
HPV52E7		ggctgcagtgcggtgcagtgca
	110 (C/T)	gaggaggatacagatggtgtg
		gaggaggatatagatggtgtg
	175 (T/G)	tactacatttgtgacatattgt
		tactacatttgtgacagattgt
	181 (C/T)	gtgacagattgtcacagttgt
		gtgacagattgttacagttgt
		gtgacatattgtcacagttgt
		gtgacatattgttacagttgt
	190 (G/A)	acagttgtgatagcacactac

[0018]

		acagttgtaatagcacactac
	249 (A/G)	ctctacagcaaattgctgttgg
		ctctacagcagatgctgttgg
	296 (T/G)	cccggctgtgcacggctataa
		cccggctgtgcacggcgataa

[0019] 为了实现上述的第二个目的,本发明采用了以下的技术方案:

[0020] HR-HPV E6/E7 基因 SNP 检测的探针,该探针具有 SEQID No. 1-225 的核苷酸序列之一的序列。

[0021] 本发明的除 SEQID No. 115-118 外特异性探针长度为 21 碱基,探针的 T_m 值均一性与杂交特异性通过探针合成过程中的特殊碱基修饰获得,使得探针和对应的 PCR 产物杂交时最佳温度条件基本一致,有利于在同一杂交温度下以相近的效率同步结合,使检测准确性大大增加。

[0022] 为了实现上述的第二个目的,本发明采用了以下的技术方案:

[0023] 一种用于 HR-HPV E6/E7 基因 SNP 检测的试剂盒,该试剂盒包括:

[0024] 1) 包含 HR-HPV 样品的裂解液;

[0025] 2) 掺入荧光的多重 PCR 反应液;

[0026] 3) 权利要求 1 所述的固相芯片。

[0027] 作为优选,所述的多重 PCR 的引物如下所示:

[0028]

HPV16E6F	CGAAACCGTTAGTATAA
HPV16E6R	GTATCTCCATGCATGATT
HPV16E7F	CTGAAGAAAAGCAAAGACATC
HPV16E7R	CATTACATCCCGTACCCTC
HPV58E6F	AATGCCAAATCTTGTA AAAACTAGG
HPV58E6R	CATAATTGCTCATAGCAGAA
HPV58E7F	ACAAGTGTAACCTGTAACAACGC
HPV58E7R	TTGTACCTTCAGGGTCATCCA
HPV52E6F	TAACCGAAAACGGTCAGA
HPV52E6R	GTTTCAGGTTGCAGATCTAAT
HPV52E7F	ATATTATGGGTCGTTGGACA
HPV52E7R	CCTGTACATCCCTCCCTTTC
HPV18E6F	GAAAACGGTGTATATAAAAGATGTG
HPV18E6R	GTCAACCGGAATTCATTTTG

[0029] 作为优选,所述的裂解液的成分为 0.01M Tris-HCL pH 8.0, 0.005M EDTA pH 8.0, SDS 0.5%。

[0030] 作为优选,所述的多重 PCR 反应液包括:

[0031]

Onetaq	5u/μl
DATP	100mM
DTPP	100mM
DGTP	100mM
DCTP	100mM
CY3-DCTP	1nm/ul
20×SSPE	
SDS	

100×BSA
EDTA
Nuclease-free water
HCONH2
PCR 产物纯化试剂盒
无水乙醇

- [0032] 作为优选,所述的掺入荧光物质为 cy3-dCTP。
- [0033] 作为优选,所述的该试剂盒的阳性对照为人 β-globin 基因,其扩增引物如下,与 HR-HPVE6/E7 同时扩增,同时检测：
- [0034] β-globin GH20 5'-TTCCAGCCTTCCTTCCTGG-3'
- [0035] β-globin PC04 5'-TTGCGCTCAGGAGGAGCAAT-3'。
- [0036] 利用本发明试剂盒的检测方法的具体步骤如下：
- [0037] (1) 扩增样品：将临床样本中提取的 DNA 进行多重 PCR,所用引物如上,分为两组扩增,扩增得到带有 cy3-dCTP 荧光标记的 HR-HPV16、58、18、52E6/E7 基因序列；
- [0038] (2) 杂交：将上述扩增得到的 DNA 序列与基因芯片上分布的 DNA 探针进行反应；
- [0039] (3) 扫描：将杂交信号进行扫描；
- [0040] (4) 结果判读：将芯片扫描后的原始图像信息转变成数字信息,按照芯片探针检出情况判断样品 HPV 类型及 E6/E7SNP 情况。
- [0041] 本发明的用于检测方法能够快速、准确度检测出 HPV 感染及鉴定常见的四种高危亚型,同时能准确的检测出 HR-HPV16、58、18、52E6/E7 基因 SNP 位点情况,操作简单,快速,对于宫颈癌的早期诊断、预防、治疗具有重大意义。

附图说明

- [0042] 图 1 为四种类型 HPV7 个基因的所有探针布局图。

具体实施方式

- [0043] 实施例 1：探针设计及构建芯片
- [0044] 本发明的 HR-HPVE6/E7SNP 信息如表 1；
- [0045] 表 1. 用于构建检测芯片的 SNP 位点
- [0046]

Gene Name	Length	Number of SNP	SNP Information
HPV16E6	477bp	29	12(G/A) 29(A/C)42(G/A)49(A/C) 50(G/C) 55(T/G)
			63(G/T) 80(A/C) 86(C/G) 91(C/A) 96(T/G)101(T/C)
			103(T/G)106(G/C)121(A/G)158(C/G)163(C/T)187(G/A)
			194(A/G)203(C/G)235(A/G)253(C/T)268(T/G)278(C/T)
			337(T/G) 367(C/G)375(T/G)425(G/A)434(C/G)
HPV16E7	297bp	12	45(G/T) 85(A/C) 86(A/G) 136(G/A)151(C/A)169(T/C)
			171(T/C)188(C/T)196(C/T)223(G/A) 258(A/G)
HPV58E6	450bp	3	262(G/A)
			94(G/C)258(C/A)279(A/C)
HPV58E7	297bp	11	26(G/A)40(G/A)121(G/A) 187(G/A)220(A/G)
			225(C/T)228(C/A)230(T/C)233(G/C) 251(T/A)272(T/G)
HPV52E6	447bp	1	90(T/C)
HPV52E7	300bp	6	110(C/T)175(T/G)181(C/T)190(G/A)249(A/G)
			296(T/G)
HPV18E6	477bp	3	49(C/T) 183(C/G) 445(C/A)

[0047] 在本发明中,为了探讨我们的芯片能够更好的区分四种 HR-HPV 类型以及各个类型里面的各 HPVE6/E7 基因的 SNP 位点,在一张芯片当中重复设计相同的两组探针,其中当中放置本研究拟放置的 4 个 HPV 类型的 7 个基因的探针序列,并且重复一次,如图 1 中的芯片布局情况;

[0048] 本实施例所述探针包括 SEQ ID No. 1-225 的核苷酸序列,对应每一个 SNP 位点都有一对及以上探针,采用多组探针的信号强度来对每一个 SNP 位点信号值进行研判,以降低其临近 SNP 位点的干扰。

[0049] 探针设计,由于位点在基因中的位置是固定的,决定了探针设计的难度,为了更好的检测出每个特定的 SNP 位点,采用“Tilling”原则,即用一组探针来决定一个 SNP 位点,由于位点较靠近,所以一条探针可能包含多个相邻的 SNP 位点,最后,针对 65 个 SNP 位点,设计了 225 条探针,采用定制芯片的原理,构建成基因芯片。225 条探针的序列如下表:

[0050]

说明书

CN 102703606 A

基因	突变	探针 ID	探针序列	靶序列	SEQ
HPV16E6	12 (G/A)	HPV16E6-12G	tgcaccacaaaagagaactgcaa	UUGCAGUUCUCUUUUUGUGCA	No.1
		HPV16E6-12A	tgcaccacaaaagaactgcaa	UUGCAGUUCUUUUUGUGCA	No.2
	29 (A/C)	HPV16E6-29A	gcaatgtttcaggaaccacag	CUGUGGGUCCUGAACAACAUUGC	No.3
		HPV16E6-29C	gcaatgtttcCggaaccacag	CUGUGGGUCCGGAACAACAUUGC	No.4
	42 (G/A)	HPV16E6-29A42G-1	tgtttcaggaaccacagagagc	GCUCCUGUGGGUCCUGAACA	No.5
		HPV16E6-29A42A-1	tgtttcaggaaccacaggaac	GUUCCUGUGGGUCCUGAACA	No.6
		HPV16E6-29C42G-1	tgtttcCggaaccacagagagc	GCUCCUGUGGGUCCGGAACA	No.7
		HPV16E6-29C42A-1	tgtttcCggaaccacaggaac	GUUCCUGUGGGUCCGGAACA	No.8
	49 (A/C)	HPV16E6-29A42A49A	aggaaccacaggaacgaccca	UGGGUCGUUCUUGUGGUCU	No.9
		HPV16E6-29A42A49C	aggaaccacaggaacgacccc	GGGGUCGUUCUUGUGGUCU	No.10
		HPV16E6-29A42G49A	aggaaccacaggaagcgaccca	UGGGUCGUUCUUGUGGUCU	No.11
		HPV16E6-29A42G49C	aggaaccacaggaagcgacccc	GGGGUCGUUCUUGUGGUCU	No.12
		HPV16E6-29C42A49A	cggaaccacaggaacgaccca	UGGGUCGUUCUUGUGGUCG	No.13
		HPV16E6-29C42A49C	cggaaccacaggaacgacccc	GGGGUCGUUCUUGUGGUCG	No.14
		HPV16E6-29C42G49A	cggaaccacaggaagcgaccca	UGGGUCGUUCUUGUGGUCG	No.15
		HPV16E6-29C42G49C	cggaaccacaggaagcgacccc	GGGGUCGUUCUUGUGGUCG	No.16
	50 (G/C)	HPV16E6-42A49A50C-1	gaccacacaggaacgacccaca	UGUGGGUCGUUCUUGGGUC	No.17
		HPV16E6-42A49A50G-1	gaccacacaggaacgacccaga	UCUGGGUCGUUCUUGGGUC	No.18
		HPV16E6-42A49C50C-1	gaccacacaggaacgaccccca	UGGGGUCGUUCUUGGGUC	No.19
		HPV16E6-42A49C50G-1	gaccacacaggaacgaccccca	UGGGGUCGUUCUUGGGUC	No.20
		HPV16E6-42G49A50C-1	gaccacacaggaagcgacccaca	UGUGGGUCGUUCUUGGGUC	No.21
		HPV16E6-42G49A50G-1	gaccacacaggaagcgacccaga	UCUGGGUCGUUCUUGGGUC	No.22
		HPV16E6-42G49C50C-1	gaccacacaggaagcgaccccca	UGGGGUCGUUCUUGGGUC	No.23
		HPV16E6-42G49C50G-1	gaccacacaggaagcgaccccca	UGGGGUCGUUCUUGGGUC	No.24
	55 (T/G)	HPV16E6-55G63G-11	ggtaccacagttatgcacaga	UCUGUGCAUAAACUGUGGUACC	No.25
		HPV16E6-55T63G-11	gltaccacagttatgcacaga	UCUGUGCAUAAACUGUGGUACC	No.26
		HPV16E6-55G63T-11	gltaccacatttatgcacaga	UCUGUGCAUAAAUUGUGGUACC	No.27
		HPV16E6-55T63T-11	gltaccacatttatgcacaga	UCUGUGCAUAAAUUGUGGUACC	No.28

[0051]

	63 (G/T)	HPV16E6-63G	taccacagttatgacagagc	GCUCUGUGCAUACUGUGUA	NO. 29
		HPV16E6-63T	taccacatttatgacagagc	GCUCUGUGCAUAAUUGGUA	NO. 30
	80 (A/C)	HPV16E6-80A	tatgacacagagctgcaacaa	UUGUUUGGACGUCUGUGCAUA	NO. 31
		HPV16E6-80C	tatgacacagagctgccaacaa	UUGUUUGGACGUCUGUGCAUA	NO. 32
	86 (C/G)	HPV16E6-80A86C-3	cacagagctgcaacaactat	AUAGUUGUUUGGACGUCUGUG	NO. 33
		HPV16E6-80A86C-3	cacagagctgcaacaagtat	AUACUUGUUUGGACGUCUGUG	NO. 34
		HPV16E6-80C86C-3	cacagagctgccaacaactat	AUAGUUGUUUGGACGUCUGUG	NO. 35
		HPV16E6-80C86G-3	cacagagctgccaacaagtat	AUACUUGUUUGGACGUCUGUG	NO. 36
	91 (C/A)	HPV16E6-80A86C91C	cagagctgcaacaactatac	GUAAUAGUUUGGACGUCUCUG	NO. 37
		HPV16E6-80A86C91A	cagagctgcaacaactataa	UUAUAGUUUGGACGUCUCUG	NO. 38
		HPV16E6-80A86G91C	cagagctgcaacaagtatac	GUAAUACUUGUUUGGACGUCUG	NO. 39
		HPV16E6-80A86G91A	cagagctgcaacaagtataa	UUAUACUUGUUUGGACGUCUG	NO. 40
		HPV16E6-80C86C91C	cagagctgccaacaactatac	GUAAUAGUUUGGACGUCUCUG	NO. 41
		HPV16E6-80C86C91A	cagagctgccaacaactataa	UUAUAGUUUGGACGUCUCUG	NO. 42
		HPV16E6-80C86G91C	cagagctgccaacaagtatac	GUAAUACUUGUUUGGACGUCUG	NO. 43
		HPV16E6-80C86G91A	cagagctgccaacaagtataa	UUAUACUUGUUUGGACGUCUG	NO. 44
	96 (T/G)	HPV16E6-80A86C91C96T	ctgccaacaactatacatgat	AUCAUGUAAUAGUUGUUGGCAG	NO. 45
		HPV16E6-80A86C91C96G	ctgccaacaactatacatgat	CUCAUGUAAUAGUUGUUGGCAG	NO. 46
		HPV16E6-80A86C91A96T	ctgccaacaactataaatgat	AUCAUUUAUAGUUGUUGGCAG	NO. 47
		HPV16E6-80A86C91A96G	ctgccaacaactataaatgat	CUCAUUUAUAGUUGUUGGCAG	NO. 48
		HPV16E6-80C86G91A96T	ctgccaacaagtataaatgat	AUCAUUUAUACUUGUUGGCAG	NO. 49
		HPV16E6-80C86G91A96G	ctgccaacaagtataaatgat	CUCAUUUAUACUUGUUGGCAG	NO. 50
		HPV16E6-80A86G91A96T	ctgccaacaagtataaatgat	AUCAUUUAUACUUGUUGGCAG	NO. 51
		HPV16E6-80A86G91A96G	ctgccaacaagtataaatgat	CUCAUUUAUACUUGUUGGCAG	NO. 52
		HPV16E6-80A86G91C96T	ctgccaacaagtatacatgat	AUCAUGUAAUACUUGUUGGCAG	NO. 53
		HPV16E6-80A86G91C96G	ctgccaacaagtatacatgat	CUCAUGUAAUACUUGUUGGCAG	NO. 54
		HPV16E6-80C86C91C96T	ctgccaacaactatacatgat	AUCAUGUAAUAGUUGUUGGCAG	NO. 55
		HPV16E6-80C86C91C96G	ctgccaacaactatacatgat	CUCAUGUAAUAGUUGUUGGCAG	NO. 56
		HPV16E6-80C86G91C96T	ctgccaacaagtatacatgat	AUCAUGUAAUACUUGUUGGCAG	NO. 57

[0052]

	HPV16E6-80C86G91C96G	ctgccacaagtatacatgag	CUCAUGUAUACUUGUGGCAG	NO. 58
	HPV16E6-80C86C91A96T	ctgccacaactataaatgat	AUCAUUUAUAGUUGUGGCAG	NO. 59
	HPV16E6-80C86C91A96G	ctgccacaactataaatgag	CUCAUUUAUAGUUGUGGCAG	NO. 60
101 (T/C)	HPV16E686C91A96T101C-1	acaactataaatgatataaca	UGUUUAUACAUAUUAAGUUGU	NO. 61
	HPV16E686C91A96T101T-1	acaactataaatgatataata	UAUUUAUACAUAUUAAGUUGU	NO. 62
	HPV16E686G91C96T101C-1	acaagtatacatgatataaca	UGUUUAUACAUGUAUACUUGU	NO. 63
	HPV16E686G91C96T101T-1	acaagtatacatgatataata	UAUUUAUACAUGUAUACUUGU	NO. 64
	HPV16E686G91C96G101C-1	acaagtatacatgagataaca	UGUUUAUCUACUGUAUACUUGU	NO. 65
	HPV16E686G91C96G101T-1	acaagtatacatgagataata	UAUUUAUCUACUGUAUACUUGU	NO. 66
	HPV16E686C91C96G101C-1	acaactatacatgagataaca	UGUUUAUCUACUGUAUAGUUGU	NO. 67
	HPV16E686C91C96G101T-1	acaactatacatgagataata	UAUUUAUCUACUUAUAGUUGU	NO. 68
	HPV16E686C91A96G101C-1	acaactataaatgagataaca	UGUUUAUCUACUUAUAGUUGU	NO. 69
	HPV16E686C91A96G101T-1	acaactataaatgagataata	UAUUUAUCUACUUAUAGUUGU	NO. 70
	HPV16E686C91C96T101C-1	acaactatacatgatataaca	UGUUUAUACAUGUAUAGUUGU	NO. 71
	HPV16E686C91C96T101T-1	acaactatacatgatataata	UAUUUAUACAUGUAUAGUUGU	NO. 72
	HPV16E686G91A96T101C-1	acaagtataaatgatataaca	UGUUUAUACAUAUUAUACUUGU	NO. 73
	HPV16E686G91A96T101T-1	acaagtataaatgatataata	UAUUUAUACAUAUUAUACUUGU	NO. 74
	HPV16E686G91A96G101C-1	acaagtataaatgagataaca	UGUUUAUCUACUUAUACUUGU	NO. 75
	HPV16E686G91A96G101T-1	acaagtataaatgagataata	UAUUUAUCUACUUAUACUUGU	NO. 76
103 (T/G)	HPV16E6103G106C121A-1	agtagaatgtgtgtactgcaa	UUGCAGUACACACAUUGUACU	NO. 77
	HPV16E6103T106C121A-1	attacaatgtgtgtactgcaa	UUGCAGUACACACAUUGUAU	NO. 78
	HPV16E6103G106C121G-1	agtacaatgtgtgtactgcaa	UUGCAGUACACACAUUGUACU	NO. 79
	HPV16E6103T106C121G-1	attacaatgtgtgtactgcaa	UUGCAGUACACACAUUGUAU	NO. 80
	HPV16E6103G106G121A-1	agtagaatgtgtgtactgcaa	UUGCAGUACACACAUUCUACU	NO. 81
	HPV16E6103T106G121A-1	attagaatgtgtgtactgcaa	UUGCAGUACACACAUUCUAU	NO. 82
	HPV16E6103G106G121G-1	agtagaatgtgtgtactgcaa	UUGCAGUACACACAUUCUACU	NO. 83
	HPV16E6103T106G121G-1	attagaatgtgtgtactgcaa	UUGCAGUACACACAUUCUAU	NO. 84
106 (G/C)	HPV16E6103G106C121A-1	agtagaatgtgtgtactgcaa	UUGCAGUACACACAUUGUACU	NO. 85
	HPV16E6103G106G121A-1	agtagaatgtgtgtactgcaa	UUGCAGUACACACAUUCUACU	NO. 86

[0053]

	HPV16E6103T106C121A-1	attacaatgtgtgtactgcaa	UUGCAGUACACACAUUGUAU	NO. 87
	HPV16E6103T106G121A-1	attagaatgtgtgtactgcaa	UUGCAGUACACACAUUCCUAU	NO. 88
	HPV16E6103G106C121G-1	agtaacaatgtgtgtactgca	UCGCAGUACACACAUUGUACU	NO. 89
	HPV16E6103G106G121G-1	agtagaatgtgtgtactgca	UCGCAGUACACACAUUCCUACU	NO. 90
	HPV16E6103T106C121G-1	attacaatgtgtgtactgca	UCGCAGUACACACAUUGUAU	NO. 91
	HPV16E6103T106G121G-1	attagaatgtgtgtactgca	UCGCAGUACACACAUUCCUAU	NO. 92
121 (A/G)	HPV16E6-121A	tgtgtactgcaagcaacaagt	AACUGUUGCUUGCAGUACACA	NO. 93
	HPV16E6-121G	tgtgtactgcaagcaacaagt	AACUGUUGCUUGCAGUACACA	NO. 94
158 (C/G)	HPV16E6-158C	gaagtatatgactttgctttt	AAAAGCAAAGUCAUAUACCUC	NO. 95
	HPV16E6-158G	gaagtatatgactttgctttt	AAAACCAAAGUCAUAUACCUC	NO. 96
163 (C/T)	HPV16E6-163C	ttttcgggatttatgcatagt	ACUAUGCAUAAAUCCCGAAAA	NO. 97
	HPV16E6-163T	tttttgggatttatgcatagt	ACUAUGCAUAAAUCCCAAAAA	NO. 98
187 (G/A)	HPV16E6-187G	agtatatagagatgggaatcc	GGAUUCCCAUUCUUAUAUACU	NO. 99
	HPV16E6-187A	agtatatagaaatgggaatcc	GGAUUCCCAUUVUUAUAUACU	NO. 100
194 (A/G)	HPV16E6-194A	atgggaatccatatgtgttat	AUACAGCAUAUGAUUCCCAU	NO. 101
	HPV16E6-194G	atgggaatccatatgtgttat	AUACAGCAUAUGGACUCCCAU	NO. 102
203 (C/G)	HPV16E6-203C	tccatatgctgtatgtgataa	UUAUCCACAUACAGCAUAUUGA	NO. 103
	HPV16E6-203G	tccatatggtgtatgtgataa	UUAUCCACAUACACCAUAUUGA	NO. 104
235 (A/G)	HPV16E6-235A	gttttattcttaaaaattagtga	UCACUAAUUUUAGAAUAAAAC	NO. 105
	HPV16E6-235G	gttttattctgaaattagtga	UCACUAAUUUUCAGAAUAAAAC	NO. 106
253 (C/T)	HPV16E6-253C	gagtatagacattatgtttat	AUAACAUAUAUUGUCUAUACUC	NO. 107
	HPV16E6-253T	gagtatagatatatttgttat	AUAACAUAUAUUAUCCUAUACUC	NO. 108
268 (T/G)	HPV16E6-268G	attgtttatagtggtgtatgaa	UUCCAUVACACACUAUAACAUAU	NO. 109
	HPV16E6-268T	attgtttatagtttgtatgaa	UUCCAUVACAACUAUAACAUAU	NO. 110
278 (C/T)	HPV16E6-278C	tgtatggaacaacattagaac	GUUUCUAAUGUUUUCCAUACA	NO. 111
	HPV16E6-278T	tgtatggaataacattagaac	GUUUCUAAUGUUAUUCCAUACA	NO. 112
337 (T/G)	HPV16E6-337G	gtgtatctaactgtlcaaaaagcc	GGCUUUUUGACAGUUAUAUACAC	NO. 113
	HPV16E6-337T	gtgtatctaacygtlcaaaaagcc	GGCUUUUUGACCGUUAUAUACAC	NO. 114
367 (C/G)	HPV16E6-360A367C	ccttgaagaaaaccctaaagaca	UGUCUUUUGGUUUUCCUUCAGG	NO. 115

[0054]

说明书

		HPV16E6-360A367G	cctgaagaaagcaagaca	UGUCUUUGCUUUUUCUCCAGG	NO.116
		HPV16E6-360C367C	cctgcagaaaaccaaaagaca	UGUCUUUGGUUUUUCUGCAGG	NO.117
		HPV16E6-360C367G	cctgcagaaagcaaaagaca	UGUCUUUGCUUUUUCUGCAGG	NO.118
	375 (T/G)	HPV16E6-375G	aaagacagctggacaaaaagc	GCUUUUUUGUCCAGCUGUCUUU	NO.119
		HPV16E6-375T	aaagacatctggacaaaaagc	GCUUUUUUGUCCAGAUUCUUUU	NO.120
	425 (G/A)	HPV16E6-425A	ggtggaccggtcaatgtatgt	ACAUACAUUGACCGGUCCACC	NO.121
		HPV16E6-425G	ggtggaccggtcgatgtatgt	ACAUACAUCGACCGGUCCACC	NO.122
	434 (C/G)	HPV16E6-434C	atgtatgtctgtgtgcagatc	GAUCUGCAACAAGACAUACAU	NO.123
		HPV16E6-434G	atgtatgtgtgtgtgtgcagatc	GAUCUGCAACAACACAUACAU	NO.124
	45 (G/T)	HPV16F7-45G	tggttagatttgcaaccagaga	UCUCUGGUUGCAAAUUCUACA	NO.125
HPV16E7		HPV16F7-45T	tggttagatttccaaccagaga	UCUCUGGUUGGAAAUUCUACA	NO.126
	85 (A/C)	HPV16F7-85A86A-4	tggtatgagcaatlaaatgac	GUCAUUUAUUUGCUCAUAACA	NO.127
		HPV16F7-85C86A-4	tggtatgagcaattacatgac	GUCAUGUAUUUGCUCAUAACA	NO.128
		HPV16F7-85C86G-4	tggtatgagcaattacgtgac	GUCAUGUAUUUGCUCAUAACA	NO.129
	86 (A/G)	HPV16F7-85A86G-4	tggtatgagcaattagtac	GUCAUUUAUUUGCUCAUAACA	NO.130
	136 (G/A)	HPV16F7-136G	tggtatgagcagaaccggacag	CUGUCCGGUUUCUGCUUGUCCA	NO.131
		HPV16F7-136A	tggtatgagcaaaaaccggacag	CUGUCCGGUUUUUGCUUGUCCA	NO.132
	151 (C/A)	HPV16F7-151C	ggacagagcccaattacaatat	AUAUUUGUAUUGGCCUCUGUCC	NO.133
		HPV16F7-151A	ggacagagcccaattacaatat	AUAUUUGUAUUGGCCUCUGUCC	NO.134
	169 (T/C)	HPV16F7-151C169T	cccattacaatatgttaacct	AGGUUACAUAUUUGUAUUGGG	NO.135
		HPV16F7-151C169C	cccattacaatatgttaacct	GGGUUACAUAUUUGUAUUGGG	NO.136
		HPV16F7-151A169T	ccaattacaatatgttaacct	AGGUUACAUAUUUGUAUUGGG	NO.137
		HPV16F7-151A169C	ccaattacaatatgttaacct	GGGUUACAUAUUUGUAUUGGG	NO.138
	171 (T/C)	HPV16F7-169C171T-13	taaccttltgttgcaagtgtg	CACACUUUGCAACAAGGUUA	NO.139
		HPV16F7-169C171C-13	taaccttltgttgcaagtgtg	CACACUUUGCAACAAGGUUA	NO.140
		HPV16F7-169T171T-13	taacccttltgttgcaagtgtg	CACACUUUGCAACAAGGUUA	NO.141
		HPV16F7-169T171C-13	taacccttltgttgcaagtgtg	CACACUUUGCAACAAGGUUA	NO.142
	188 (C/T)	HPV16F7-188C	aagtgtgactctacgcttcgg	CCGAAAGCGUAGAGUCACACUU	NO.143
		HPV16F7-188T	aagtgtgactttaagcttcgg	CCGAAAGCGUAAAGUCACACUU	NO.144

[0055]

说明书

CN 102703606 A

	196 (C/T)	HPV16F7-196C	taacgcttcggtgtgtgcgtaca	UGUACGCACACCAAGCGUA	NO. 145
		HPV16F7-196T	taacgcttgggtgtgtgcgtaca	UGUACGCACACCAAGCGUA	NO. 146
	223 (G/A)	HPV16F7-223G	acacacgtagacatcgtact	AGUACGAUUGUUCUGUGUGU	NO. 147
		HPV16F7-223A	acacacgtaaacatcgtact	AGUACGAUUGUUAUGUGUGU	NO. 148
	258 (A/G)	HPV16F7-258A	taatgggcacacactaggaattg	CAAUUCCUAGUGUGGCCAUUA	NO. 149
		HPV16F7-258G	taatgggcacacactaggaattg	CAAUUCCUAGCGUGGCCAUUA	NO. 150
	262 (G/A)	HPV16F7-262G	ctaggaattgtgtgtcccatc	GAUGGGGCACACAUAUCCUAG	NO. 151
		HPV16F7-262A	ctaagaattgtgtgtcccatc	GAUGGGGCACACAUAUCCUAG	NO. 152
	94 (G/C)	HPV58E6-94G	gaaatgcgttgaatgcaaaaa	UUUUUGCAUUCACGCAUUVU	NO. 153
		HPV58E6-94C	gaaatgcgttcaatgcaaaaa	UUUUUGCAUUGAACGCAUUVU	NO. 154
HPV58E6	258 (C/A)	HPV58E6-258A	tatatggagaacacattagaac	GUUCUAAUGUUUCUCCAUUA	NO. 155
		HPV58E6-258C	tatatggagacacattagaac	GUUCUAAUGUGUCUCCAUUA	NO. 156
	279 (A/C)	HPV58E6-279A	aaacactaaaaaagtglttaa	UUAAACACUUUUUUAUGUUU	NO. 157
		HPV58E6-279C	aaacactaaacaagtgttaa	UUAAACACUUUGUUUAUGUUU	NO. 158
	26 (G/A)	HPV58E7-26G	ccaacgctaagagaatatatt	AAUUAUUCUUCUUVAGCGUUG	NO. 159
HPV58E7		HPV58E7-26A	ccaacgctaaaaagaatatatt	AAUUAUUCUUCUUUAGCGUUG	NO. 160
	40 (G/A)	HPV58E7-40G	atatatttagatttacatcc	GGAUGUAAAUUCUAAAUAUAU	NO. 161
		HPV58E7-40A	atatattttaatttacatcc	GGAUGUAAAUUUUAAUAUAU	NO. 162
	121 (G/A)	HPV58E7-121G	aggcttggacgggccagatgg	CCAUCUGGCCCGUCCAAGCCU	NO. 163
		HPV58E7-121A	aggcttggacagggccagatgg	CCAUCUGGCCUUGCCAAGCCU	NO. 164
	187 (G/A)	HPV58E7-187G	ttacacttgtggcaccacggt	ACCGUGGUGCCACAAGUGUAA	NO. 165
		HPV58E7-187A	ttacacttgttagcaccacggt	ACCGUGGUGCUACAAGUGUAA	NO. 166
	220 (A/G)	HPV58E7-220A	gtgtatcaacagttacaacaac	GUUGUUGUACUGUUGAUACAC	NO. 167
		HPV58E7-220G	gtgtatcaacagttacagcaac	GUUGUUGUACUGUUGAUACAC	NO. 168
	225 (C/T)	HPV58E7-220A225C228A	atcaacagttacaacaaccgaa	UUCGUGUUGUACUGUUGAU	NO. 169
		HPV58E7-220A225T228A	atcaacagttacaacaactgaa	UUCAGUUGUUGUACUGUUGAU	NO. 170
		HPV58E7-220A225C228C	atcaacagttacaacaaccgac	GUCGUGUUGUUGUACUGUUGAU	NO. 171
		HPV58E7-220A225T228C	atcaacagttacaacaactgac	GUCAGUUGUUGUACUGUUGAU	NO. 172
		HPV58E7-220G225C228A	atcaacagttacagcaaccgaa	UUCGUGUUGUUGUACUGUUGAU	NO. 173

[0056]

	HPV58E7-220G225T228A	atcaacagttacagcaactgaa	UUCAGUUGCUGUACUGUUGAU	NO.174
	HPV58E7-220G225C228C	atcaacagttacagcaaccgac	GUCCGUUGCUGUACUGUUGAU	NO.175
	HPV58E7-220G225T228C	atcaacagttacagcaactgac	GUCCAGUUGCUGUACUGUUGAU	NO.176
228 (C/A)	HPV58E7-220A225C228A	atcaacagttacaacaaccgaa	UUCGGUUGUUGUACUGUUGAU	NO.177
	HPV58E7-220A225C228C	atcaacagttacaacaaccgac	GUCCGUUGUUGUACUGUUGAU	NO.178
	HPV58E7-220A225T228A	atcaacagttacaacaactgaa	UUCAGUUGUUGUACUGUUGAU	NO.179
	HPV58E7-220A225T228C	atcaacagttacaacaactgac	GUCCAGUUGUUGUACUGUUGAU	NO.180
	HPV58E7-220G225C228A	atcaacagttacagcaaccgaa	UUCGGUUGCUGUACUGUUGAU	NO.181
	HPV58E7-220G225C228C	atcaacagttacagcaaccgac	GUCCGUUGCUGUACUGUUGAU	NO.182
	HPV58E7-220G225T228A	atcaacagttacagcaactgaa	UUCAGUUGCUGUACUGUUGAU	NO.183
	HPV58E7-220G225T228C	atcaacagttacagcaactgac	GUCCAGUUGCUGUACUGUUGAU	NO.184
230 (T/C)	HPV58E7-228A230T233C	gaagtlaccaaccctacagcag	CUCCUUGUAGGGUUGGUACUUC	NO.185
	HPV58E7-228A230C233C	gaagcaccaaccctacagcag	CUCCUUGUAGGGUUGGUUUC	NO.186
	HPV58E7-228A230T233G	gaagtlacgaaccctacagcag	CUCCUUGUAGGGUUGGUACUUC	NO.187
	HPV58E7-228A230C233G	gaagcacgaaccctacagcag	CUCCUUGUAGGGUUGGUUUC	NO.188
	HPV58E7-228C230T233C	gacgtlaccacccctacagcag	CUCCUUGUAGGGUUGGUACGUC	NO.189
	HPV58E7-228C230C233C	gacgtcaccaaccctacagcag	CUCCUUGUAGGGUUGGUUGCUC	NO.190
	HPV58E7-228C230T233G	gacgtlaccgaaccctacagcag	CUCCUUGUAGGGUUGGUACGUC	NO.191
	HPV58E7-228C230C233G	gacgtcacgaaccctacagcag	CUCCUUGUAGGGUUGGUUGCUC	NO.192
233 (G/C)	HPV58E7-228A230T233G	gaagtlacgaaccctacagcag	CUCCUUGUAGGGUUGGUACUUC	NO.193
	HPV58E7-228A230T233C	gaagtlaccacccctacagcag	CUCCUUGUAGGGUUGGUACUUC	NO.194
	HPV58E7-228A230C233G	gaagcacgaaccctacagcag	CUCCUUGUAGGGUUGGUUUC	NO.195
	HPV58E7-228A230C233C	gaagcaccaaccctacagcag	CUCCUUGUAGGGUUGGUUUC	NO.196
	HPV58E7-228C230C233G	gacgtcacgaaccctacagcag	CUCCUUGUAGGGUUGGUUGCUC	NO.197
	HPV58E7-228C230C233C	gacgtcaccaaccctacagcag	CUCCUUGUAGGGUUGGUUGCUC	NO.198
	HPV58E7-228C230T233G	gacgtlaccgaaccctacagcag	CUCCUUGUAGGGUUGGUACGUC	NO.199
	HPV58E7-228C230T233C	gacgtlaccacccctacagcag	CUCCUUGUAGGGUUGGUACGUC	NO.200
251 (T/A)	HPV58E7-251T	cagcagctgtctatgygcaca	UGUGCCCAUUAAGCAGCUGCUG	NO.201
	HPV58E7-251A	cagcagctgtcatatgygcaca	UGUGCCCAUUAUGCAGCUGCUG	NO.202

[0057]

说明书

	272 (T/G)	HPV58E7-272T	tgtaaccattgtgtgtccctagc	GCUAGGGGCACACAUGGUACA	No. 203
		HPV58E7-272G	tgtaccattggtgtccctagc	GCUAGGGGCACCCAAUGGUACA	No. 204
	49 (C/T)	HPV18E6-49C	gttaccctgatctgtgcacgga	UCCGUGCACAGAUCAAGGUAGC	No. 205
		HPV18E6-49T	gtctacctgatattgtgcacgga	UCCGUGCACAAAUCAAGGUAGC	No. 206
HPV18E6	183 (C/G)	HPV18E6-183C	acagltatacccatgtctgcac	AUUGCAGCAUUGGGGUUAUACUGU	No. 207
	445 (C/A)	HPV18E6-445C	acgacacggaacgactccaacg	CGUUGGAGUCCGUUCCUGUCGU	No. 208
		HPV18E6-445A	acgacacggaagaactccaacg	CGUUGGAGUCUUUCCUGUCGU	No. 209
	90 (T/C)	HPV52E6-90T	ggctgcagtggtgtgcagtgca	UGCACUGCACACACUCUGCAGCC	No. 210
HPV52E6		HPV52E6-90C	ggctgcagtggtgtgcagtgca	UGCACUGCACGCACUCUGCAGCC	No. 211
	110 (C/T)	HPV52E7-110C	gaggaagatatacagatgtgtg	CACACCAUUCUGAUUCCUCCUC	No. 212
		HPV52E7-110T	gaggaagatatacagatgtgtg	CACACCAUUCUAUUAUCCUCCUC	No. 213
	175 (T/G)	HPV52E7-175T	tactacattgtgacatatgt	ACAAUUAUUGUACAAUUGUAGUA	No. 214
		HPV52E7-175G	tactacattgtgacagattgt	ACAAUUCUGUACAAUUGUAGUA	No. 215
	181 (C/T)	HPV52E7-175G181C-8	gtgacagattgtcacacagttgt	ACAACUGUGACAUAUUCUGUCAC	No. 216
		HPV52E7-175G181T-8	gtgacagattgttacagttgt	ACAACUGUAACAUAUUCUGUCAC	No. 217
		HPV52E7-175T181C-8	gtgacatatgttcacagttgt	ACAACUGUGACAUAUUGUCAC	No. 218
HPV52E7		HPV52E7-175T181T-8	gtgacatatgttlacagttgt	ACAACUGUAAUUAUUGUCAC	No. 219
	190 (G/A)	HPV52E7-190G	acagltgtgatatagcacactac	GUAGUGUGCUAUUCACACACUGU	No. 220
		HPV52E7-190A	acagltgttaatagcacactac	GUAGUGUGCUAUUACACACUGU	No. 221
	249 (A/G)	HPV52E7-249A	ctctacagcaaatgtctgttg	CCAACAGCAUUGGUGUAGAG	No. 222
		HPV52E7-249G	ctctacagcagatgtctgttg	CCAACAGCAUUCUGUGUAGAG	No. 223
	296 (T/G)	HPV52E7-296t	cccggctgtgcacggtataaa	UUUAUAGCCGUGGACACAGCCGGG	No. 224
		HPV52E7-296G	cccggctgtgcacggtataaa	UUUAUAGCCCGUGGACACAGCCGGG	No. 225

[0058] 实施例 2:样品制备

[0059] 采用酚氯仿法制备和纯化临床样本中的 DNA。

[0060] 多重 PCR 反应体系为 50ul 分为 A、B 两组为：

[0061]

体系 A	体积 ul
模板	2
5×buffer	10
2mM dGTP, dATP, dTTP	1.25
1mM dCTP(Cy3-dCTP : dCTP, 1 : 10)	2.5
引物体系 A(引物对 :1、2、3、6, 浓度 10mM, 上下游引物各 1ul)	2×4
Onetaq(5u/ul)	0.2
Nuclease-Free 水	28.05
体系 B	体积 ul
模板	2
5×buffer	10
2mM dGTP, dATP, dTTP	1.25
1mM dCTP(Cy3-dCTP : dCTP, 1 : 10)	2.5
引物体系 A(引物对 :4、5、7, 浓度 10mM, 上下游引物各 1ul)	2×3
Onetaq(5u/ul)	0.2
Nuclease-Free 水	26.05

[0062] 将样品核酸稀释为 35ng/ul, 每个稀释后的样品核酸按照体系 A 和体系 B 分别配制两个 PCR 体系, 每次实验设立一个阴性对照, 即以 2ul Nuclease-Free 水为模板。

[0063] 按以下条件进行扩增：

[0064]

94 °C 2 min

94 °C 15 s

56 °C 20 s

68 °C 40 s

35 cycles

68 °C 7min

4 °C ∞

[0065] 实施例 3 :HR-HPV16、58、18、52E6/E7SNP 检测

[0066] 将实施例 2 中扩增得到的 E6/E7DNA 用实施例 1 中包含有 SNP 检测探针的芯片进行杂交反应, 最后通过扫描仪扫描, 数据转换器获得不同样品 E6/E7 特定位点的 SNP 情况。

[0067] 具体操作步骤：

[0068] 1、杂交

[0069] 试剂配方：

[0070] Hybridization buffer(杂交液 HB) :6XSSPE, 25%Formamide, PH 6.6 to 6.8Wash buffer(洗液 WB) :500 μ L HB, 500 μ L H2O, 20 μ L 10% SDS, 注意, Wash buffer 要现配现用。

[0071] Blocking buffer(封闭液 BSA) :50 μ L HB, 2 μ L of 25×heat-treated BSA * Stripping buffer(解吸缓冲液 SP)0.3mM EDTA, 50% Formamide pH = 6.63

[0072] (1)、样品浓缩

[0073] 将两体系的 PCR 产物等分为两管(每管约 30ul)以离心浓缩仪真空避光常温浓缩至每管 12-15ul(两管总体积约 25-30ul)。再将两管合并, 加入等体积的杂交液

(Hybridization buffer :HB) 备用。

[0074] (2)、(1) 中混合液 95℃变性 5min 后迅速置于冰上 3min

[0075] (3)、将在冰上预冷好的样品,加入 Blocking buffer 管中,30℃,“Binding”speed 双向循环 16h(过夜),速度 500 μ L/min

[0076] 2、芯片清洗和扫描

[0077] (1) 用 Hybridization buffer 将样品从系统中挤出。1mL Hybridization buffer, 在系统中以“Wash” speed (100 μ L/min) 32℃循环 20min

[0078] (2) 1mL Wash buffer 在系统中以“Wash” speed (100 μ L/min) 32℃循环 20min

[0079] (3) 1mL Wash buffer 在系统中以“Wash” speed (100 μ L/min) 40℃循环 20min

[0080] (4) 扫描,将芯片从系统中取出,以 Microarray Scanner Genepix 4000B 扫描,扫描分辨率为 10 微米,波长为 635nm, PMT 和 Focal distance 根据需要调整。保存图片。

[0081] 数据提取和分析

[0082] (1) 数据提取

[0083] 通过 Array-Pro Analyzer 软件,将芯片扫描后的原始图像信息转变成数字信息。

[0084] (2) 数据分析

[0085] 按照芯片探针检出情况判断样品 HPV 类型。

[0086] 根据 SNP 探针信号情况对各个 SNP 位点类型进行判断。判断原则为:每个 SNP 位点的对应的每对探针间信号值相差 2 倍为界限,判断该位点的 SNP 情况。

[0087] 结果:见表 3

[0088] 表 3. 芯片检测结果情况

[0089]

序号	突变	所属基因	本次实验中突变检出情况
1	12 (G/A)	HPV16E6	检出信号与样品 SNP 情况相符
2	29 (A/C)	HPV16E6	检出信号与样品 SNP 情况相符
3	42 (G/A)	HPV16E6	检出信号与样品 SNP 情况相符
4	49 (A/C)	HPV16E6	检出信号与样品 SNP 情况相符
5	50 (G/C)	HPV16E6	检出信号与样品 SNP 情况相符
6	55 (T/G)	HPV16E6	检出信号与样品 SNP 情况相符
7	63 (G/T)	HPV16E6	检出信号与样品 SNP 情况相符
8	80 (A/C)	HPV16E6	检出信号与样品 SNP 情况相符
9	86 (C/G)	HPV16E6	检出信号与样品 SNP 情况相符
10	91 (C/A)	HPV16E6	检出信号与样品 SNP 情况相符
11	96 (T/G)	HPV16E6	检出信号与样品 SNP 情况相符
12	101 (T/C)	HPV16E6	探针信号值过于接近背景值,检测不出
13	103 (T/G)	HPV16E6	检出信号与样品 SNP 情况相符
14	106 (G/C)	HPV16E6	检出信号与样品 SNP 情况相符
15	121 (A/G)	HPV16E6	检出信号与样品 SNP 情况相符
16	158 (C/G)	HPV16E6	检出信号与样品 SNP 情况相符
17	163 (C/T)	HPV16E6	检出信号与样品 SNP 情况相符
18	187 (G/A)	HPV16E6	检出信号与样品 SNP 情况相符
19	194 (A/G)	HPV16E6	检出信号与样品 SNP 情况相符
20	203 (C/G)	HPV16E6	检出信号与样品 SNP 情况相符
21	235 (A/G)	HPV16E6	探针信号值过于接近背景值,检测不出
22	253 (C/T)	HPV16E6	检出信号与样品 SNP 情况相符
23	268 (T/G)	HPV16E6	检出信号与样品 SNP 情况相符

24	278(C/T)	HPV16E6	检出信号与样品 SNP 情况相符
25	337(T/G)	HPV16E6	检出信号与样品 SNP 情况相符
26	367(C/G)	HPV16E6	检出信号与样品 SNP 情况相符
27	375(T/G)	HPV16E6	探针信号值过于接近背景值,检测小出
28	425(G/A)	HPV16E6	检出信号与样品 SNP 情况相符
29	434(C/G)	HPV16E6	检出信号与样品 SNP 情况相符
30	45(G/T)	HPV16E7	检出信号与样品 SNP 情况相符
31	85(A/C)	HPV16E7	探针信号值过于接近背景值,检测不出
32	86(A/G)	HPV16E7	探针信号值过于接近背景值,检测小出
33	136(G/A)	HPV16E7	检出信号与样品 SNP 情况相符
34	151(C/A)	HPV16E7	检出信号与样品 SNP 情况相符
35	169(T/C)	HPV16E7	检出信号与样品 SNP 情况相符
36	171(T/C)	HPV16E7	检出信号与样品 SNP 情况相符
37	188(C/T)	HPV16E7	检出信号与样品 SNP 情况相符
38	196(C/T)	HPV16E7	检出信号与样品 SNP 情况相符
39	223(G/A)	HPV16E7	检出信号与样品 SNP 情况相符
40	258(A/G)	HPV16E7	检出信号与样品 SNP 情况相符
41	262(G/A)	HPV16E7	检出信号与样品 SNP 情况相符
42	94(G/C)	HPV58E6	检出信号与样品 SNP 情况相符
43	258(C/A)	HPV58E6	探针信号值过于接近背景值,检测小出
44	279(A/C)	HPV58E6	检出信号与样品 SNP 情况相符
45	26(G/A)	HPV58E7	探针信号值过于接近背景值,检测小出
46	40(G/A)	HPV58E7	检出信号与样品 SNP 情况相符
47	121(G/A)	HPV58E7	检出信号与样品 SNP 情况相符
48	187(G/A)	HPV58E7	检出信号与样品 SNP 情况相符
49	220(A/G)	HPV58E7	检出信号与样品 SNP 情况相符
50	225(C/T)	HPV58E7	检出信号与样品 SNP 情况相符
51	228(C/A)	HPV58E7	检出信号与样品 SNP 情况相符
52	230(T/C)	HPV58E7	检出信号与样品 SNP 情况相符
53	233(G/C)	HPV58E7	检出信号与样品 SNP 情况相符
54	251(T/A)	HPV58E7	检出信号与样品 SNP 情况相符
55	272(T/G)	HPV58E7	检出信号与样品 SNP 情况相符
56	49(C/T)	HPV18E6	检出信号与样品 SNP 情况相符
57	183(C/G)	HPV18E6	检出信号与样品 SNP 情况相符
58	445(C/A)	HPV18E6	检出信号与样品 SNP 情况相符
59	90(T/C)	HPV52E6	检出信号与样品 SNP 情况相符
60	110(C/T)	HPV52E7	检出信号与样品 SNP 情况相符
61	175(T/G)	HPV52E7	检出信号与样品 SNP 情况相符
62	181(C/T)	HPV52E7	检出信号与样品 SNP 情况相符
63	190(G/A)	HPV52E7	检出信号与样品 SNP 情况相符
64	249(A/G)	HPV52E7	检出信号与样品 SNP 情况相符
65	296(T/G)	HPV52E7	检出信号与样品 SNP 情况相符

[0090]

[0091]

[0092] 结果分析:65 个 SNP 位点中的 58 个位点检出信号与样品 SNP 情况相符。7 个 SNP 位点探针信号值过于接近背景值,检测不出,具体情况见表 2-3。通过对已检出 SNP 位点分析表明,未检测出的 SNP 位点并不影响其他位点的检出率和整张芯片的质量。

[0093] 以基因测序的结果为“金标准”,检验芯片杂交的准确性,表明芯片杂交结果与测序结果完全一致,致率为 100%。在实验中,我们也验证了 HPV 型别间交叉杂交情况,表明我们的芯片不存在交叉杂交现象,具有型特异性特点。通过比较 HPV16E6 重复性杂交结果表

明了我们的芯片杂交的重复性好。

[0094] 本实验所研究的用于检测 HR-HPV 型内变异情况的基于芯片技术的方法,基本能成功的检测 HPVE6/E7 基因型内变异,能准确检测相距较远的单个位点的变异和同时存在的多个位点的变异。与基因测序相比较,此方法具有速度快、通量高、重复性佳、操作方便等优点,且此 HPVE6/E7 型内变异芯片具有型别特异性。

[0095] 本芯片的应用:

[0096] 利用本芯片分别测定 10 例已知病检结果和 10 例不同感染状态的宫颈标本,进一步验证本芯片的准确性。

[0097] 一、样品信息

[0098]

标本号	HPV 型别	年龄	病理
450T	18	38	CIN2
488H	18	41	炎
495T	52	25	炎
499T	16	29	炎
503T	58	58	炎
528T	16	34	CIN3
585T	58	41	CIN2
589T	52	42	炎
590T	16	30	CIN1
594T	16	32	炎

[0099]

[0100]

标本号	HPV 型别	年龄	随访时间/月	感染状态
462H	58	37	6	持续
465T	52	24	6	暂时
497T	52	27	6	持续
557H	18	25	6	持续
564T	16	28	6	持续
577T	16	24	6	持续
586T	52	35	6	持续
630H	16	37	6	暂时
645H	58	37	6	持续
661H	16	26	6	持续

[0101]

Sample ID	Conc. (µg/µL)	UV 260/280	UV 260/230	HPV typ
450T	0.2311	1.84	2.17	HPV18
488H	0.0548	1.96	2.05	HPV18
499T	0.0839	1.98	2.08	HPV16
503T	0.0355	1.9	1.71	HPV58
528T	0.4374	1.75	2.17	HPV16
550T	0.5475	1.77	2.32	HPV52
585T	0.3553	1.9	1.9	HPV58
589T	0.052	1.76	2.04	HPV52
590T	0.119	1.72	2.45	HPV16
594T	0.0977	1.78	1.94	HPV16
425T	0.2907	1.69	1.6	HPV16
465T	0.1289	1.58	1.91	HPV52
498T	0.0686	1.87	1.56	HPV16
557H	0.3029	1.84	2.12	HPV18
564T	0.071	1.74	2.06	HPV16

[0102]

577T	0.1491	1.74	2.03	HPV16
586T	0.1171	1.8	1.47	HPV52
630H	0.2246	1.75	1.98	HPV16
638H	3.6804	1.88	2.09	HPV58
645H	1.0719	1.86	2.03	HPV58

- [0103] 二、实验操作过程同上；
- [0104] 三、结果：
- [0105]

样品名	实验检出的 HPV 类型	SNP 位点检出情况	
		基因	SNP 情况
450T	HPV18	HPV18E6	49 (C/T) 野生型, 183 (C/G) 突变型, 445 (C/A) 野生型
488H	HPV18	HPV18E6	49 (C/T) 野生型, 183 (C/G) 突变型, 445 (C/A) 野生型
499T	HPV16	HPV16E6	12 (G/A) 突变型, 29 (A/C) 野生突变混合型, 49 (A/C) 野生突变混合型, 50 (G/C) 野生突变混合型, 96 (T/G) 野生突变混合型, 其余位点为野生型
		HPV16E7	169 (T/C) 野生突变混合型; 其余位点为野生型
503T	HPV58	HPV58E6	94 (G/C) 野生型
		HPV58E7	121 (G/A) 野生突变混合型; 其余位点为野生型
528T	HPV16	HPV16E6	49 (A/C) 野生突变混合型, 50 (G/C) 野生突变混合型, 其余位点为野生型
		HPV16E7	所有位点为野生型
585T	HPV58	HPV58E6	94 (G/C) 野生型
		HPV58E7	所有位点为野生型
589T	HPV52	HPV52E6	90 (T/C) 野生型
		HPV52E7	249 (A/G) 突变型, 其余位点为野生型
590T	HPV16	HPV16E6	49 (A/C) 野生突变混合型, 50 (G/C) 野生突变混合型, 96 (T/G) 突变型, 367 (C/G) 野生突变混合型, 其余位点为野生型
		HPV16E7	86 (A/G) 突变型, 169 (T/C) 野生突变混合型, 其余位点为野生型
594T	HPV16	HPV16E6	29 (A/C) 野生突变混合型, 49 (A/C) 野生突变混合型, 50 (G/C) 野生突变混合型, 121 (A/G) 野生突变混合型, 其余位点为野生型
		HPV16E7	所有位点均为野生型

[0106]

462H	HPV58	HPV58E6	所有三个 SNP 位点均为野生型
		HPV58E7	所有位点为野生型
465T	HPV52	HPV52E6	90 (T/C) 野生型, 255 (G/A) 不能判断,
		HPV52E7	249 (A/G) 突变型; 其余位点为野生型
497T	HPV52	HPV52E6	90 (T/C) 野生型
		HPV52E7	所有位点为野生型
557H	HPV18	HPV18E6	49 (C/T) 野生突变混合型, 183 (C/G) 突变型, 445 (C/A) 野生型
564T	HPV16	HPV16E6	29 (A/C) 野生突变混合型, 49 (A/C) 野生突变混合型, 50 (G/C) 野生突变混合型, 96 (T/G) 野生突变混合型, 203 (C/G) 野生突变混合型, 268 (T/G) 野生突变混合型, 367 (C/G) 突变型; 其余位点为野生型
		HPV16E7	86 (A/G) 野生突变混合型, 258 (A/G) 野生突变混合型; 其余位点为野生型
577T	HPV16	HPV16E6	29 (A/C) 野生突变混合型, 49 (A/C) 野生突变混合型, 50 (G/C) 野生突变混合型, 91 (C/A) 野生突变混合型, 96 (T/G) 突变型, 其余位点为野生型
		HPV16E7	所有位点均为野生型
586T	HPV52	HPV52E6	90 (T/C) 野生型
		HPV52E7	所有位点均为野生型
630H	HPV16	HPV16E6	29 (A/C) 野生突变混合型, 49 (A/C) 野生突变混合型, 50 (G/C) 野生突变混合型, 96 (T/G) 突变型, 其余位点为野生型
		HPV16E7	其余位点为野生型
495T	HPV52	HPV52E6	90 (T/C) 野生型
		HPV52E7	249 (A/G) 突变型; 其余位点为野生型
645H	HPV58	HPV58E6	所有三个 SNP 位点均为野生型
		HPV58E7	其余位点为野生型
661H	HPV16	HPV16E6	49 (A/C) 野生突变混合型, 50 (G/C) 野生突变混合型, 96 (T/G) 突变型, 106 (G/C) 突变型, 203 (C/G) 野生突变混合型, 268 (T/G) 突变型, 367 (C/G) 突变型, 其余位点为野生型
		HPV16E7	86 (A/G) 突变型; 其余位点为野生型

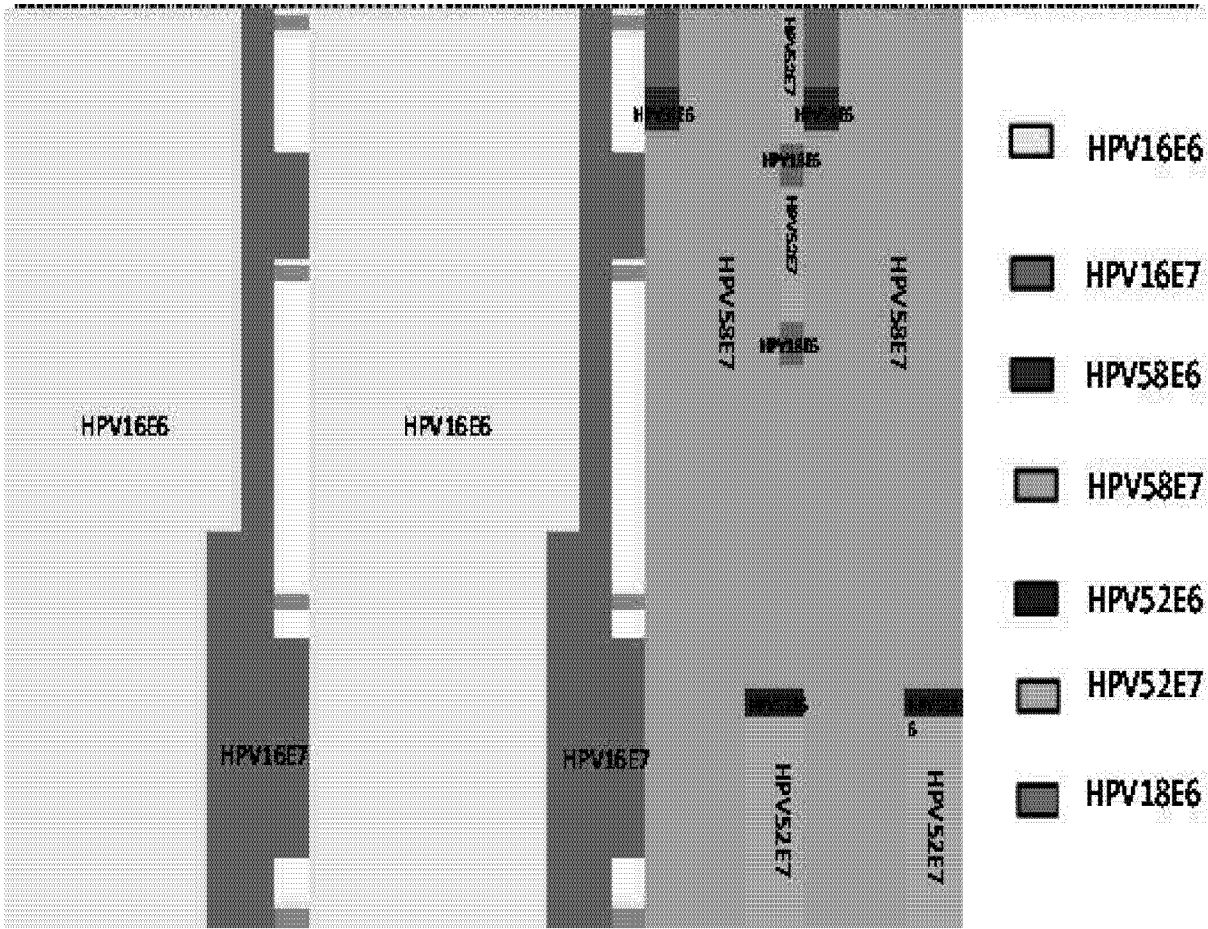


图 1