

Code No. 6603

研究用

TaKaRa

TaKaRa PCR Human
Papillomavirus Typing Set

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	1
● 原 理	1
● 操作方法	2
● 利用 Enzyme Set A 进行 HPV 分型的判定	3
● 参考文献	5
● 相关产品	5

● 制品说明

本制品是对高发宫颈癌进行分型的试剂盒，通过在各型人乳头状瘤病毒 Human Papillomavirus(HPV) 碱基序列之间存在的高度保守区设计的通用引物 (consensus primer)，可对 HPV 的 E6 和 E7 基因 (228 bp~268 bp) 同时进行 PCR 扩增。HPVpU-1M/HPVpU-2R 引物可扩增高危型 HPV16, 18, 31, 33, 35, 52b 及 58 型, HPVpU-31B/HPVpU-2R 引物可扩增低危型 HPV6 及 11 型。扩增后的 DNA 片段利用 Enzyme Set A (Code No.6604)进行限制性内切酶 (*Acc* I, *Afa* I, *Bme*T110 I (*Ava* I), *Vpa*K11B I (*Ava* II)*Bgl* II) 处理后进行凝胶电泳，根据电泳片段可对 HPV 进行分型。

为了确认 PCR 扩增反应是否正常，试剂盒中附带了高危型 HPV 和低危型 HPV 的 Control Template。使用下面的引物可确认 PCR 扩增反应。(以 Control Template 为模板的 PCR 扩增产物与 HPV 来源的扩增产物的片段大小不同)。同时，这些 DNA 扩增片段中存在 *Acc* I, *Afa* I, *Bme* T110 I (*Ava* I), *Vpa* K11B I (*Ava* II) and *Bgl* II 的酶切位点，使用这几个限制酶进行酶切反应后，DNA 扩增片段会变短，因此可利用限制性内切酶确认酶切反应。(确认酶切反应时，因酶切后的片段过小，琼脂糖凝胶电泳难以确认片段大小)

Control Template	HPV-TM	HPV-TB
Primer	pU-1M/pU-2R	pU-31B/pU-2R
扩增片段链长 (bp)	63	61

● 制品内容 (50 μl 反应, 100 次量)

1. HPVpU-1M (malignant forward primer)	25 pmol/ μl	50 μl
2. HPVpU-31B (benign forward primer)	25 pmol/ μl	50 μl
3. HPVpU-2R (common reverse primer)	25 pmol/ μl	100 μl
4. Control Template HPV-TM (malignant)	1 ng/ μl	50 μl
5. Control Template HPV-TB (benign)	1 ng/ μl	50 μl

本制品以外的必备主要试剂

*TaKaRa Taq*TM (Code No. R001; 附带 10X PCR Buffer, dNTP Mixture)

Enzyme Set A (Code No. 6604)

PrimeGelTM Agarose PCR-Sieve (Code No. 5810A)

Proteinase K

● 保存

-20°C

● 原理

引物的位置与序列详见表 1。

表 1.通用引物与各 HPV 型碱基序列的相似性

	5' 末端序列			
	起始位置	错配数	扩增	
HPVpu-1M 5'-TGTCAAAAACCGTTGTGTCC-3'				
HPV6	-----C-----C-----GA	420	4	×
HPV11	-----C---G-----GA	420	4	×
HPV16	-----G---AC-----	419	3	○
HPV18	--C-----G-----AA-----	426	4	○
HPV31	-----G-----	423	1	○
HPV33	-----G-----T-----	424	2	○
HPV35	-----C-----	425	1	○
HPV52b	-----CG---A---A-----	418	4	○
HPV58	-----G-----A-----	425	2	○
HPVpU-31B 5'-TGCTAATTCGGTGCTACCTG-3'				
HPV6	-----	400	0	○
HPV11	---T-----T---T-----	400	3	○
HPV16	---T-----A-----TATTAAC	399	9	×
HPV18	--AT-----AA-----CTG---G-	406	8	×
HPV31	---T-----A-----TATAAC-	403	8	×
HPV33	---AT-----A-----TATTA-A	404	9	×
HPV35	---AT-----A-----TATTACA	405	10	×
HPV52b	---AACT-----A---A---TATAA--T	398	12	×
HPV58	---AT-----A---A---TATTA--T	405	10	×
HPVpU-2R 5'-GAGCTGTCGCTTAATTGCTC-3'				
HPV6	-----ATC-----	627	3	○
HPV11	-----TTC-----	627	3	○
HPV16	-----AT-----	656	2	○
HPV18	TCTGA-----	693	5	○
HPV31	-----GG-----	654	2	○
HPV33	-----A-----	667	1	○
HPV35	-----A---AC-----	656	3	○
HPV52b	-----A---C-----	648	2	○
HPV58	-----A---A-----	668	2	○

● 操作方法

A. 基因组 DNA 的制备

1. 在 300 μl 反应液 (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM EDTA, 0.5% SDS, 0.2 mg/ml Proteinase K) 中加入组织标本后, 37°C 反应 12 小时进行 Proteinase K 处理。
2. 加入 300 μl 苯酚/氯仿溶液后混合, 12,000 rpm 离心 10 分钟, 将水层 (上层) 移至新的离心管中。
3. 加入 300 μl 氯仿/异戊醇溶液后混合, 12,000 rpm 离心 10 分钟, 将水层 (上层) 移至新的离心管中。
4. 加入 600 μl 无水乙醇和 30 μl 的 3 M CH₃COONa, -20°C 放置 1 小时 (或 -70°C 放置 30 分钟) 后, 12,000 rpm 离心 10 分钟, 回收沉淀物。
5. 80%乙醇清洗沉淀物, 干燥后用灭菌水溶解基因组 DNA。

B. PCR 反应

1. 反应液的配制

使用 *TaKaRa Taq* 配制反应液。

Control Template 的添加量为 1 μ l

<高危型 HPV DNA 的扩增>

10X PCR Buffer	5 μ l
dNTP Mixture (各 2.5 mM)	4 μ l
HPVpU-1M	0.5 μ l
HPVpU-2R	0.5 μ l
<i>TaKaRa Taq</i> TM (5 U/ μ l)	0.25 μ l
样品基因组 DNA*	0.5 μ g
灭菌水	up to 50 μ l

<低危型 HPV DNA 的扩增>

10X PCR Buffer	5 μ l
dNTP Mixture (各 2.5 mM)	4 μ l
HPVpU-31B	0.5 μ l
HPVpU-2R	0.5 μ l
<i>TaKaRa Taq</i> TM (5 U/ μ l)	0.25 μ l
样品基因组 DNA*	0.5 μ g
灭菌水	up to 50 μ l

* 每次反应使用 1 μ l 对照模板。

2. 按照下面的反应条件进行 PCR 反应。

94°C	30 sec	} 30 cycles
55°C	2 min*	
72°C	30 sec	

*: 若同一样品在 31B/2R (低危型) 体系和 1M/2R (高危型) 体系都能获得 PCR 扩增产物, 请将退火时间变更为 1 min 或 0.5 min, 这种情况下, 目的基因的扩增效率会有所下降。

3. 取 10 μ l PCR 反应液进行 4% 的 PrimeGel Agarose PCR-Sieve 凝胶电泳, 可获得 228~268 bp 的扩增片段。

4. 将电泳后已确认的 DNA 片段通过苯酚/氯仿和氯仿抽提、乙醇沉淀回收扩增的 DNA。DNA 溶解于 10 μ l TE buffer (约 0.1~0.2 μ g/ μ l)。

● 利用 Enzyme Set A 进行 HPV 分型的判定

使用本试剂盒进行 PCR 扩增获得的 DNA 片段, 利用 Enzyme Set A 进行限制性内切酶酶切处理, 凝胶电泳后根据电泳图谱可进行 HPV 类型的判定。

Enzyme Set A (Code No. 6604)

1. Restriction Endonuclease

VpaK11B I (Ava II), Afa I, Bgl II, Acc I, BmeT110 I (Ava I): each 10 U/ μ l

2. 10X Universal Buffer K, M, H, T

0.1% BSA

10X *VpaK11B I* Buffer

<Buffer 的组份>

10X K (用于 *BmeT110 I*)

200 mM Tris-HCl (pH8.5), 100 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1,000 mM KCl

10X M (用于 *Acc I*)

100 mM Tris-HCl (pH7.5), 100 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 500 mM NaCl

10X H (用于 *Bgl II*)

500 mM Tris-HCl (pH7.5), 100 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1,000 mM NaCl

10X T (用于 *Afa I*)

330 mM Tris-acetate (pH7.9), 100 mM Mg-acetate, 5 mM DTT, 660 mM K-acetate

0.1% BSA (用于 *Afa I*)

10X *VpaK11B I* Buffer (用于 *VpaK11B I*)

200 mM Tris-HCl (pH7.5), 70 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 2,000 mM KCl

A. 高危型 HPV 的分型

1. 在操作方法 B-3 使用 HPVpU-1M/HPVpU-2R 获得的 DNA 扩增片段, 利用 Enzyme Set A 进行高危型 HPV 的分型。首先按照下面的组份配制反应液后, 30°C 反应 1 小时进行 *VpaK11B I* (*Ava II*) 的酶切反应。反应结束后, 进行 4% PrimeGel Agarose PCR-Sieve 凝胶电泳确认电泳图谱。根据 *VpaK11B I* 酶切反应可进行 HPV16, 18 和 33 型的判定 (表 2-a)。

扩增的 DNA	1 μ l (0.1~0.2 μ g)
10X <i>VpaK11B I</i> Buffer	2 μ l
<i>VpaK11B I</i>	0.5 μ l (5 U)
灭菌水	16.5 μ l
	20 μ l

2. DNA 没有被 *VpaK11B I* 切断时, 分别使用 *Bgl II*, *Afa I*, *Acc I*, *BmeT110 I* (*Ava I*) 同样进行上述 1 的反应来判定 HPV 的类型 (表 2-a)。各限制酶适用的通用缓冲液和反应温度如下:

<i>Bgl II</i>	Universal Buffer H、37°C
<i>Afa I</i>	Universal Buffer T+0.01% BSA (终浓度)、37°C
<i>Acc I</i>	Universal Buffer M、37°C
<i>BmeT110 I</i>	Universal Buffer K、37°C

B. 低危型 HPV 的分型

在操作方法 B-3 使用 HPVpU-31B/HPVpU-2R 获得的 DNA 扩增片段, 利用 Enzyme Set A 中的 *Afa I* 进行低危型 HPV 的分型。*Afa I* 使用 T buffer+0.01%BSA 进行酶切反应后可进行 HPV 6 和 HPV 11 的判定。

表 2. 使用通用引物获得的扩增产物的酶切图谱。

数字表示酶切后各片段的长度。

NC: 没有被限制酶切断。

a) HPVpU-1M/HPVpU-2R

HPV 型	HPV 16	HPV 18	HPV 31	HPV 33	HPV 35	HPV 52b	HPV 58
扩增片段全链长 (bp)	238	268	232	244	232	231	244
限制酶							
<i>VpaK11B I</i> (<i>Ava II</i>)	158/81	172/96	NC	136/108	NC	NC	NC
<i>Afa I</i>	NC	NC	117/118	NC	NC	NC	NC
<i>Bgl II</i>	NC	NC	NC	NC	NC	176/55	NC
<i>Acc I</i>	NC	NC	NC	NC	NC	NC	126/118
<i>BmeT110 I</i> (<i>Ava I</i>)	NC	NC	NC	NC	186/46	NC	NC

b) HPVpU-31B/HPVpU-2R

HPV 型	HPV6	HPV11
扩增片段全链长 (bp)	228	228
限制酶		
<i>VpaK11B I</i> (<i>Ava II</i>)	132/96	166/62
<i>Afa I</i>	NC	NC
<i>Bgl II</i>	NC	NC
<i>Acc I</i>	NC	NC
<i>BmeT110 I</i> (<i>Ava I</i>)	NC	NC

● 参考文献

Fujinaga Y, Shimada M, Okazawa K, Fukushima M, Kato I, and Fujinaga K. *Journal of General Virology*. (1991) **72**: 1039–1044.

● 相关产品

TaKaRa Taq[™] (Code No. R001 A/B/C)

Enzyme Set A (Code No. 6604)

PrimeGel[™] Agarose PCR–Sieve (Code No. 5810A)

PCR Human Papillomavirus Detection Set (Code No. 6602)

TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice[™] Gradient (Code No. TP600)

TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice[™] *Touch* (Code No. TP350)

TaKaRa Taq, PrimeGel, and Thermal Cycler Dice are trademarks of Takara Bio Inc.

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经Takara Bio Inc.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站www.takara-bio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日医生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考 Takara Bio Inc.网站。为正确使用 Takara 产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <https://www.takarabiomed.com.cn>

v202003Da