

تشخیص و تعیین تایپ ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) به صورت

همزمان به روش REAL-TIME PCR

نام دانشجو: طلوع گلکار

استاد راهنما: جناب شاهین نگاری

پایان نامه کارشناسی

رشته زیست شناسی

خلاصه مطالب

سرطان رحم دومین سرطان شایع در بین زنان جهان است. 80% از موارد گزارش شده از کشورهای در حال توسعه می باشد. بروز سرطان رحم با عفونت با تایپهای پرخطر High Risk (HR) یا سرطانزای ویروس HPV مرتبط دانسته شده است چرا که در 99,7% موارد این سرطان، عفونت با این تایپها نیز مشاهده میشود. این نکته موجب تثبیت روشهای مولکولار برای تشخیص عفونت HR HPV به عنوان ابزاری مفید برای بررسی یا پیش بینی وضعیت بیمار پس از مشاهده نمونه مشکوک پاپ اسمیر شده است. علیرغم نکات بالا عدم وجود تستهای تشخیصی حساس، سریع و مقرون به صرفه، تشخیص و تعیین تایپ عفونت HPV را در کشورهای در حال توسعه با مشکل مواجه کرده است. در این پروژه امکان تشخیص و تعیین تایپ این ویروس بطور همزمان با روش Real-Time PCR بررسی شده است. توالیهای HPV (746 توالی) از تمام بانکهای اطلاعاتی موجود جمع آوری و همتراز شدند. ساب تایپهای هر تایپ به یک توالی واحد شامل تمامی چند ریختی های تک نوکلئوتیدی (Single Nucleotide Polymorphism (SNP)) برای منطقه L1 تبدیل شدند. سپس بر اساس توالی های بالا پروبهای FRET شامل چهار انکور (Anchor) و سه سنسور (Sensor) طراحی شدند. تعداد نوکلئوتید های نامنطبق با هر پروب برای هر تایپ عددی 4 رقمی منحصر به فردی را می سازد که توسط بررسی منحنی ذوب قابل دستیابی است. با این ترتیب امکان تشخیص و تعیین تایپ 25 تایپ شایع HPV شامل تایپهای 16, 18, 33, 31, 45, 39, 35, 59, 56, 52, 58, 68, 73, 26, 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 و 81 فراهم می شود.

تشکر و قدردانی

از تمامی عزیزان و دوستانی که همیشه پشتیبان و مشوقم در تمام دوران تحصیل بوده اند، صمیمانه سپاسگزارم . بالاخص از مادر و پدر عزیزم که همواره در کنارم بوده اند. از ورقا و رضوان عزیز که صمیمانه دوستشان دارم. از دوست بسیار عزیزم آرمان فهندژ که روش و سلوکش در کسب کمالات سرمشقی کامل است . از تمامی استادان بسیار عزیز که بار اصلی همیشه بر دوششان بوده است و یاد لحظات بودن با آنها هیچگاه از ذهنم پاک نخواهد شد، و البته از میان آنها جناب شاهین نگاری که نگاهش به علم آموزی، ایمان و زندگی همواره مایه تعجب و افتخار من بوده است.

فهرست موضوعات:

1.....	خلاصه مطالب
2.....	تشکر و قدردانی
3.....	فهرست موضوعات
5.....	فهرست علامات اختصاری
6.....	فهرست شکلها
8.....	فهرست جداول
9.....	متن پایان نامه

مقدمه

9 ...	Human Papilloma Virus (HPV) ویروس پاپیلوما ی انسانی
13.....	اهمیت سرطان سرویکس
14.....	مکانیسم سرطانزایی توسط ویروس پاپیلوما
15.....	کشت ویروس پاپیلوما
17.....	پیشگیری از عفونت HPV
17.....	روشهای مختلف تشخیص و تایپینگ ویروس
20.....	روش Real-Time PCR و مزیت های آن
25.....	فرضیه
25.....	Objectives

مواد و روش انجام کار

26.....	منابع اطلاعات ژنتیکی
26.....	نرم افزارهای مورد استفاده

نتایج

28.....	جمع آوری و همترازی سکوانس تایپهای مختلف HPV
---------	---

تهیه SNP map برای تایپهای مختلف و همترازی سکوانسهای	
28.....	SNP
30.....	نواحی انتخابی برای طراحی پرایمرها و پروبها
31.....	1- بررسی ناحیه GP
35.....	طراحی پرایمرهای جدید
38.....	طراحی پروبها
39.....	2- بررسی ناحیه GP downstream
41.....	3- بررسی ناحیه GP upstream
41.....	طراحی پرایمرها
43.....	طراحی پروبها
50.....	روش تعیین تایپ به کمک پروبها
50....	بررسی همپوشانی احتمالی پروبها با سایر تایپهای HPV
56.....	بحث و نتیجه کلی
58.....	منابع
[1].....	پیوستها

فهرست علامات اختصاری

HPV: Human Papilloma Virus

PCR: Polymerase Chain Reaction

pRB: Retino Blastoma Proein

E2Fs: Elongation Factors

DNA: Deoxyribonucleic acid

ISH: in situ Hybridization

EBI: European Bioinformatics Institute

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

LNA: Locked Nucleic Acid

فهرست شکلها

- شکل 1: ساختار شماتیک از ژنوم حلقوی ویروس پاپیلوما.....10
- شکل 2 : چرخه زندگی ویروس و وابستگی آن به تمایز کراتینوسیتها.....12
- شکل 3: پیوستن ژنوم HPV به کروموزوم میزبان و تخریب ناحیه E2 از ژنوم HPV.....16
- شکل 4 : مراحل مختلف تست PCR.....22
- شکل 5: الف- پدیده FRET . ب – تاثیر وجود نوکلئوتیدهای غیر مکمل مابین پروب و ناحیه مکمل آن در دمای تفکیک (melting temperature) و تفاوت میان منحنی های دمای تفکیک 24
- شکل 6: 29 تایپ انتخابی HPV در ناحیه GP به صورت سکوانسهای SNP پس از همترازی.....29
- شکل 7 : نواحی انتخابی برای طراحی پرایمرها و پروبها روی HPV 16 (NCBI Genbak.....30
- شکل 8 : مقایسه بین پرایمر GP5+ و سکوانس 29 تایپ HPV در این ناحیه.....32
- شکل 9 : مقایسه بین پرایمر GP6+ و سکوانس 29 تایپ HPV در این ناحیه.....33
- شکل 10 : مقایسه بین پرایمرهای GP5+ و GP6+ و سکوانس 13 تایپ شایع HPV در این ناحیه.....34
- شکل 11 : مقایسه بین پرایمر NGP6+ و سکوانس 29 تایپ HPV در این 36
- شکل 12 : مقایسه بین پرایمر NGP5+ و سکوانس 29 تایپ HPV در این ناح.....37
- شکل 13 : نواحی A و B که برای طراحی پروبها در ناحیه GP انتخاب شدند.....38

شکل 14 : مقایسه توالی پرایمر جدید در ناحیه GP downstream با سکوانس 29 تایپ HPV

40.....

شکل 15 : مقایسه توالی پرایمر MY11 با سکوانس 29 تایپ HPV

42.....

شکل 16: نواحی تعیین شده نهائی برای طراحی پرایمرها و پروبها روی HPV 16 (NCBI).

43.....Genbak GI#333031)

شکل 17 : شکلی شماتیک از نواحی پرایمرهای MY09/11 و GP5+/6+ و SPF1/2

57.....

فهرست جداول

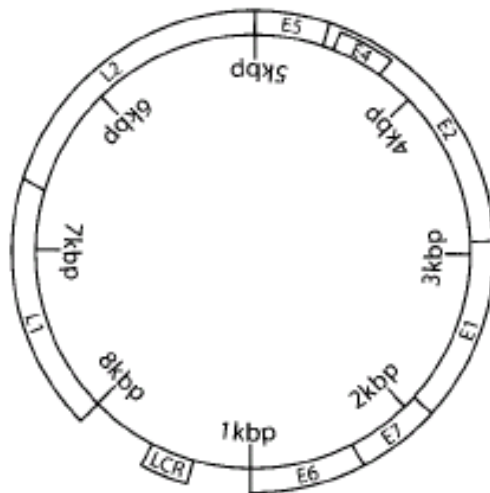
- جدول 1: نام و سکوانس تمام پروبهای انکور 44
- جدول 2: مقایسه سکوانس پروبهای انکور و 29 تایپ HPV 45
- جدول 3: نام و سکوانس تمام پروبهای سنسور 46
- جدول 4: مقایسه سکوانس پروبهای سنسور و 29 تایپ HPV (اعداد نوشته شده نشاندهنده تعداد نوکلئوتیدهای غیر مکمل می باشد) 47
- جدول 5 : مقایسه سکوانس پروبهای انکور انتخاب شده با 29 تایپ HPV 48
- جدول 6 : مقایسه سکوانس پروبهای سنسور انتخاب شده با 29 تایپ HPV 48
- جدول 7: دمای تخمینی تفکیک پروبهای سنسور و انکور 49
- جدول 8: دمای تخمینی تفکیک پرایمرها 49
- جدول 9: اعداد نشان داده شده که تعداد نوکلئوتیدهای غیر مکمل هر تایپ را با سکوانس پروب مورد نظر نشان می دهد، 4 رقم منحصر به فرد هر تایپ را پدید می آورد 51
- جدول 10: مقایسه سکوانس پروبها و پرایمرهای طراحی شده با تمام تایپهای موجود HPV 52
- جدول 11 : 16 تایپ دیگر HPV که با پرایمرها و پروبهای طراحی شده قابل شناسایی می باشند 55

متن پایان نامه

مقدمه

ویروس پاپیلوما ی انسانی (HPV) Human Papilloma Virus

پاپیلوما ویروسها در گروه ویروسهای کوچک بدون پوششی هستند که قطر ویرون آنها حدودا 60-55 نانومتر است و ژنوم آنها نیز ژنومی حلقوی با DNA دو رشته ایست که حدودا 8000 جفت نوکلئوتید دارد. کپسید حدودا 60 نانومتری این ویروس عمدتا از پروتئین ویروسی به نام L1 ساخته شده است و البته پروتئین کپسیدی L2 نیز در آن دیده می شود (5). این کپسید شامل 72 کپسومر ستاره ای شکل می باشد و دارای تقارن بیست وجهی (icosahedral) است. ژنوم پاپیلوما ویروسها شامل 3 ناحیه می شود: ناحیه اول که به نام ناحیه بلند کنترل (long control region) و یا ناحیه تنظیمی بالائی (upper regulatory region) معروف است، شامل حدودا 400 تا 1000 نوکلئوتید می شود که سکوانس های promoter ، enhancer و silencer را در بر میگیرد که همگی در تنظیم تکثیر DNA (replication) نقش دارند. همچنین این ناحیه دارای بیشترین تنوع ژنومی (highest degree of variation) در میان تایپهای مختلف است. ناحیه دوم ناحیه Early (ابتدائی) که مسؤول ساخت پروتئینهایی است که قبل از تکثیر ژنوم ویروس تولید می شوند و شامل نواحی E1، E2، E4، E5، E6 و E7 است. ناحیه سوم یا ناحیه Late (نهایی) مربوط به پروتئینهای کپسید است که بعد از تکثیر ژنوم ویروس ساخته می شوند و شامل نواحی L1 و L2 است. این ناحیه در مقایسه با دیگر نواحی ژنوم بسیار محافظت شده (conserved) است و به همین دلیل در طراحی پرایمرها و پروبهای مورد استفاده در تستهای تشخیصی که بر اساس تشخیص توالی اسید نوکلئیک (Nucleic acid-based) عمل می کنند، معمولا از این ناحیه استفاده می شود (9) (شکل 1).



شکل 1: ساختار شماتیک از ژنوم حلقوی ویروس پاپیلوما.

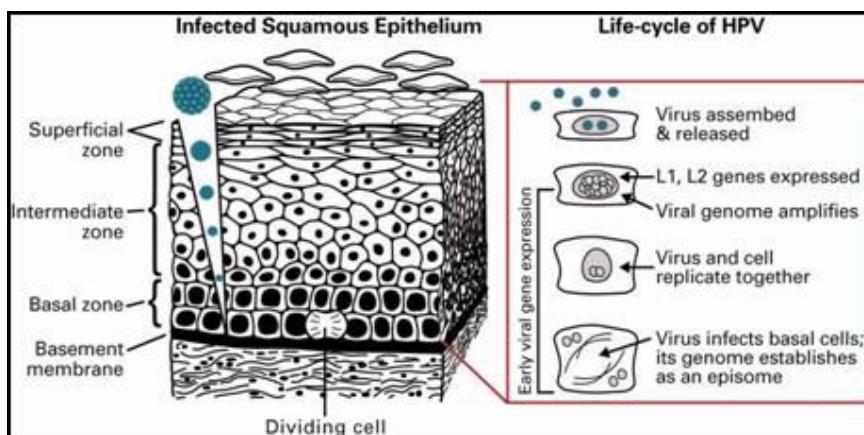
مرجع:

Eileen M. Burd , Human Papillomavirus and cervical cancer , Clin. Microbiol.

Rev , Vol. 16 , No. 1 , P. 1-17

بر مبنای اطلاعاتی که پس از بررسی توالی ژنوم نمونه های مختلف بدست آمده بیش از 200 نوع متفاوت از HPV شناخته شده است که از میان آنها تقریباً 85 ژنوتیپ کاملاً مشخص شده اند و 120 ایزوله نیز شامل انواعی هستند که احتمالاً در ژنوتیپهای جدیدی قرار می گیرند (9).

تکثیر این ویروس منحصر در کراتینوسیتها انجام می گیرد. این سلولها خارجی ترین ناحیه پوست و سطوح مخاطی از قبیل سطح داخل گونه ها و سطوح داخلی ناحیه ژنیال (genital)، مقعد، دهان و راههای هوایی را می پوشانند. بافتهای این سطوح که اپیتلیوم مکعب طبق (stratified squamous epithelia) می باشند از لایه های فشرده سلولها ساخته شده اند. داخلی ترین لایه که مسؤول ساخت و بازسازی لایه های دیگر است از سلولهای بنیادین (stem cells) ساخته شده است. به نظر می رسد که این سلولها نقطه آغاز عفونت توسط ویروس پاپیلوما می باشند. دسترسی این ویروس به این ردیف از سلولها از طریق زخمهای کوچک و یا خراشهایی است که در پوست و یا ناحیه مخاطی ایجاد می شود. پس از ورود ویروس به داخل سلول، سایر مراحل چرخه تکثیری ویروس همگام با تمایز سلولها و حرکت آنها به سمت لایه های بالاتر طی می شود. در سلولهای داخلی تر پروتئینهای اولیه به مقدار کمی تولید می شوند و ژنوم ویروس نیز به تعداد کمی به صورت اپیزومال (Episomal) تکثیر می شود. همزمان با تمایز سلولها، تولید پروتئینهای تاخیری مثل L1 و L2 نیز انجام می گیرد و تکثیر ژنوم ویروس نیز به مقدار فراوان صورت می پذیرد. ویروسها در هسته سلول تشکیل (assemble) شده و به هنگام ریزش سلولهای سطحی از سلولها خارج شده و آزاد می شوند (5, 23) (شکل 2). همین وابستگی مراحل مختلف چرخه تکثیر ویروس با تقسیم و تمایز سلولهای کراتینوسیت است که کشت این ویروس را به روشهای معمولی غیر ممکن می سازد (9).



شکل 2: چرخه زندگی ویروس و وابستگی آن به تمایز کراتینوسیتها.

مرجع: <http://www.merckmedicus.com/pp/us/hcp/diseasemodules/hpvd/natural-history.jsp>

history.jsp

پاپیلوما ویروسها در طیف وسیعی از جانوران - پرندگان تا پستانداران - ایجاد عفونت می کنند. اگرچه بسیاری از انواع آن باعث عفونتهای پوستی می شوند ولی باتوجه به اینکه HPV سلولهای بنیادین اپیتلیال پوست (basal epithelial cells of the skin) و یا جداره داخلی بافتها (inner lining of tissues) را مورد هجوم قرار می دهد می توان آن را به دو گروه انواع جلدی و انواع مخاطی تقسیم کرد. انواع جلدی شامل انواعی هستند که باعث عفونت پوست دستها و پاها می شوند و انواع مخاطی در پوشش داخلی دهان ، گلو، لوله تنفسی و اپیتلیوم anogenital دیده میشوند (9) . حدودا 30 نوع آن سبب عفونتهای ناحیه ژنیتهال و سایر نواحی مخاطی مانند گردن رحم (cervix) می شوند (7) . در حال حاضر حدودا 20 میلیون نفر در جهان دچار عفونت HPV می باشند. تقریبا 50 درصد زنان و مردان در دوره ای از زندگی با این ویروس آلوده می شوند و عفونت ژنیتهال با این ویروس در 80 درصد زنان تا قبل از سن 50 سالگی اتفاق می افتد (4, 6, 26).

اهمیت سرطان سرویکس

سرطان سرویکس دومین سرطان شایع در میان زنان جهان است و 80% از موارد گزارش شده این سرطان در کشورهای در حال توسعه می باشد. مطالعات نشان داده اند که بروز این سرطان در نقاط جغرافیائی مختلف متفاوت است. بیشترین آمار مربوط به این سرطان در آمریکای لاتین ، ناحیه جنوب صحرای آفریقا ، جنوب و جنوب شرقی آسیا گزارش شده است (26). تحقیقات فرانسیس پیتون روس (Francis Peyton Rous) بر روی طیور در سال 1911 سرطانزایی ویروسها را ثابت کرده بود ولی ارتباط میان عفونت ناحیه ژنیتهال بوسیله HPV و بروز سرطان سرویکس در اوایل دهه 80 میلادی توسط تحقیقات ویروس شناس آلمانی، هارولد هوسن (Harold zur hausen) ، برای اولین بار نشان داده شد (9). بررسیها نشان می دهند که امروزه در 99.7% از سرطانهای سرویکس ، عفونت HPV دیده می شود (4, 9).

با توجه به ارتباط میان عفونت HPV و ظهور سرطان سرویکس ، تایپهای مختلف پاپیلوما ویروسها در 3 گروه تقسیم می شوند. حدودا 15 نوع از انواع پاپیلوما ویروسها (16، 18، 31، 33،

35، 39، 45، 51، 52، 56، 58، 59، 68، 73، 82) به عنوان گروه سرطانی (oncogenic) یا گروه پرخطر (High-risk) نامگذاری شده اند. 11 نوع دیگر به عنوان گروه کم خطر (Low-risk) (6، 11، 40، 42، 43، 44، 54، 61، 70، 72، 81) و 3 نوع (66، 53، 26) به عنوان گروهی که احتمالاً دارای خاصیت سرطانی می باشند طبقه بندی شده اند. حدوداً 70% سرطانیهای رحم حاصل از عفونت با تایپ 16 و 18 می باشد و حدود 90% زخمهای ناحیه ژنیتال در اثر عفونت با تایپهای 6 و 11 حاصل می شود (6).

مکانیسم سرطانی توسط ویروس پاپیلوما

مکانیسم سرطانی HPV از طریق دخالت در عملکرد دو پروتئین سلولی به نامهای رتینوبلاستوما pRB و سرکوبگر تومور p53 است. در سلولهایی که در حالت G⁰ قرار دارند - یعنی در وضعیت non-proliferative می باشند- pRB با فاکتورهای سلولی نسخه برداری cellular (transcription factors) (E2Fs) کمپلکسی تشکیل می دهد و در این حالت باعث غیر فعال شدن آنها می شود. عکس این حالت وضعیتی است که در آن E2Fs آزادند و این وضعیت سبب می شود که سلولها از حالت G⁰ وارد فاز G1 و سپس S شوند و چرخه سلولی به دنبال آن آغاز گردد. پروتئین E7 ویروس با اتصال به pRB از ارتباط آن با E2Fs جلوگیری کرده و در نتیجه با افزایش مقدار E2Fs آزاد، سلول وارد چرخه سلولی شده و تکثیر سلول صورت می پذیرد.

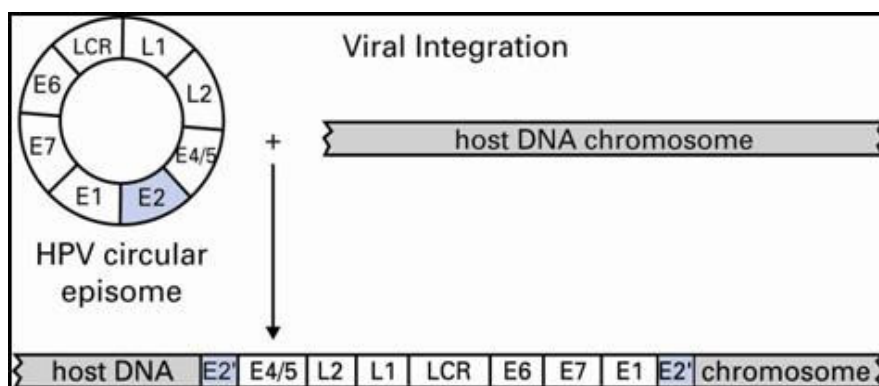
پروتئین P53 به طور معمول سبب ماندگاری سلول در فاز G1 (G1 arrest) می شود، همچنین نقش مهمی در فرآیند مرگ برنامه ریزی شده سلول (Apoptosis) و فرآیند ترمیم DNA (DNA Repair) دارد (9). یعنی به طور معمول در حالتی که تکثیر DNA دچار اشتباهاتی می شود p53 چرخه سلولی را متوقف می کند تا اصلاح DNA صورت پذیرد و در نتیجه از تکثیر توالی های موتاسیون یافته جلوگیری می کند. پروتئین E6 با تخریب P53 باعث کاهش مقدار آن شده و در نتیجه به مرور زمان با تجمع DNA هائی که توسط عوامل مختلف دچار موتاسیون شده اند، سلول دچار تغییراتی گشته و بدخیم (malignant transformation) می شود (13). باید اضافه نمود که

دخالته HPV در عملکرد دو پروتئین pRB و p53 تنها آغازگر اتفاقاتی است که می تواند منجر به سرطانی شدن سلولها شود و ممکن است فرد پس از گذشت 10 تا 20 سال از عفونت اولیه با HPV دچار سرطان شود (9) .

همانطور که در بالا ذکر شد پروتئینهای E6 و E7 دو پروتئینی می باشند که در ظهور سرطان بوسیله پاپیلوما ویروسهای انکوژنیک نقشی اساسی دارند و اصطلاحاً oncoprotein خوانده می شوند. محققان بر این باورند که عفونت مزمن با این نوع ویروسها و ناتوانی سیستم ایمنی در پاک کردن تمام سلولها از این ویروس از عوامل مهم پیوستن (integration) ژنوم ویروس به داخل ژنوم میزبان است، مرحله ای که در ایجاد تومور اساسی به نظر می آید. بر اثر این اتفاق ناحیه E2 تخریب می شود. این ناحیه مسئول ساخت پروتئینی است که با پیوستن به DNA عملکرد مهارى (down-regulation) روی بیان ژنهای E6 و E7 دارد. در نتیجه توقف عمل این ژن و ساخته نشدن این پروتئین ، مقدار پروتئینهای E6 و E7 در سلول افزایش می یابد (9) (شکل 3).

کشت ویروس پاپیلوما

با توجه به این مطلب که تنها سلولهای بنیادین اپیتلیوم مکعب مطابق محل مناسبی برای شروع عفونت پاپیلوما ویروس می باشند و تکمیل چرخه تکثیر ویروس نیز وابسته به مراحل مختلف تمایز کراتینوسیتها است، کشت این ویروس با روشهای معمول آزمایشگاهی انجام پذیر نیست و نیازمند شرایط پیچیده آزمایشگاهی و همچنین تجربه فراوان می باشد . دو روش کشت این ویروس استفاده از organotypic raft culture و یا روش xenografts in mouse skin می باشد (9, 14) .



شکل 3: پیوستن ژنوم HPV به کروموزوم میزبان و تخریب ناحیه E2 از ژنوم HPV.

مرجع:

<http://www.merckmedicus.com/pp/us/hcp/diseasemodules/hpvd/default.jsp>

پیشگیری از عفونت HPV

در تاریخ 28 جون 2006 گارداسیل (Gardasil) به عنوان اولین واکسنی که ممانعت کننده بروز سرطان سرویکس و سایر بیماریهائی است که در زنان توسط انواع خاصی از HPV حاصل می شود، ثبت گردید. این واکسن برای چهار نوع معروف HPV (11، 6، 16، 18) ساخته شده است و برای زنان در بین سنین 9-26 سال توصیه می گردد. این واکسن که بر روی حدود 11000 زن (مابین سنین 9-26) تست شده است، کاملاً بیخطر و بدون اثرات جانبی گزارش شده است. مطالعات انجام شده بر روی زنانی که این واکسن را دریافت کرده اند و سن آنها 16-26 سال بوده است و تا به حال هیچگونه عفونتی با این 4 نوع HPV نداشته اند نشان داده است که کارآئی این واکسن به جهت پیشگیری از سرطانهای سرویکس و زگیلهای تناسلی که عامل آنها این انواع از HPV باشند 100% است (1).

روشهای مختلف تشخیص و تایپینگ ویروس

با توجه به اهمیت و نقش HPV در سرطان رحم، تشخیص عفونت در مراحل اولیه و به دنبال آن درمان سریع در همان مراحل، می تواند از بروز سرطان پیشگیری نماید. از آنجا که کشت ویروس از نمونه های آزمایشگاهی امکانپذیر نمی باشد و تستهای سرولوژیک نیز به منظور تشخیص کافی نیستند، اولین روشهای تشخیصی، استفاده از بررسی سلولی و بافت شناسی بوده است (9) و از اوایل دهه 80 میلادی نیز تستهایی که در آنها از پروبهای (probe) اسید نوکلئیک برای تشخیص HPV استفاده می شد، در دسترس همگان قرار گرفت (25).

تست پاپ اسمیر :

این تست که به افتخار ترویج دهنده اش جورج پاپانیکیولو (George Papanicolaou)، به این اسم نامیده شده به عنوان تست معاینه ای (screening test) که تغییرات سلولهای گردن رحم (cervix) را گزارش می دهد بکار میرود. در اکثر این مواقع این تغییرات به علت عفونت HPV می باشند.

روش انجام این تست به این طریق است که به وسیله یک swab یا cytobrush که از طریق واژن وارد گردن رحم می شود، مقداری از سلولهای ناحیه گردن رحم خارج شده و سپس این نمونه بر روی اسلاید گذاشته شده و پس از فیکس شدن به آزمایشگاه پاتولوژی فرستاده می شود. لازم به ذکر است که روشهای جدید جمع آوری و پردازش نمونه ها در این تست ایجاد شده است و هدف آنها کم شدن مقدار نتایج منفی غلط حاصل از روشهای قدیمی است. در این روشها نمونه های جمع آوری شده به جای آنکه مستقیماً بر روی اسلاید گذاشته شوند در محلول محافظت کننده قرار می گیرند (9). در صورت مشاهده تغییرات سلولی و هرگونه سلولهای غیر طبیعی سریعاً تستهای بعدی تجویز می شود. در بعضی مواردی که سلولهای غیر طبیعی دیده می شوند روش دیگری برای معاینه بکار میرود که کولپوسکوپی (colposcopy) نام دارد و در این روش نواحی دارای سلولهای غیرطبیعی بررسی می شوند (2, 29).

استفاده از پروبهای اسید نوکلئیک:

استفاده از تستهای اولیه که در بیشتر موارد در آنها از پروبهایی که توسط P32 رادیواکتیو مارکدار شده بودند استفاده میشد، بسیار پر زحمت و دشوار بود و در کل موفقیت چندان را کسب نکردند. دلیل این امر بیشتر به این علت بود که این تستها توانایی تشخیص تمام انواع سرطانهای این ویروس را نداشتند و فرمت به کار رفته در آنها از حساسیت کافی برخوردار نبود. علاوه بر این تستها، از همان اواخر دهه 80 تستهایی که در آنها از روش In Situ Hybridization (ISH) استفاده می شد نیز در دسترس عموم قرار گرفت.

کیتهای تشخیصی جدید کیتهای Hybrid capture II (Digene Corp., Gaithersburg, Maryland) هستند که قابلیت تشخیص و تعیین تایپ انواع سرطانها (پرخطر) و برخی از انواع کم خطر را دارند. در این تست از پروبهای خاص ژنوتیپها استفاده می

شود و روش تشخیصی نیز از طریق chemiluminescence است و نه از طریق پرتوزایی رادیوکتیو و به همین علت در بیشتر آزمایشگاههای تشخیصی قابل انجام است (25).

به طور کلی تستهای مختلف مربوط به HPV که در آنها به نوعی هیبریداسیون صورت می گیرد را می توان به سه گروه تقسیم کرد:

(1) تستهایی که در آن استفاده مستقیم از پروب نوکلئیک اسید صورت می گیرد (Direct nucleic acid probe). (2) تستهایی که در آنها تقویت سیگنال (signal amplification) وجود دارد.

(3) تستهایی که در آنها تکثیر اسید نوکلئیک هدف (target amplification) دیده می شود.

در تستهای دسته اول می توان به روش southern blot اشاره نمود که در مطالعات اولیه HPV از آن استفاده می شده است. همچنین روش ISH که در آن وجود اسید نوکلئیک مورد نظر و یا میزان بیان ژن (gene expression) بر روی خود بافت تعیین می شود. از نکات منفی این دسته از تستها می توان به حساسیت پائین آنها، وقتگیر بودنشان و همچنین نیاز آنها به مقادیر بیشتری از DNA اشاره کرد.

در دسته دوم می توان به تست Hybrid Capture II اشاره کرد که در آن از پروبهای RNA که هرکدام مکمل ژنوتیپ خاصی می باشند استفاده می شود. هیبرید RNA-DNA توسط آنتی بادی مارکدار شده گرفتار شده و روش تشخیصی از راه واکنش chemiluminescence می باشد. در این روش به علت تقویت سیگنال، حساسیت کار به نسبت روشهای دسته اول افزایش می یابد. از نقاط ضعف این روش می توان به همپوشانی داشتن بعضی از تاییهای پرخطر و کم خطر اشاره کرد که تمایز آنها را ناممکن می سازد.

در دسته آخر در واقع باید به انواع تستهای PCR (Polymerase Chain Reaction) اشاره نمود (8, 20). با استفاده از این روش، تشخیص مقادیر بسیار کمی از DNA نیز امکان پذیر خواهد بود. نمونه ای از این روش کیت AMPLICOR HPV test (Roche Molecular

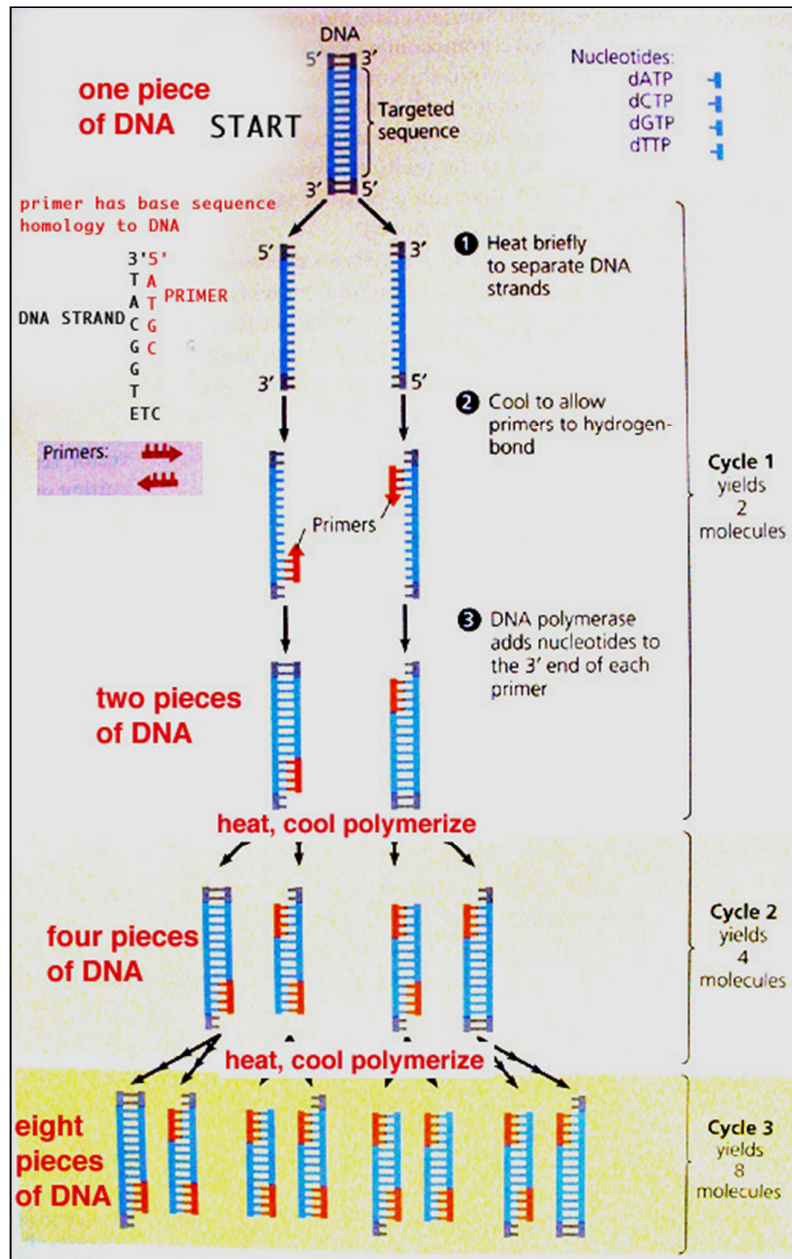
Roche Systems, Inc., Branchburg, NJ) است که با استفاده از آن می توان 13 تایپ سرطانزا را جداگانه تشخیص داد (19). کیت تجاری SPF10- INNO-LiPA نیز در واقع کیتی است که در آن پس از انجام PCR ژنوتیپهای مختلف توسط پروبهای الیگونوکلوئوتید که بر روی کاغذ نیتروسلولز ثابت شده اند، تشخیص داده می شوند. با استفاده از این روش می توان 43 تایپ متفاوت را تشخیص داد و 25 ژنوتیپ مختلف را از یکدیگر تفکیک کرد. آزمایشهای مختلف ثابت کرده اند که این تست از حساسیت بالایی برخوردار است و بسیار اختصاصی عمل می کند (17). Roche Linear array HPV genotyping test (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ) تست دیگری است که در آن از پرایمرهای PGMY استفاده می شود و می توان به وسیله آن 37 ژنوتیپ مختلف HPV را از یکدیگر تفکیک کرد (11).

روش Real-Time PCR و مزایای آن

کیت های تجاری معمول برای تشخیص و تایپینگ ویروس پاپیلوما به علت هزینه زیادی که در بر می گیرند عملاً قابل استفاده گسترده در کشورهای جهان سوم نمی باشند و شاید این مساله خود دلیلی برای افزایش بروز سرطان سرویکس در این کشورها باشد (16). علاوه بر این استفاده از تست های موجود بسیار وقت گیر و مشکل است. بنابر این محققان همچنان به دنبال روش هایی هستند که در آنها بتوان تشخیص، تایپینگ و تا حد امکان تعیین تیترا ویروس را در زمانی اندک و به صورت همزمان انجام داد. روش PCR که از نیمه دهه 80 توسط Kary Mullis رایج شد را می توان به عنوان مقدمه ای برای ظهور چنین تست هایی به حساب آورد. اما مشکل اساسی در روش های PCR معمولی آن است که پس از انجام PCR برای پی بردن به نتیجه آن، باید الکتروفورز و رنگ آمیزی انجام گیرد و در نتیجه کار در چند مرحله صورت می پذیرد (شکل 4).

اما پیدایش روش Real-Time PCR تغییری اساسی در روش های معمول ایجاد کرد. در این تکنیک که در اوایل دهه 90 ابداع شد امکان تشخیص و تعیین تایپ با حساسیت بالا به لحاظ تئوری وجود دارد. در این روش پس از تکثیر DNA، که به همان روش PCR معمولی انجام می گیرد، تشخیص

ژنوتیپهای مورد نظر به چند طریق امکان پذیر است، از جمله به وسیله پروبهای Taqman و پروبهای هیبریدیزاسیون (hybridization probes) و Molecular Beacons . پروبهای استفاده شده ، مکمل قسمتی از سکوانس DNA می باشند که توسط پرایمرهای استفاده شده در حال تکثیر است. هرچه مقدار amplicon ما در سیکلهای PCR افزایش یابد مقدار سیگنالی که از رنگهای فلورسنت دیده می شوند نیز بیشتر خواهد شد و بدین وسیله در حین انجام PCR می توان تیترو ویروس مورد نظر را تعیین کرد. همچنین با استفاده از منحنی های دمای تفکیک (Melting) امکان تعیین تایپ نیز وجود دارد. اموری که با استفاده از PCR معمولی امکان پذیر نمی باشد (15, 21, 24) .



شكل 4 : مراحل مختلف تست PCR.

مرجع: <http://academic.brooklyn.cuny.edu/biology/bio4fv/page/genetic-engin/pcr.html>

در روش استفاده از پروبهای هیبریدیزاسیون (hybridization probe) از دو پروب به نامهای انکور (anchor) و سنسور (sensor) استفاده می شود. این دو پروب در فاصله بسیار نزدیکی از یکدیگر (یعنی از 1 تا 5 نوکلئوتید) روی توالی هدف هیبرید می شوند. انتهای 3 پروب انکور و انتهای 5 پروب سنسور با رنگهای فلئورسنت نشاندار شده است. پس از اینکه هر دو پروب با ناحیه مکمل خودشان هیبرید شدند پدیده ای به نام (Fluorescence Resonance Energy Transfer) FRET روی می دهد. این پدیده بدان معنی است که تابش حاصل از تحریک دهنده (donor) توسط گیرنده (acceptor) جذب شده موجب تحریک آن و تابش با طول موج متفاوت از تحریک دهنده میشود. پرتو تابش شده توسط دستگاه خوانده شده و میزان افزایش این پرتو برابر است با میزان افزایش amplicon.

از آنجا که جدائی پروبها از روی amplicon موجب کاهش پدیده FRET می شود می توان با اندازه گیری تابش فلورسانس ، دمای تفکیک (Melting Temperature) پروب را تعیین نمود. این دما به نوبه خود به میزان انطباق و تفاوت پروب با amplicon بستگی دارد که در تایپهای مختلف ویروس متفاوت است. با این ترتیب با تعیین دمای تفکیک می توان تعداد بازهای غیر مکمل و بر اساس آن نوع تایپ ویروس را تعیین نمود (شکل 5). در حال حاضر یکی از روشهای تعیین تایپ ویروس هپاتیت C (HCV) همین روش می باشد (8). با توجه به موارد بالا، امکان بکار گیری این روش برای تعیین تایپ ویروس پاپیلوما نیز وجود خواهد داشت. نکته مهم اینکه ویروس HCV حدوداً دارای 10 تایپ و ساب تایپ می باشد اما در مورد HPV این رقم حدود 100 می باشد. وجود تفاوت های نوکلئوتیدی مناسب در یک ناحیه بین تایپهای HPV می تواند امکان استفاده از بیش از یک پروب را فراهم و نهایتاً منجر به تعیین تایپ شود.

الف :

ب :

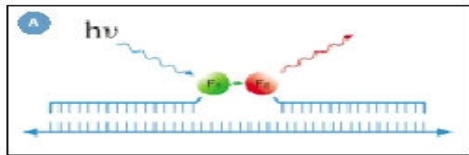


Figure 4A: Hybridization-Probe fluorescent emission by FRET.

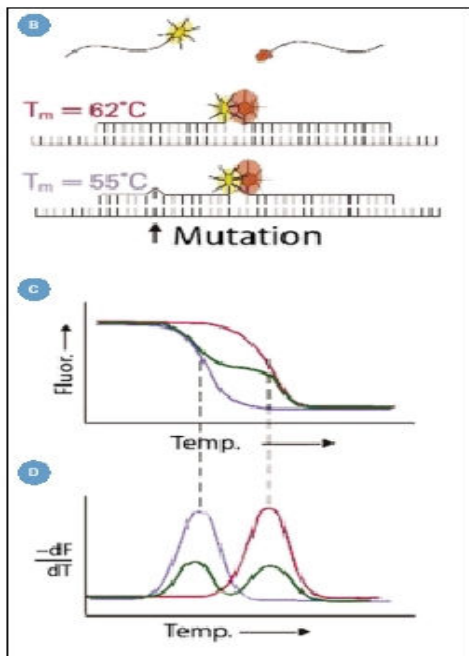
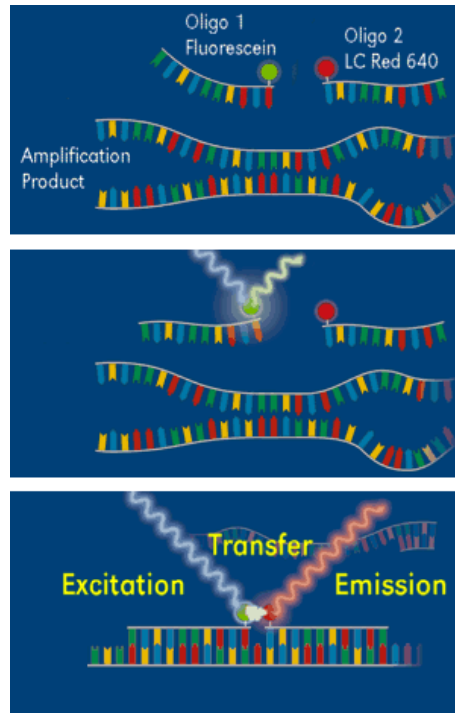


Figure 4: Melting curve analysis using Hybridization Probes.

— homozygous wild-type sample
— homozygous mutant sample
— heterozygous sample



شکل 5: الف- پدیده *FRET* . ب - تاثیر وجود نوکلئوتیدهای غیر مکمل مابین پروب و ناحیه مکمل

آن در دمای تفکیک (*melting temperature*) و تفاوت میان منحنی های دمای تفکیک .

مرجع: http://www.roche-applied-science.com/sis/lighttyper/lt_frames/frame_hyb.htm

فرضیه

مشابه روشهای تعیین ژنوتیپ ویروس HCV ، می توان ویروس HPV را نیز با استفاده از روش Real-Time PCR و پروبهای هیبریدیزاسیون و استفاده از ناحیه L1 تشخیص داد و تعیین تایپ نمود.

Objectives

1. استخراج تمامی ژنومهای شناخته شده ویروس پاپیلومهای انسانی از بانکهای اطلاعاتی Entrez gene, LosAlamos, EBI و VirGen.
2. همترازی (alignment) تمامی ژنومها و پرایمرهای GP.
3. تبدیل سکوانسهای تایپهای مورد نظر (انکوژنیک، محتملا انکوژنیک و کم خطر) به یک سکوانس نماینده به صورت SNP.
4. بررسی پرایمرهای GP6+ و GP5+ و طراحی پرایمرهای جدید.
5. تعیین محلی مناسب از ناحیه L1 برای پروبهای سنسور و انکور و سپس طراحی آنها.
6. تعیین نوکلئوتیدهای غیر مکمل تمامی تایپهای موجود از ویروس پاپیلومای انسانی با پرایمرها و پروبهای سنسور و انکور طراحی شده.

مواد و روش انجام کار :

منابع اطلاعات ژنتیکی:

ژنومها و سکوانسهای انواع مختلف HPV از چهار بانک اطلاعاتی زیر گرفته شدند (10, 12, 28).

Entrez gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/viruses>,
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide>) در مجموع 355 سکوانس از این بانک اطلاعاتی استخراج گردید و فرمت همه سکوانسها به فرمت FASTA تبدیل شدند.

Los Alamos (198 : <http://www.stdgen.lanl.gov/stdgen/virus>) : 198 سکوانس از این بانک اطلاعاتی استخراج گردید.

EBI (www.ebi.ac.uk/genomes/virus.html) : مجموعا 82 سکوانس مختلف مربوط به ویروس پاپیلومای انسانی از این بانک اطلاعاتی استخراج شد.

VirGen (<http://bioinfo.emet.in/virgen/virgen.html>) : فرمت سکوانسهای مربوط به این بانک اطلاعاتی به صورت FASTA بود. در مجموع 111 سکوانس از این مرجع استخراج شد.

نرم افزارهای مورد استفاده

همترازی سکوانسها و ناحیه L1 :

از برنامه (27) CLUSTAL X استفاده شد تا سکوانسهای موجود که به فرمت FASTA بودند با یکدیگر همتراز شوند.

ارزیابی الیگونوکلوئوتیدها (پرایمرها و پروبها) :

از برنامه Oligo analyzer 1.1.2 (Teemu Kuulasma, <http://www.uku.fi/~kuulasma/OligoSoftware>) برای ارزیابی پرایمرها و پروبها استفاده شد و مواردی از قبیل دمای ذوب (melting temperature, Tm) پرایمرها و پروبها ، همچنین درصد GC آنها و همچنین تعداد لوپهائی که هرکدام تشکیل می دهند و تعداد دایمرهای هر یک مشخص گردید.

از برنامه Geneious 2.0.4 (Biomatters Ltd. www.geneious.com) برای مقایسه دقیق سکوانسها و شمارش تعداد نوکلئوتیدهای غیر مکمل های هر یک با پرایمرها و پروبهای طراحی شده استفاده شد.

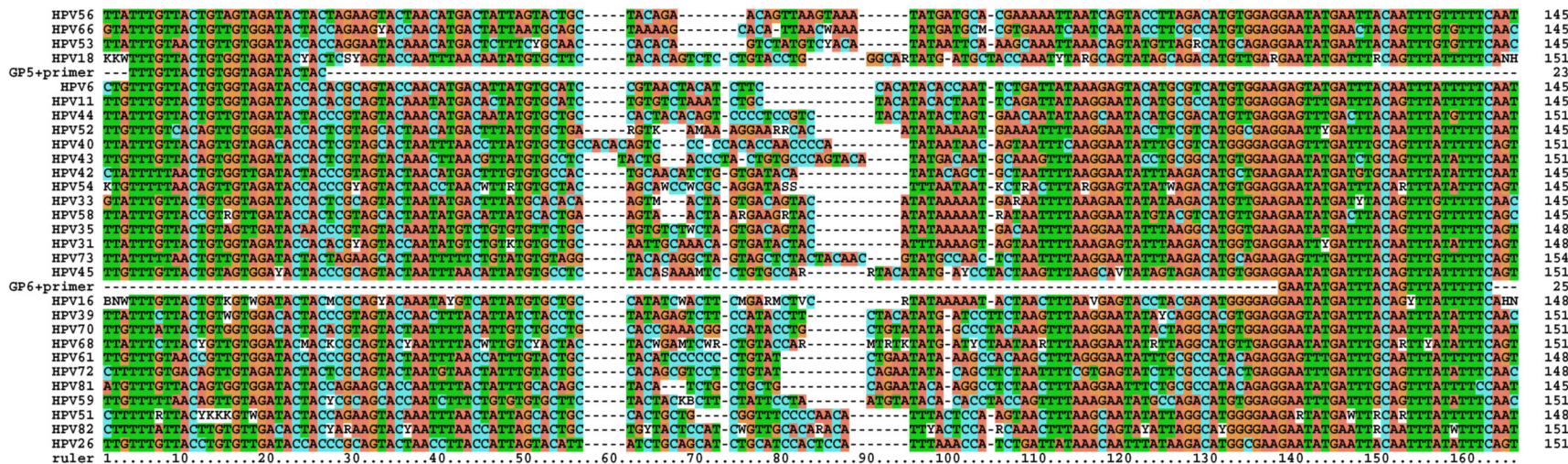
نتایج:

جمع آوری و همترازی سکوانس تایپهای مختلف HPV

355 سکوانس از Entrez gene، 198 سکوانس از Los Alamos، 82 سکوانس از EBI و 111 سکوانس از Virgene گرفته شد و در کل 746 سکوانس از انواع مختلف HPV بدست آمد (پیوست 1). سکوانسهای بدست آمده همراه با سکوانس پرایمرهای GP یعنی GP6+ و GP5+ (18) همه به فرمت FASTA تبدیل شدند. سپس تمامی سکوانسها توسط برنامه ClustalX، همتراز شدند. پس از این همترازی، ناحیه GP - که حدودا شامل 150 نوکلئوتید از قسمت L1 است - از تمام سکوانسها جدا شد و سکوانسهای که دارای این ناحیه نبودند حذف شدند و یکبار دیگر سکوانسهای باقیمانده که در مجموع 534 سکوانس بودند، بایکدیگر همتراز شدند. این همترازی بدین منظور صورت گرفت که میزان شباهت سکوانس تایپهای مختلف در ناحیه GP بررسی شود و نواحی مورد قبول برای طراحی پرایمرها و پروبها تعیین گردد. همچنین به کمک آن میزان شباهت سکوانس تایپهای مختلف با پرایمرهای GP6+ و GP5+ مورد بررسی قرار گرفت (پیوست 2).

تهیه SNP map برای تایپهای مختلف و همترازی سکوانسهای SNP

برای هرتایپ از HPV چند سکوانس از بانکهای اطلاعاتی متفاوت وجود داشت. برای اینکه یک سکوانس نماینده از هریک از تایپها وجود داشته باشد سکوانسهای تایپهای مورد نظر که شامل تایپهای 18، 16، 33، 31، 45، 39، 35، 52، 51، 56، 59، 58، 68، 73، 82، 26، 53، 66، 6، 11، 40، 42، 43، 44، 54، 61، 70، 72، 81 بودند به یک سکوانس دارای SNP تبدیل شدند (پیوست 3). این سکوانسهای نماینده نیز با یکدیگر همتراز شدند (شکل 6).



شکل 6: 29 تایپ انتخابی HPV در ناحیه GP به صورت سکوانسهای SNP پس از همترازی.

S = G/C	Y = C/T	M = A/C	H = A/C/T	D = A/G/T	N = A/C/G/T	X = Modif.
W = A/T	R = A/G	K = G/T	B = C/G/T	V = A/C/G	I = inosin	S = Thio

یکی از سکوانسهای HPV 18 در هنگامی که سکوانسها به صورت SNP نوشته می شدند از سکوانسها حذف گردید. این حذف به این دلیل صورت گرفت که سکوانس این ایزوله از HPV 18 با هیچ کدام از 19 سکوانس دیگر مطابقت نداشت و دارای SNP هائی بود که در بقیه دیده نمی شد (رجوع به پیوست 4).

نواحی انتخابی برای طراحی پرایمرها و پروبها

LOCUS PPH16 7904 bp DNA circular VRL 18-MAR-1994
 DEFINITION Human papillomavirus type 16 (HPV16), complete genome.
 ACCESSION K02718
 VERSION K02718.1 GI:333031
 KEYWORDS circular; complete genome.
 SOURCE Human papillomavirus type 16
 ORGANISM [Human papillomavirus type 16](#)
 Viruses; dsDNA viruses, no RNA stage; Papillomaviridae;
 Alphapapillomavirus.

MY11

6541 ctgatgccca aatattcaat aaaccttatt gggttacaacg agcacagggc cacaataatg

GP5+

6601 gcatttggtg gggtaaccaa cta~~tttggtta~~ ~~ctggtggtga~~ tactacacgc agtacaaata

6661 tgtcattatg tgctgccata tctacttcag aaactacata taaaaaatact aactttaagg

GP6+

New primer

6721 agtacctacg acatggggag ~~gaatatgatt~~ ~~tacagtttat~~ ~~ttttcaactg~~ tgcaaaataa

6781 ~~cottaactgc~~ ~~agacgttatg~~ ~~acata~~catac atttotatgaa ttccactatt ttggaggact

شکل 7: نواحی انتخابی برای طراحی پرایمرها و پروبها روی HPV 16 (NCBI Genbak GI#333031).

ناحیه GP : این ناحیه مابین پرایمرهای GP6+ و GP5+ قرار دارد و معادل توالی نوکلئوتیدهای 6624-6765 از HPV 16 (NCBI Genbak GI#333031) می باشد (مابین ناحیه زرد و قرمز).

ناحیه GP downstream : این ناحیه معادل نوکلئوتیدهای 6624-6805 از HPV 16 می باشد. (مابین ناحیه زرد و سیاه).

ناحیه GP upstream : این ناحیه معادل نوکلئوتیدهای 6582-6765 از HPV 16 می باشد (مابین ناحیه آبی و قرمز).

1. بررسی ناحیه GP :

در ابتدا ناحیه اول مورد بررسی قرار گرفت. توالی معادل هریک از پرایمرهای GP از توالی ناحیه L1 هر یک از تایپها (معادل توالی نوکلئوتیدهای 6624-6646 از HPV 16 برای پرایمر GP5+ و نوکلئوتیدهای 6765-6741 برای پرایمر GP6+) به صورت جداگانه جدا شدند. سکوانسهای جدا شده از تایپهای موردنظر با سکوانس مربوط به این پرایمرها مقایسه شدند. با این مقایسه امکان استفاده از این پرایمرها در PCR مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به این امر که دمای تفکیک مناسب برای پرایمرها 52-58 درجه می باشد (3) و هر نوکلئوتید غیر مکمل (mismatch) حدودا 3.5 درجه از دمای تفکیک می کاهد، برای قابل انجام بودن کار حداکثر 3 نوکلئوتید غیر مکمل با سکوانس پرایمرها می توانست وجود داشته باشد (شکل 8 و 9) .

به منظور کاهش فراوانی نوکلئوتیدهای غیر مکمل و سهولت در طراحی پرایمرها، از بین 29 تایپ بالا 13 تایپ شایع انتخاب شدند. با توجه به اینکه میزان نوکلئوتیدهای غیر مکمل بین پرایمرها کاهش نیافت (9 نوکلئوتید در 29 تایپ و 9 نوکلئوتید در 13 تایپ در پرایمر GP5+ و 12 نوکلئوتید در 29 تایپ و 11 نوکلئوتید در 13 تایپ در پرایمر GP6+) طراحی پرایمرها بر اساس همان 29 تایپ اولیه انجام گرفت (شکل 10) .

GP5+	---TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC---
HPV6	CTGTTTGTACTGTGGTAGATACCACACG
HPV11	TTGTTTGTACTGTGGTAGATACCACACG
HPV18	KKWTTTGTACTGTGGTAGATACYACTCS
HPV33	GTATTTGTACTGTGGTAGATACCACTCG
HPV31	TTATTTGTACTGTGGTAGATACCACACG
HPV44	TTATTTGTACTGTTGTAGATACTACCCG
HPV56	TTATTTGTACTGTAGTAGATACTACTAG
HPV66	GTATTTGTACTGTTGTGGATACTACCAG
HPV16	BNWTTTGTACTGTTGTGATAGATACTACMCG
HPV43	TTGTTTGTACAGTGGTAGATACCACTCG
HPV81	ATGTTTGTACAGTGGTGGATACTACCAG
HPV42	CTATTTTAACTGTGGTTGATACTACCCG
HPV70	TTGTTTATTACTGTGGTGGACACTACACG
HPV73	TTATTTTAACTGTTGTAGATACTACTAG
HPV72	CTTTTGTGACAGTTGTAGATACTACTCG
HPV45	TTGTTTGTACTGTAGTGGAYACTACCCG
HPV35	TTGTTTGTACTGTAGTTGATACAACCCG
HPV53	TTATTTGTAACTGTTGTGGATACCACCAG
HPV58	TTATTTGTTACCGTRGTTGATACCACTCG
HPV40	TTATTTGTTACAGTTGTAGACACCACTCG
HPV39	TTATTTCTTACTGTWGTGGACACTACCCG
HPV59	TTGTTTTTAACAGTTGTAGATACTACYCG
HPV61	TTGTTTGTAAACCGTTGTGGATACCACCCG
HPV52	TTGTTTGTACAGTTGTGGATACCACTCG
HPV68	TTATTTCTTACYGTTGTGGATACMACKCG
HPV54	KTGTTTTTAACAGTTGTAGATACCACCCG
HPV26	TTGTTTGTACCTGTGTTGATACCACCCG
HPV82	CTTTTTATTACTTGTGTTGACACTACYAR
HPV51	CTTTTTRTTACYKKKGTTGATAGATACTACCAG

شکل 8: مقایسه بین پرایمر GP5+ و سکوانس 29 تایپ HPV در این ناحیه. نواحی زرد نشاندهنده نوکلئوتیدهای غیر مکمل می باشند.

GP6+	GAATATGATTACAGTTTATTTTC-----
HPV45	GAGGAATATGATTACAGTTTATTTTTCAGT---
HPV35	GAAGAATATGATTACAGTTTATTTTTCAGT---
HPV18	GARGAATATGATTTRCAGTTTATTTTTCANH---
HPV16	GAGGAATATGATTACAGYTTATTTTTCAHN---
HPV54	GAGGAATATGATTACARTTTATAATTTTCAGT---
HPV70	GAGGAATATGATTACAATTTATAATTTCAAT---
HPV81	GAGGAATATGATTGTCAGTTTATTTTCCAAT---
HPV39	GAGGAGTATGATTACAAATTTATAATTTCAAC---
HPV6	GAAGAGTATGATTACAAATTTATTTTTCAT---
HPV11	GAGGAGTTTGATTACAGTTTATTTTTCAT---
HPV58	GAAGAATATGACTTACAGTTTGTTTTTCAGC---
HPV33	GAAGAATATGATYTACAGTTTGTTTTTCAC---
HPV56	GAGGAATATGAATTACAATTTGTTTTTCAT---
HPV72	GAGGAATTTGATTTGCAGTTTATAATTTCAAC---
HPV59	GAGGAATTTGATTTGCAGTTTATAATTTCAAC---
HPV52	GAGGAATTYGATTACAAATTTATTTTTCAT---
HPV26	GAAGAATATGAATTACAATTTATAATTTCACT---
HPV43	GAAGAATATGATCTGCAGTTTATAATTTCAAT---
HPV40	GAGGAGTTTGATTTGCAGTTTATTTTTCAGT---
HPV73	GAAGAGTTTGATTTACAGTTTGTTTTTCAGT---
HPV66	GAGGAATATGAACACAGTTTGTTGTTTCAAC---
HPV53	GAGGAATATGAATTACAATTTGTGTTTCAAC---
HPV82	GAAGAATATGAATTRCAATTTATWTTTCAAT---
HPV42	GAAGAATATGATGTGCAATTTATAATTTCAAT---
HPV68	GAGGAATATGATTTGCARTTYATAATTTCACT---
HPV51	GAAGARTATGAWTTRCARTTTATTTTTCAT---
HPV61	GAGGAGTTTGATTTGCAATTTATTTTTCAGT---
HPV44	GAGGAGTTTGACTTACAATTTATGTTTCAAT---
HPV31	GAGGAATTYGATTACAAATTTATAATTTCACT---

شکل 9: مقایسه بین پرایمر GP6+ و سکوانس 29 تایپ HPV در این ناحیه. نواحی زرد نشاندهنده نوکلئوتیدهای غیر مکمل می باشند.

GP5+ ---TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC---

HPV39 TTATTTCTTACTGTWGTGGACACTACCCG

HPV68 TTATTTCTTACYGTTGTGGATACMACKCG

HPV45 TTGTTTGTTACTGTAGTGGAYACTACCCG

HPV18 KKWTTTGTTACTGTGGTAGATACYACTCS

HPV59 TTGTTTTTAACAGTTGTAGATACTACYCG

HPV56 TTATTTGTTACTGTAGTAGATACTACTAG

HPV33 GTATTTGTTACTGTGGTAGATACCACTCG

HPV58 TTATTTGTTACCGTRGTTGATACCACTCG

HPV35 TTGTTTGTTACTGTAGTTGATACAACCCG

HPV52 TTGTTTGTCACAGTTGTGGATACCACTCG

HPV31 TTATTTGTTACTGTGGTAGATACCACACG

HPV16 BNWTTTGTTACTGTGKTWGATACTACMCG

HPV51 CTTTTTRTTACYKKKGTTWGATACTACCAG

GP6+ GAATATGATTACAGTTTATTTTTC-----

HPV39 GAGGAGTATGATTTACAATTTATATTTCAAC---

HPV68 GAGGAATATGATTTGCARTTYATATTTTCAGT---

HPV45 GAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTTTCAGT---

HPV35 GAAGAATATGATTTACAGTTTATTTTTTCAGT---

HPV18 GARGAATATGATTTTRCAGTTTATTTTTTCANH---

HPV59 GAGGAATTGATTTGCAGTTTATATTTCAAC---

HPV56 GAGGAATATGAATTACAATTTGTTTTTCAAT---

HPV33 GAAGAATATGATYTACAGTTTGTTTTTCAAC---

HPV58 GAAGAATATGACTTACAGTTTGTTTTTCAGC---

HPV52 GAGGAATTYGATTTACAATTTATTTTTTCAAT---

HPV31 GAGGAATTYGATTTACAATTTATATTTTCAGT---

HPV16 GAGGAATATGATTTACAGYTTATTTTTTCAHN---

HPV51 GAAGARTATGAWTTRCARTTTATTTTTTCAAT---

شکل 10: مقایسه بین پرایمرهای GP5+ و GP6+ و سکوانس 13 تایپ شایع HPV در این ناحیه. نواحی زرد نشاندهنده نوکلئوتیدهای غیر مکمل می باشند.

طراحی پرایمرهای جدید

از آنجا که بیش از 3 نوکلئوتید غیر مکمل مابین سکوانس تایپهای 26,53,58,61,52,68,40,54,82,39,59,51 و پرایمر GP5+ و بیش از 3 نوکلئوتید غیر مکمل مابین سکوانس تایپهای 42,82,53,66,68,51,61,44,31 و پرایمر GP6+ وجود داشت، تغییراتی در سکوانس این پرایمرها با توجه به اصول اولیه طراحی پرایمر داده شد (3). در طراحی پرایمرهای جدید از اینوزین (i) استفاده شد که میتواند با هر نوکلئوتید دیگری پیوند برقرار کند و در نتیجه پرایمرهای جدید، پرایمرهای Degenerate بودند که در به ترتیب در 3 و 2 ناحیه اینوزین داشتند (شکل 11 و 12).

NGP6+	3'-CTTAiACTAAAiGTiAAATAAAAAGT-5'	
NGP6+	5'-GAATiTGATTiCAiTTTATTTTTC-3'	Mismatches
HPV45	GAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTTCAGT	0
HPV35	GAAGAATATGATTTACAGTTTATTTTTCAGT	0
HPV18	GARGAATATGATTTTCAGTTTATTTTTCANH	0
HPV16	GAGGAATATGATTTACAGYTTATTTTTCAHN	0/1
HPV81	GAGGAATATGATTTGCAGTTTATTTTCCAAT	1
HPV61	GAGGAGTTTGATTTGCAATTTATTTTTCAGT	1
HPV40	GAGGAGTTTGATTTGCAAGTTTATTTTTCAGT	1
HPV72	GAGGAATTTGATTTGCAGTTTATATTTTCAAC	1
HPV59	GAGGAATTTGATTTGCAGTTTATATTTTCAAC	1
HPV52	GAGGAATTYGATTTACAATTTATTTTTCAT	0/1
HPV51	GAAGARTATGAWTTRCARTTTATTTTTCAT	0/2
HPV6	GAAGAGTATGATTTACAATTTATTTTTCAT	1
HPV11	GAGGAGTTTGATTTACAGTTTATTTTTCAT	1
HPV54	GAGGAATATGATTTACARTTTATATTTTTCAGT	1
HPV70	GAGGAATATGATTTACAATTTATATTTTTCAT	1
HPV33	GAAGAATATGATYTACAGTTTGTTTTTCAAC	1/2
HPV58	GAAGAATATGACTTACAGTTTGTTTTTCAGC	2
HPV39	GAGGAGTATGATTTACAATTTATATTTTCAAC	2
HPV56	GAGGAATATGAATTACAATTTGTTTTTCAAT	2
HPV43	GAAGAATATGATCTGCAGTTTATATTTTCAAT	2
HPV26	GAAGAATATGAATTACAATTTATATTTTTCAGT	2
HPV73	GAAGAGTTTGATTTACAGTTTGTTTTTTCAGT	2
HPV31	GAGGAATTYGATTTACAATTTATATTTTTCAGT	1/2
HPV82	GAAGAATATGAATTTRCAATTTATWTTTTCAT	1/2
HPV42	GAAGAATATGATGTGCAATTTATATTTTTCAT	2
HPV68	GAGGAATATGATTTGCARTTYATATTTTTCAGT	1/2
HPV53	GAGGAATATGAATTACAATTTGTGTTTCAAC	3
HPV44	GAGGAGTTTGACTTACAATTTATGTTTTCAT	3
HPV66	GAGGAATATGAACCTACAGTTTGTTGTTTCAAC	4

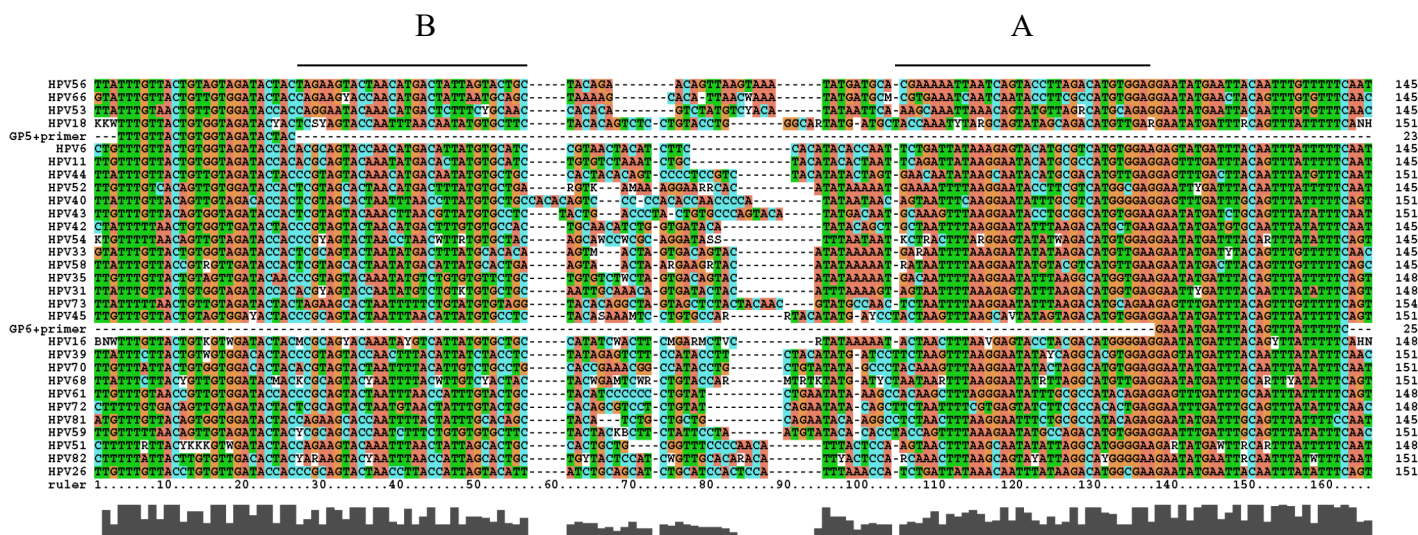
شکل 11: مقایسه بین پرایمر NGP6+ و سکوانس 29 تایپ HPV در این ناحیه. نواحی زرد نشاندهنده نوکلئوتیدهای غیر مکمل می باشند.

NGP5+ 5'-TTTGTTACTGTiGTiGATACTAC-3'	Mismatches
HPV66 GTATTTGTTACTGTTGTGGATACTACCAG	0
HPV44 TTATTTGTTACTGTTGTAGATACTACCCG	0
HPV56 TTATTTGTTACTGTAGTAGATACTACTAG	0
HPV16 BNWTTTGTTACTGTKGTWGATACTACMCG	0
HPV45 TTGTTTGTTACTGTAGTGGAYACTACCCG	0/1
HPV35 TTGTTTGTTACTGTAGTTGATACAACCCG	1
HPV81 ATGTTTGTTACAAGTGGTGGATACTACCAG	1
HPV6 CTGTTTGTTACTGTGGTAGATACCACACG	1
HPV11 TTGTTTGTTACTGTGGTAGATACCACACG	1
HPV18 KKWTTTGTTACTGTGGTAGATACYACTCS	0/1
HPV33 GTATTTGTTACTGTGGTAGATACCACTCG	1
HPV31 TTATTTGTTACTGTGGTAGATACCACACG	1
HPV43 TTGTTTGTTACAGTGGTAGATACCACTCG	2
HPV42 CTATTTTAACTGTGGTTGATACTACCCG	2
HPV73 TTATTTTAACTGTTGTAGATACTACTAG	2
HPV72 CTTTTTGTGACAGTTGTAGATACTACTCG	2
HPV70 TTGTTTATTACTGTGGTGGACACTACACG	2
HPV53 TTATTTGTAACCTGTTGTGGATACCACCAG	2
HPV58 TTATTTGTTACCGTRGTTGATACCACTCG	2
HPV39 TTATTTCTTACTGTWGTGGACACTACCCG	2
HPV52 TTGTTTGTACAGTTGTGGATACCACTCG	3
HPV40 TTATTTGTTACAGTTGTAGACCACTCG	3
HPV59 TTGTTTTTAACAGTTGTAGATACTACYCG	3
HPV61 TTGTTTGTAAACCGTTGTGGATACCACCCG	3
HPV68 TTATTTCTTACYGTTGTGGATACMACKCG	2/3
HPV26 TTGTTTGTTACCTGTGTTGATACCACCCG	4
HPV51 CTTTTTRTTACYKKKGTWGATACTACCAG	0/4
HPV82 CTTTTTATTACTTGTGTTGACACTACYAR	4
HPV54 KTGTTTTTAACAGTTGTAGATACCACCCG	4

شکل 12: مقایسه بین پرایمر NGP5+ و سکوانس 29 تایپ HPV در این ناحیه. نواحی زرد نشاندهنده نوکلئوتیدهای غیر مکمل می باشند.

طراحی پروبها (انکور و سنسور)

با توجه به توالی منطقه GP از ناحیه L1 ، دو ناحیه A و B (شامل نوکلئوتیدهای 6708 تا 6740 برای ناحیه A و نوکلئوتیدهای 6647 تا 6676 برای ناحیه B) برای طراحی پروبها در نظر گرفته شد.



شکل 13: نواحی A و B که برای طراحی پروبها در ناحیه GP انتخاب شدند.

بررسی ناحیه A

برای طراحی پروب ، ابتدا 29 تایپ مورد نظر بر اساس شباهت توالی در ناحیه انکور و سنسور به گروههای مختلفی تقسیم شدند تا برای هر گروه یک پروب اختصاصی طراحی شود.

هنگام طراحی پروبها نکات زیر در نظر گرفته شدند:

دمای تفکیک انکور حداقل 3 درجه بالاتر از دمای تفکیک سنسور باشد (با احتساب میزان نوکلئوتیدهای غیرمکمل). دمای تفکیک سکوانسها نمی بایست از حدود 45 درجه کمتر می بود زیرا که هیبرید شدن در دماهای پائین عملی تخصصی به حساب نمی آید. علاوه بر این همپوشانی تایپها نیز می بایست مدنظر قرار می گرفت.

گروهبندیهای مختلفی انجام گرفت چه در مورد پروبهای انکور و چه در مورد پروبهای سنسور. با توجه به محدودیت طول پروبها به میزان حداکثر 16 نوکلئوتید ، بالاترین دمای تفکیک ممکن حدود 54 درجه محاسبه شد که کمتر از میزان مورد قبول است.

بررسی ناحیه B

محدودیت طولی توالی مورد استفاده برای طراحی پروبها در این ناحیه نیز مانند ناحیه A (که در بالا ذکر شد) مشاهده شد. با در نظر گرفتن این محدودیت، افزایش دمای تفکیک فقط با استفاده از Locked Nucleic Acids (LNAs) امکان پذیر می باشد و با توجه به هزینه بالای LNA ، از طراحی آنها صرفنظر شد.

(http://www.sigmaaldrich.com/Brands/Sigma_Genosys/DNA_Probes/Product_Lines/LNA_Probes.html)

2. بررسی ناحیه GP downstream

با توجه به این که طراحی پروبها در ناحیه GP امکانپذیر نبود، ناحیه GP downstream مورد بررسی قرار گرفت. این ناحیه معادل نوکلئوتیدهای 6805-6624 از HPV 16 (GI#333031) می باشد. طراحی پروبها در این ناحیه امکان استفاده از ناحیه معادل پرایمر+GP6 شامل نوکلئوتیدهای 6766-6741 از (GI#333031) HPV 16 را برای طراحی پروب انکور فراهم می کند، اما با توجه به تعداد زیاد نوکلئوتیدهای غیرمکمل با پرایمر طراحی شده (شامل نوکلئوتیدهای 6805-6780 از HPV 16 (GI#333031)) از استفاده از این ناحیه صرفنظر شد (شکل 14) .

NewP:	ACATTAAGTGCAGAGTTATGGCATA	Mismatches
HPV45	ACTTTAACTGCAGAGGTTATGTCATA	2
HPV66	ACCTTAAGTGCAGAGTTATGGCATA	2
HPV70	ACATTAAGTGCWAGCGTTATGGCCTA	2
HPV16	ACCTTAAGTGCAGACGTTATGACATA	3
HPV33	ACCTTAAGTGCAGAGTTATGACATA	3
HPV59	ACATTAAGTACAGAGGTAATGTCATA	3
HPV58	ACACTAAGTGCAGAGRTAATGACATA	3
HPV52	ACATTAACAGCTGATGTTATGACATA	3
HPV42	ACATTAAGTGTGAAGTTATGTCATA	3
HPV40	ACCTTAAATGCAGAGGTTATGACATA	3
HPV56	ACTTTGTCTGCAGAGGTTATGGCATA	3
HPV18	ACTTTAACTGCAGATGTTATGTCCTA	4
HPV11	ACATTATCTGCAGAGTCATGGCCTA	4
HPV35	ACACTAACAGCAGATGTTATGACATA	4
HPV51	ACTTTAACTACAGAGGTAATGGCTTA	4
HPV31	ACATTATCTGCAGACATAATGACATA	4
HPV44	ACCTTAACGGCGGAGGTAATGGCCTA	4
HPV73	AGTTTAAGTACTGAGGTAATGACATA	5
HPV6	ACATTGTCTGCTGAAGTAATGGCCTA	5
HPV39	ACATTAACAAGTATGTTATGTCCTA	5
HPV72	CACCTTAAGTCTGAAATTATGGCCTA	6
HPV43	ACGCTAAACCCAGAGGTTATGACATA	6
HPV53	TCCCTGTCTGCTGAGGTTATGGCCTA	6
HPV26	ACACTTACAACAGATGTTATGGCTTA	6
HPV54	ACCCTTACWGCAGATGTTATGGCCTA	5/6
HPV82	ACTYTAACWACTGARRTDATGGCTTA	3/7
HPV68	ACATTRTCMACTGATGTAATGTCMTA	6/8
HPV61	CATTTAACCCCTGAAATTATGGCCTA	7
HPV81	CAGTTAACACCAGAAATTATGGCCTA	7

شکل 14 : مقایسه توالی پرایمر جدید در ناحیه *GP downstream* با سکوانس 29 تایپ *HPV*.

3. بررسی ناحیه GP upstream

پس از بررسی ناحیه GP downstream ، ناحیه GP upstream که معادل نوکلئوتیدهای 6582-6766 از HPV 16 (GI#333031) می باشد مورد بررسی قرار گرفت. در این طرح به جای استفاده از پرایمر GP5+ از پرایمر MY11 (22) که معادل نوکلئوتیدهای 6582-6600 از HPV 16 (GI#333031) می باشد استفاده شد.

طراحی پرایمرها:

پرایمر GP6+ که قبلاً طراحی شده بود و در این ناحیه از آن استفاده شد ولی از آنجا که پرایمرهای MY11 در 3 ناحیه دارای SNP می باشند، برای اینکه به جای 8 سکوانس مختلف برای پرایمر، تنها یک سکوانس وجود داشته باشد و هزینه آن به حداقل برسد، سکوانس آن مجدداً بررسی شد و در 3 ناحیه از این پرایمر از اینوزین (i) استفاده شد (شکل 15).

NMY11:		GCiCAGGGiCATAAiAATGG		
MY11primer		GCMCAGGGWCATAAYAATGG	Mismatches	Tm: 58.4-62.5
HPV6	AAA	GCCCAGGGACATAACAATGG	0	
HPV26	CGT	GCACAGGGTCATAATAATGG	0	
HPV53	CGT	GCCCAGGGACATAATAATGG	0	
HPV18	AAG	GCACAGGGWCATAACAATGG	0	
HPV43	AAG	GCCCAGGGACATAATAATGG	0	
HPV11	AAG	GCTCAGGGACATAACAATGG	0	
HPV40	AAG	GCCCAGGGCCATAACAATGG	0	
HPV45	AAG	GCCCAGGGCCATAACAATGG	0	
HPV81	CGG	GCACAGGGCCATAATAATGG	0	
HPV66	CGT	GCACAGGGYCATAATAATGG	0	
HPV39	AAG	GCCCAGGGYCAYAAAYAATGG	0/1	
HPV33	CGT	GCACAAAGGTCATAATAATGG	1	
HPV73	AAG	GCACAGGGACAAAATAATGG	1	
HPV58	CGT	GCACAAAGGTCATAACAATGG	1	
HPV70	AAG	GCCCAGGGACACAATAATGG	1	
HPV72	CGC	GCCCAGGGTCACAACAATGG	1	
HPV54	CGG	GCCCAGGGTCARAACAATGG	1	
HPV56	CGT	GCCCAAGGCCATAATAATGG	1	
HPV35	CGT	GCACAAAGGCCATAATAATGG	1	
HPV51	CGT	GCGCAGGGTCACAATAATGG	1	
HPV61	CGT	GCCCAGGGCCACAACAATGG	1	
HPV16	CGA	GCACAGGGCCACAATAATGG	1	
HPV44	AAG	GCGCAGGGCCACAATAATGG	1	
HPV52	CGT	GCGCAGGGCCACAATAATGG	1	
HPV31	CGT	GCTCAGGGWCAYAAKAATGG	0/1	
HPV82	CGC	GCCCAGGGMCAYAAKAATGG	0/1	
HPV68	AAG	GCMCAGGGWCAYAAASAMTGG	0/2	
HPV42	CAA	GCACAAAGGACACAATAATGG	2	
HPV59	AAG	GCTCAGGGTTTAAACAATGG	3	

شکل 15: مقایسه توالی پرایمر MY11 با سکوانس 29 تایپ HPV.

طراحی پروبها:

LOCUS PPH16 7904 bp DNA circular VRL 18-MAR-1994
 DEFINITION Human papillomavirus type 16 (HPV16), complete genome.
 ACCESSION K02718
 VERSION K02718.1 GI:333031
 KEYWORDS circular; complete genome.
 SOURCE Human papillomavirus type 16
 ORGANISM [Human papillomavirus type 16](#)
 Viruses; dsDNA viruses, no RNA stage; Papillomaviridae;
 Alphapapillomavirus.

NMY11

6541 ctgatgccca aatattcaat aaaccttatt ggttacaacg agcacagggc cacaataatg

6601 gcatttggtg gggtaaccaa ctatttggtta ctgttggtga tactacacgc agtacaaata
 ANCHOR SENSOR

6661 tgtcattatg tgctgccata tctacttcag aaactacata taaaaatact aactttaagg

NGP6+

6721 agtacctacg acatggggag gaatatgatt tacagtttat ttttcaactg tgcaaaataa

شکل 16: نواحی تعیین شده نهائی برای طراحی پرایمرها و پروبها روی HPV 16 (NCBI Genbak

GI#333031)

برای طراحی پروبها تایپهای مهم به عنوان سرگروه انتخاب می شدند و سکوانس پروب از روی آنها طراحی می شد و سپس این سکوانس با سکوانس تایپهای مختلف در این ناحیه بررسی میشد و نوکلئوتیدهای غیر مکمل یادداشت میشد. این کار برای تک تک پروبهای سنسور و انکور انجام گرفت. سپس از میان پروبهای مختلف (جدول 1، 2، 3 و 4) پروبهایی که دارای دمای تفکیک مناسبتری بودند انتخاب شدند (جدول 5 و 6).

جدول 1: نام و سکوانس تمام پروبهای انکور .

Anchor's name	Sequence
A11(18)	GGCATAATCAATTNTTGTGTTACTGTGGTAGATACNAC
A12	GGCATAATCAATTNTTGTGTTACTGTGGTAGANACNAC
A121	GGCATAATCAATTNTTGTGTTACTGTGGTAGANACTAC
A21(31)	GGGGNAATCAGTTATTTGTTACTGTNGTAGATACCAC
A22(31)	GNAATCAGTTATTTGTTACTGTNGTAGATACCAC
A23(31)	GNAATCAGTTATTTGTTACNGTNGTAGATACCAC
A31(16)	GGGGTAACCAANTGTTTGTGTTACTGTNGTTGATACTAC
A41(45)	GGCATAATCAGTTGTTTGTGTTACTGTAGTGGAYACTAC
A42(39)	GGCATAATCAATTGTTTNTTACTGTNGTGGACACTAC
A51(52)	AATGAGTTGTTTGTNACAGTGGTGGATACCAC
A52	CAATGANTTGTGTTTGTNACAGTTGTGGATACCAC
A53	AATGANTTGTGTTTGTNACAGTTGTGGATACCAC
A61(51,82)	GGAACAATCAGCTTTTNTTACTTGTGTNGATACTAC

جدول 2: مقایسه سکوانس پروبهای انکورو 29 تایپ HPV (اعداد نوشته شده نشاندهنده تعداد نوکلئوتیدهای غیر

مکمل می باشد).

HPV types	A11	A12	A121	A21	A22	A23	A31	A41	A42	A51	A52	A53	A61
18	0/2	0/2	0/3	4/8	2/6	2/6	4/7	5/8	3/6	5/8	6/9	5/8	7/10
68	3/4	3/4	4/5	7/9	4/6	4/5	6/8	6/7	3/4	6/7	5/6	4/5	7/9
6	3	3	4	4	3	3	3	8	6	5	6	5	9
31	4	4	5	0	0	0	6	8	8	4	5	5	8
33	5	5	6	1	1	1	6	9	9	5	6	6	8
11	4	5	6	4	3	3	4	9	8	5	6	5	11
56	3	3	3	4	2	2	3	6	5	7	7	6	9
44	5	5	5	3	1	1	5	7	7	6	6	5	7
43	7	7	8	5	2	1	8	10	10	2	4	3	12
35	5	5	6	8	5	5	2	7	6	7	7	6	10
66	6	6	6	5	3	3	4	6	6	6	5	4	7
73	3	3	3	8	5	5	7	7	4	8	7	6	8
39	4	3	3	9	6	6	7	3/4	1	8	7/8	6/7	8/9
45	3/4	3	3	7/8	4/5	4/5	5/6	0/1	1/2	4/5	5/6	4/5	7/8
16	3/6	3/6	3/6	4/8	3/6	3/7	1/2	8/10	6/7	7/9	7/9	6/8	7/11
26	8	8	9	7	6	5	6	11	9	7	5	5	7
40	9	8	9	5	2	1	10	10	10	5	4	4	11
42	8	8	8	6	5	5	6	10	9	7	9	8	8
51	4/10	4/10	4/10	5/11	4/8	4/8	6/11	7/11	7/10	6/10	6/10	6/10	0/4
52	8	8	9	5	4	3	7	8	8	2	1	1	9
53	6	6	7	5	3	3	9	7	7	4	3	3	6
54	7/9	7/9	8/10	5/7	4/6	3/5	7/8	10/12	8/10	4/6	3/4	3/4	9/10
58	6/7	6/7	7/8	2/3	2	1	6	8/9	9	4/5	5	5	9
59	5	5	5	9	7	6	8	8/9	5	6	4	4	8
61	7	7	8	10	7	6	8	9	7	3	2	1	12
70	5	4	4	9	7	7	6	3	2	6	8	7	9
72	8	8	8	10	7	6	8	10	10	5	5	4	8
81	6	6	6	10	8	7	6	8	6	3	4	3	11
82	9	8	8	12	9	9	9	8	7	11	11	10	2

جدول 3: نام و سکوانس تمام پروبهای سنسور.

Sensor's name	Sequence
S11	AGTACCAATATGACATTATGTGCNT
S12	AGTACNAATATGACATTATGTGCNT
S1232	AGTACNAATATGACNTTATGTGCNT
S21	AGCACTAATATGACTTTATGCACNG
S22	AGCACTAATATGACTTTATGNACNG
S222	AGCACTAATATGNCTTTATGNACNG
S31	AGTACAAATATGTCATTATGTGCTG
S32	AGTACNAATATGACNTTATGTGCTG
S3212	AGTACNAATATGACNTTATGTGCNG
S41	AGTACAAACTTNACTNTTTGTGCTT
S411	AGCACNAATTTATCTGTTTGNACTG
S42	AGTACTAATTTTACTATTTGTGCTG
S43	AGTACNAATTTTACTNNTTTGTGCTG
S432	AGTACNAATCTTACNTTGTGNACTT
S51	AGTACCAACTTTACCATTAGTACNT
S52	AGTACNAACTTAACNATTAGTACTG

جدول 4: مقایسه سکوانس پروبهای سنسور 29 تایپ HPV (اعداد نوشته شده نشاندهنده تعداد نوکلئوتیدهای غیر

مکمل می باشد).

HPV types	S11	S12	S1232	S21	S22	S222	S31	S32	S3212	S41	S411	S42	S43	S432	S51	S52
6	1	1	1	7	6	6	5	3	2	5	11	9	7	6	7	8
11	2	1	1	7	6	6	4	3	2	5	10	8	6	6	9	9
16	3/5	2/4	2/4	5/7	4/6	3/5	0/2	1/3	1/3	6/8	6/8	7/9	5/7	6/8	11/13	8/10
18	3	3	3	9	8	8	6	4	4	4	7	5	4	5	6	5
26	9	8	7	10	9	9	12	9	8	6	10	7	7	5	2	4
31	5	5	4	7	6	5	4	3	3	5/6	4/5	5/6	3/4	6/7	9/10	7/8
33	5	4	3	2	2	2	7	4	3	8	8	8	7	5	10	9
35	7	6	5	7	6	5	4	4	4	6	5	7	5	6	11	8
39	5	5	5	9	8	8	9	7	6	6	10	9	7	5	5	7
40	6	5	4	5	4	4	6	3	3	6	5	5	4	6	9	6
42	5	4	3	6	5	5	7	4	3	5	10	7	6	6	9	8
43	5	4	3	9	8	8	7	5	4	3	9	8	6	6	7	6
44	4	3	3	7	6	6	3	2	2	4	9	6	5	7	8	5
45	2	2	2	7	6	6	6	4	3	5	8	6	5	5	8	7
51	10	9	8	7	7	7	9	7	7	5	4	5	4	6	6	2
52	5	4	3	3	2	2	5	2	2	5	7	6	5	7	10	7
53	8/9	7/8	6/7	9/10	9	9	9	7/8	6/7	5/6	11	9/10	7/8	10	10/11	9/10
54	5/7	4/6	4/5	7/9	6/8	6/8	6/8	4/5	4/5	4/5	8/9	6/7	5/6	4/5	9	6
56	8	7	6	6	5	5	8	5	5	5	7	5	5	7	5	2
58	5	4	4	1	1	1	5	3	3	9	6	8	7	5	11	8
59	7	7	6	9	8	7	8	7	7	6	5	7	5	4	9	10
61	8	7	6	7	6	6	8	5	5	5	4	3	3	5	5	2
66	7/8	7/8	6/7	8/9	7/8	7/8	9/10	6/7	5/6	6/7	9/10	7/8	6/7	10/11	6/7	5/6
68	6/9	6/8	6/7	6/9	6/8	6/8	8/10	6/7	6	6/8	7/8	5/8	4/6	3	7/9	7/8
70	5	4	4	8	7	8	8	6	5	6	10	6	5	4	8	9
72	8	7	6	6	5	5	8	5	5	5	4	3	3	5	7	3
73	9	8	7	7	6	5	8	7	6	8	5	6	5	9	11	10
81	9	9	8	5	5	5	11	8	7	7	4	5	4	6	6	6
82	9/10	9	8	7/8	7/8	7	10	7	7	7	5	5/6	5	6	4/5	2

جدول 5 : مقایسه سکوانس پروبهای انکور انتخاب شده با 29 تایپ HPV.

جدول 6 : مقایسه سکوانس پروبهای سنسور انتخاب شده با 29 تایپ HPV . تایپهای 51، 53، 66 و 82 قابل

شناسائی نمی باشند.

جدول 5

HPV Types	A52	A22	A12	A31
6	6	3	3	3
11	6	3	5	4
16	7/9	3/6	3/6	1/2
18	6/9	2/6	0/2	4/7
26	5	6	8	6
31	5	0	4	6
33	6	1	5	6
35	7	5	5	2
39	7/8	6	3	7
40	4	2	8	10
42	9	5	8	6
43	4	2	7	8
44	6	1	5	5
45	5/6	4/5	3	5/6
51	6/10	4/8	4/10	6/11
52	1	4	8	7
53	3	3	6	9
54	3/4	4/6	7/9	7/8
56	7	2	3	3
58	5	2	6/7	6
59	4	7	5	8
61	2	7	7	8
66	5	3	6	4
68	5/6	4/6	3/4	6/8
70	8	7	4	6
72	5	7	8	8
73	7	5	3	7
81	4	8	6	6
82	11	9	8	9

جدول 6

HPV Types	S3212	S222	S432
6	2	6	6
11	2	6	6
16	1/3	3/5	6/8
18	4	8	5
26	8	9	5
31	3	5	6/7
33	3	2	5
35	4	5	6
39	6	8	5
40	3	4	6
42	3	5	6
43	4	8	6
44	2	6	7
45	3	6	5
51	7	7	6
52	2	2	7
53	6/7	9	10
54	4/5	6/8	4/5
56	5	5	7
58	3	1	5
59	7	7	4
61	5	6	5
66	5/6	7/8	10/11
68	6	6/8	3
70	5	8	4
72	5	5	5
73	6	5	9
81	7	5	6
82	7	7	6

جدول 7: دمای تخمینی تفکیک پروبهای سنسور وانکور.

Chosen probes	Estimated Melting Temperature
A12:	Tm (salt) : 70.0 °C Tm (salt) : 73.4 °C
A22:	Tm (salt) : 68.0 °C Tm (salt) : 70.5 °C
A31:	Tm (salt) : 72.3 °C Tm (salt) : 74.5 °C
A52:	Tm (salt) : 69.0 °C Tm (salt) : 71.4 °C
S222:	Tm (salt) : 59.2 °C Tm (salt) : 64.1 °C
S432:	Tm (salt) : 57.6 °C Tm (salt) : 62.5 °C
S3212:	Tm (salt) : 59.2 °C Tm (salt) : 64.1 °C

جدول 8: دمای تخمینی تفکیک پرایمرها.

Primers	Estimated melting temperature
NMY11	Tm: 56.4°C -62.5°C
NGP6+	Tm:53.7°C -58.4°C

روش تعیین تایپ به کمک پروبها :

شناسائی یک تایپ تنها با استفاده از یک جفت پروب میسر نبود، بلکه باید اطلاعات مربوط به همه پروبها در کنار هم قرار می گرفت تا تایپ موردنظر شناسائی شود. در واقع روش کار بدین صورت خواهد بود که تعداد نوکلئوتید های نامنطبق با هر پروب برای هر تایپ عدد 4 رقمی منحصر به فردی (حاصل از 3 پروب سنسور و 1 پروب انکور) را می سازد که توسط بررسی منحنی تفکیک قابل دستیابی است (جدول 9).

بررسی همپوشانی احتمالی پروبها با سایر تایپهای HPV :

در انتها کاری که می بایست انجام می گرفت مقایسه سکوانس پروبهای انتخاب شده با سکوانس تمام تایپهای HPV بود زیرا می بایستی همپوشانی احتمالی تایپها بررسی می شدند (جدول 10).

پس از بررسی جدول 10 مشخص گردید که 16 تایپ دیگر HPV (3، 7، 10، 13، 28، 32، 62، 67، 69، 74، 83، 87، 89، 90، 102، 106) نیز با پرایمرها و پروبهای طراحی شده قابل شناسائی می باشند (جدول 11).

جدول 9: اعداد نشان داده شده که تعداد نوکلئوتیدهای غیر مکمل هر تایپ را با سکوانس پروب مورد نظر نشان می دهد، 4 رقم منحصر به فرد هر تایپ را پدید می آورد ($=0$ =تعداد نوکلئوتیدهای غیر مکمل بیش از 5 می باشد).
تایپهای 51، 53، 66 و 82 قابل شناسائی نمی باشند.

HPV Types	Anchor	S3212	S222	S432
6	A12: 3	2	0	0
39	A12: 3	0	0	5
18	A12: 0/2	4	0	5
70	A12: 4	5	0	4
45	A12: 3	3	0	5
68	A12: 3/4	0	0	3
73	A12: 3	0	5	0
56	A22: 2	5	5	0
31	A22: 0	3	5	0
33	A22: 1	3	2	5
58	A22: 2	3	1	5
11	A22: 3	2	0	0
40	A22: 2	3	4	0
42	A22: 5	3	5	0
43	A22: 2	4	0	0
44	A22: 1	2	0	0
66	A22: 3	5/6	0	0
59	A52: 4	0	0	4
52	A52: 1	2	2	0
53	A52: 3	0	0	0
54	A52: 3/4	4/5	0	4/5
61	A52: 2	5	0	5
26	A52: 5	0	0	5
72	A52: 5	5	5	5
81	A52: 4	0	5	0
16	A31: 1/2	1/3	3/5	0
35	A31: 2	4	5	0
51	0	0	0	0
82	0	0	0	0

جدول 10: مقایسه سکوانس پروبها و پرایمرهای طراحی شده با تمام تایپهای موجود HPV. اعداد نوشته شده در ستونها نشان دهنده تعداد نوکلئوتیدهای غیر مکمل تایپهای مشخص شده با هریک از پرایمرها، سنسورها و انکورها می باشد. اعداد نوشته شده در پرانتزها نشان دهنده تعداد ایزوله هایی از تایپ مورد نظر است که دارای تعداد نوکلئوتیدهای غیر مکمل مربوطه است. هر کجا عددی نوشته نشده است نشان دهنده بیش از 7 نوکلئوتید غیر مکمل می باشد. در مورد تایپهای 46، 78، 79 و 88 که سکوانس ژنوم آنها در بانکهای اطلاعاتی مورد نظر موجود نبوده است، اطلاعاتی داده نشده است.

HPV types	NGP6+	MY11	S3212	S222	S432	A31	A52	A12	A22
1	5(8X)	4(8X)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	6
2	3(5X)	2(5X)	-----	6	7	-----	-----	-----	-----
3	2(3X)	1(3X)	3(4X)	6	4	5	4	6	6
4	5(6X)	3(6X)	-----	-----	-----	7	6	5	4
5	6(3X) 7(4X)	1(7X)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
6	1(9X)	0(11X)	2(10X) 3(1X)	5(1X) 6(12X)	5(1X) 6(12X)	3	5	3	3
7	1(4X)	0(2X)	3(4X)	5	6	-----	4	-----	2
8	8(3X)	0(3X)	-----	-----	-----	7	-----	5	7
9	8(4X)	2(4X)	-----	-----	-----	-----	-----	7	6
10	1(4X)	1(4X)	5	-----	7	4	-----	3	6
11	0(1X) 1(5X)	0(5X)	2(7X)	6(7X) 6/7(1X)	6	4	6	5	3
12	6(4X)	0(4X)	-----	-----	-----	-----	7	-----	-----
13	0(3X)	1(3X)	3(3X)	5	7	3	5	6	4
14	7(4X)	2(4X)	-----	-----	-----	-----	6	6	4
15	6(4X)	1(4X)	-----	-----	-----	7	-----	-----	5
16	0(34X) 1(1X) 0/1(1X)	1(25X)	1(42X) 4(1X) 1/3(1X) 2/5(1X)	4(42X) 3/5(1X) 4/6(1X)	5(1X) 6(42X) 7/10(1X) 6/8(1X)	1	-----	6	5
17	7(3X)	2(3X)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	6
18	0(18X) 0/1(1X)	0(14X)	4(18) 4/6(3X)	7/8(2X)	5(18X) 5/6(2X)	6	6	0	2

					5/7(1X)				
19	6(3X)	1(3X)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	6
20	7(5X)	1(4X)	----	-----	-----	7	-----	6	5
21	6(4X)	1(4X)	-----	-----	-----	-----	7	5	5
22	6(4X)	0(4X)	-----	-----	-----	7	-----	-----	-----
23	9(3X)	1(3X)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
24	8(1X) 9(5X)	1(6X)	-----	-----	-----	-----	-----	7	7
25	6(3X)	1((3X)	-----	-----	-----	-----	-----	6	5
26	2(4X)	0(5X)	-----	-----	5	6	5	-----	6
27	3(6X)	0(6X)	5	7	7	-----	-----	-----	7
28	4(4X)	1(4X)	4	-----	5	4	5	7	7
29	1(4X)	1(4X)	4	5	6	-----	7	-----	6
30	3(3X)	1(3X)	6	7	-----	6	6	-----	4
31	0(1X) 1(6X) 2(1X) 0/1(1X)	0(1X) 1(4X)	1(2X) 3(8X) 1/3(1X) 2/5(2X)	5(7X) 3/5(1X) 4/6(2X)	6(8X) 7/10(2X) 6/8(1X)	6	5	4	0
32	2(4X)	2(4X)	4	4(2X) 6(5X)	5	4	6	7	7
33	1(1X) 2(7X)	1(8X)	1(1X) 3(8X)	2(8X) 4(1X)	5(8X) 6(1X)	6	6	5	1
34	5(4X)	1(4X)	-----	-----	-----	6	7	4	7
35	0(4X)	1(4X)	4	5	6	2	7	5	5
36	7(5X)	1(4X)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	7
37	8(4X)	2(4X)	-----	-----	-----	6	-----	-----	-----
38	7(5X)	2(5X)	-----	-----	-----	4(1X) 5(4X)	-----	-----	-----
39	2(9X)	0(7X) 1(2X)	6	-----	5	7	7	3	6
40	1(3X)	0(3X)	3(3X)	4	6	-----	4	-----	2
41	8(6X)	1(6X)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
42	2(2X)	2(2X)	3(2X)	5	6	6	-----	-----	5
43	2(3X)	0(3X)	3(1X) 4(3X)	7	6	-----	4	7	2
44	3(4X)	1(4X)	2	6	7	5	6	5	1
45	0(14X)	0(14X)	3(15X)	6	5	6	6	3	5
46	??????	?????	???????	???????	?????	?????	?????	?????	????
47	8(4X)	0(4X)	-----	-----	-----	-----	6	7	-----
48	5(6X)	3(6X)	-----	-----	-----	-----	7	-----	-----
49	7(4X)	1(4X)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
50	3(6X)	3(6X)	-----	-----	-----	-----	7	-----	6
51	0(3X) 2(7X)	1(7X)	-----	7	6	-----	-----	-----	-----

52	0(8X) 1(1X)	1(9X)	2(9X)	2	7	7	1	-----	4
53	3(9X)	1(4X)	6(4X) 7(some)	-----	-----	-----	3	6	3
54	1(5X)	1(5X)	4(1X) 5(4X)	6	4(4X) 5(1X)	-----	3(1X) 4(4X)	-----	5
55	3(4X)	1(4X)	2(3X)	6	7	5	6	5	1
56	2(9X)	1(2X)	5	5	7	3	7	3	2
57	1(4X) 3(3X)	0(7X)	6	6	7	-----	-----	-----	-----
58	2(9X)	1(9X)	3(9X)	1	5	6	5	6(8X) 7(1X)	2
59	1(7X)	3(7X)	-----	7	4	-----	4	5	7
60	8(6X)	4(6X)	-----	-----	-----	6	-----	-----	7
61	1(5X)	1(5X)	5	6	5	-----	2	7	7
62	1(2X)	0(2X)	5	5	5	5	5	5	7
63	5(6X)	3(6X)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	6
64	6(1X)	0(1X)	-----	-----	-----	7	-----	5	-----
65	4(4X)	3(4X)	-----	-----	-----	-----	-----	7	-----
66	4(10X)	0(4X)	5(3X) 6(7X)	----	-----	4	6	6	3
67	1(3X)	1(3X)	2(3X)	4	6	4	-----	4	4
68	1(7X) 2(1X)	0(1X) 1(6X) 0/1	6(4X) 7(some)	6(1X) 7(7X)	3	7	5(4X) 6(4X)	3(4X) 4(4X)	4(4X) 6(4X)
69	2(3X)	0(3X)	5	-----	6	4	7	7	6
70	1(5X)	1(5X)	4	-----	4	6	-----	4	7
71	1(7X)	3(7X)	4	7	7	-----	6	-----	-----
72	1(3X)	1(3X)	5	5	5	-----	5	-----	7
73	2(2X)	1(3X)	6	5	-----	7	7	3	5
74	0(3X)	2(3X)	4	6(2X) 7(1X)	6(2X) 7(1X)	5	3	5	3(2X) 4(1X)
75	5(3X)	0(3X)	-----	-----	-----	6	-----	5	6
76	6(3X)	0(2X)	-----	-----	-----	5	7	5	5
77	1(3X)	1(3X)	6	6	-----	7	-----	6	6
78	?????	?????	???????	???????	?????	?????	?????	?????	?????
79	???????	?????	?????	???????	???????	?????	?????	?????	?????
80	7(3X)	2(3X)	-----	-----	-----	5	-----	-----	-----
81	1(2X)	0(2X)	-----	5	6	6	4	6	-----
82	1(3X) 2(2X)	1(5X)	-----	7	6	-----	-----	6	-----
83	4(2X)	0(2X)	5	7	6	-----	4	6	4
84	2(3X)	0(3X)	6	7	7	7	5	4	5
85	6(1X)	1(4X)	4	6	3	-----	-----	4	7

	1(3X)								
86	0(2X)	2(2X)	4(1X) 5(1X)	7	7	6	----	----	6
87	0(3X)	1(3X)	5	-----	6	6	5	7	6
88			??????	??????	??????	?????	?????	?????	????
89	4(1X)	0(1X)	-----	-----	5	7	3	5	4
90	1(2X)	1(2X)	4	5	-----	4	-----	6	5
91	1(1X)	1(1X)	6	7	6	6	6	-----	6
92	8(2X)	2(2X)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
93	7(1X)	1(1X)	-----	-----	-----	-----	7	-----	-----
94	2(3X)	1(3X)	-----	-----	-----	5	6	7	7
95	4(1X)	3(1X)	-----	-----	-----	7	-----	7	-----
96	6(4X)	1(4X)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
RTR X7	6(4X)	0(2X)	-----	-----	-----	-----	6	-----	7
102	1(1X)	1(1X)	5	6	-----	-----	5	-----	6
106	0(1X)	2(1X)	4	5	-----	7	6	6	2

HPV types	Anchor	S3212	S222	S432
3	A52:4	3	0	4
7	A22:2	3	5	0
10	A12:3	5	0	0
13	A31:3	3	5	0
28	A31:4	4	0	5
32	A31:4	4	4 0	5
62	A31:5	5	5	5
67	A22:4	2	4	0
69	A31:4	5	0	0
74	A52:3	4	0	0
83	A52:4	5	0	0
87	A52:5	5	0	0
89	A52:3	0	0	5
90	A31:4 A22:5	4	5	0
102	A52:5	5	0	0
106	A22:2	4	5	0

جدول 11 : 16 تایپ دیگر HPV که با پرایمرها و

پروبیهای طراحی شده قابل شناسائی می باشند. اعداد

نشان داده شده که تعداد نوکلئوتیدهای غیر مکمل هر

تایپ را با سکوانس پروب مورد نظر نشان می دهد، 4

رقم منحصر به فرد هر تایپ را پدید می آورد (=0

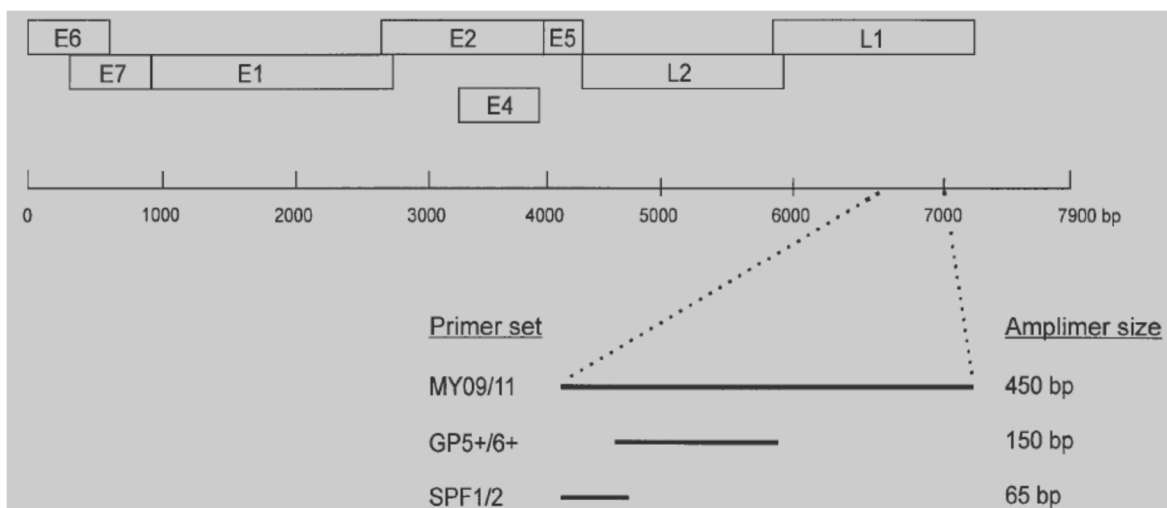
تعداد نوکلئوتیدهای غیر مکمل بیش از 5 می باشد).

بحث و نتیجه کلی

این سوال قابل طرح است که چرا فکر اولیه استفاده از پرایمرهای GP بوده است و مزیت این پرایمرها نسبت به پرایمرهای دیگر چیست؟ پرایمرهای GP پرایمرهایی هستند که ناحیه ای 150 نوکلئوتیدی از قسمت L1 را شامل می شوند. در مقایسه با سایر نواحی ژنوم HPV، سکوانس اسید آمینه بیشتر نواحی L1 در میان تایپهای مختلف به خوبی محافظت شده اند و تغییرات کمتری داشته اند. پرایمرهای GP6+ و GP5+ نیز در 2 ناحیه ای قرار دارند که در میان تایپهای مختلف شباهت زیادی دارند. بنابراین استفاده از این پرایمر نتیجه بخش تر خواهد بود و با توجه به کوچک بودن amplicon بدست آمده استفاده از آن در روش Real-time PCR مناسب به نظر می رسد. علاوه بر این پرایمرها، پرایمرهای MY09/11 و SPF1/2 نیز مورد استفاده قرار می گیرند. پرایمرهای MY09/11 ناحیه ای 450 نوکلئوتیدی و پرایمرهای SPF1/2 ناحیه ای 65 نوکلئوتیدی از L1 را در بر می گیرند (شکل 17).

پس از بررسی ناحیه GP در این پروژه، پیشنهاد می شود که امکان استفاده از پروب Taqman برای تعیین تایپ این ویروس با استفاده از پرایمرهای GP مورد بررسی قرار بگیرد. 2 ناحیه A و B که در ناحیه GP مشخص شده بودند، نواحی مناسبی برای طراحی پروب Taqman به نظر می رسند.

در این پروژه پس از بررسی امکان تشخیص و تعیین تایپ ویروس HPV بطور همزمان با روش Real-Time PCR، 3 پروب سنسورو 4 پروبانکور طراحی شدند که امکان تشخیص و تعیین تایپ 25 تایپ شایع HPV شامل تایپهای 16, 18, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 46, 52, 56, 58, 59, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 را فراهم می آورند. روش شناسایی بدین طریق است که تعداد نوکلئوتیدهای نامنتبق با هر پروب برای هر تایپ عددی 4 رقمی منحصر به فردی را می سازد که توسط بررسی منحنی ذوب قابل دستیابی خواهد بود.



شکل 17: شماتیک از نواحی پرایمرهای MY09/11 و GP5+/6+ و SPF1/2.

مرجع:

Kleter B., Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus, *Mic.*, vol.37, No.8, 1999, p.2508-2517

1. 2006. HPV and HPV vaccine. CDC, Department of health and human services.
2. 2006, posting date. Pap smear: Screening test for cervical cancer. [Online.]
3. **Abd-Elsalam, K. A.** 2003. Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. *African Journal of Biotechnology* **2**:91-95.
4. **Ault, K. A.** 2006. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections in the female genital tract. *Infect Dis Obstet Gynecol* **14**:404-70.
5. **Baker, Z.-M. Z. a. C. C.** 2006. papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Bioscience* **11**:2286-2302.
6. **Baseman, J. G., and L. A. Koutsky.** 2005. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol* **32 Suppl 1**:S16-24.
7. **bernard, H.-U.** 2005. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *clinical virology* **325**:51-56.
8. **Bernhard Kleter, L.-J. v. D., L. S. Jan ter Schegget, M. B. Kees van Krimpen, and a. W. Q. Bram ter Harmsel.** 1998. Novel Short-Fragment PCR Assay for Highly Sensitive Broad-Spectrum Detection of Anogenital Human Papillomaviruses. *American Journal of Pathology*, **Vol. 153**:1731-1739.
9. **Burd, E. M.** 2003. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev* **16**:1-17.
10. **Catherine Brooksbank*, G. C. a. J. T.** 2005. The European Bioinformatics Institute's resources: towards systems biology. *Nucleic Acids Research*, **33**.
11. **Dennis van Hamont, 2 Maaïke A. P. C. van Ham, 2 Judith M. J. E. Bakkers, 1, and a. W. J. G. M. Leon F. A. G. Massuger.** 2006. Evaluation of the SPF10-INNO LiPA Human Papillomavirus (HPV) Genotyping Test and the Roche Linear Array HPV Genotyping Test. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, **44**:3122-3129.
12. **Donna Maglott, J. O., Kim D. Pruitt and Tatiana Tatusova.** 2005. Entrez Gene: gene-centered information at NCBI. *Nucleic Acids Research* **33**.
13. **Edyta C. Pirog, M.** 2001. Is cervical adenocarcinoma caused by HPV infection? *Contemporary OB/GYN® Archive* **7**:69-80.
14. **HOWLEY, P. M.** 2006. warts, cancer and ubiquitylation : lessons from the papillomaviruses. *transactions of the american clinical and climatological association* **117**:113-127.
15. **Ian M. Mackay, K. E. A. a. A. N.** 2002. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acid Research* **30**:1292-1305.
16. **Jacqueline Sherris, C. H., Christopher Elias.,** 2001. Beyond Our Borders Cervical cancer in the developing world. *West J Med* **175**:231-233.

17. **Leen-Jan van Doorn, W. Q., Bernhard Kleter, Anco Molijn, Brigitte Colau, Marie-Thérèse Martin, Kravang-In, Norah Torrez-Martinez, Cheri L. Peyton, Cosette M. Wheeler.** 2002. Genotyping of Human Papillomavirus in Liquid Cytology Cervical Specimens by the PGMY Line Blot Assay and the SPF10 Line Probe Assay. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, **Vol. 40**: 979–983.
18. **M. V. JACOBS, A. M. D. R. H., A. J. C. VAN DEN BRULE, P. J. F. SNIJDERS,, and A. J. M. M. W. C. J. L. M. MEIJER.** 1995. Group-Specific Differentiation between High- and Low-Risk Human Papillomavirus Genotypes by General Primer-Mediated PCR and Two Cocktails of Oligonucleotide Probes. *Journal of Clinical Microbiology* **Vol. 33**:901–905.
19. **Maaïke A. P. C. van Ham, J. M. J. E. B., Gonneke K. Harbers,, and L. F. A. G. M. Wim G. V. Quint, and Willem J. G. Melchers.** June 2005. Comparison of Two Commercial Assays for Detection of Human Papillomavirus (HPV) in Cervical Scrape Specimens: Validation of the Roche AMPLICOR HPV Test as a Means To Screen for HPV Genotypes Associated with a Higher Risk of Cervical Disorders. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* **Vol. 43**:p. 2662–2667.
20. **MARCEL V. JACOBS, P. J. F. S., ADRIAAN J. C. VAN DEN BRULE,, and C. J. L. M. M. THEO J. M. HELMERHORST, JAN M. M. WALBOOMERS.** 1997. A General Primer GP5+/GP6+-Mediated PCR-Enzyme Immunoassay Method for Rapid Detection of 14 High-Risk and 6 Low-Risk Human Papillomavirus Genotypes in Cervical Scrapings. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, **Vol. 35**:791–795.
21. **Moberg, M., I. Gustavsson, and U. Gyllensten.** 2003. Real-time PCR-based system for simultaneous quantification of human papillomavirus types associated with high risk of cervical cancer. *J Clin Microbiol* **41**:3221-8.
22. **P. E. GRAVITT, C. L. P., T. Q. ALESSI, C. M. WHEELER, F. COUTLE, A. HILDESHEIM,, and D. R. S. M. H. SCHIFFMAN, AND R. J. APPLE.** 2000. Improved Amplification of Genital Human Papillomaviruses. *Journal of Clinical Microbiology* **Vol. 38**:357–361.
23. **Pyeon, D., P. F. Lambert, and P. Ahlquist.** 2005. Production of infectious human papillomavirus independently of viral replication and epithelial cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:9311-6.
24. **Repa, M. A. V. a. J. J.** 2005. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ* **29**:151–159.
25. **Roger A. Hubbard, P.** 2003. Human Papillomavirus Testing Methods. *Arch Pathol Lab Med* **127**:940-945.
26. **Schellekens, M. C., A. Dijkman, M. F. Aziz, B. Siregar, S. Cornain, S. Kolkman-Uljee, L. A. Peters, and G. J. Fleuren.** 2004. Prevalence of single and multiple HPV types in cervical carcinomas in Jakarta, Indonesia. *Gynecol Oncol* **93**:49-53.

27. **Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins.** 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**:4876-82.
28. **Urmila Kulkarni-Kale, S. B., G. Sunitha Manjari and A. S. Kolaskar.** 2004. VirGen: a comprehensive viral genome resource. *Nucleic Acids Research*, **32**.
29. **William M. Rich, M. D.,** posting date. All about pap test. [Online.]

پیوستها:

پیوست 1: سکوانس HPV 16 از Genbank.

LOCUS PPH16 7904 bp DNA circular VRL 18-MAR-1994
DEFINITION Human papillomavirus type 16 (HPV16), complete genome.
ACCESSION K02718
VERSION K02718.1 GI:333031
KEYWORDS circular; complete genome.
SOURCE Human papillomavirus type 16
ORGANISM [Human papillomavirus type 16](#)
Viruses; dsDNA viruses, no RNA stage; Papillomaviridae;
Alphapapillomavirus.

```
1 actacaataa ttcattgtata aaactaaggc cgtaaccgaa atcggttgaa ccgaaaccgg
61 ttagtataaaa agcagacatt ttatgcacca aaagagaact gcaatgtttc aggaccaca
121 ggagcgaccc agaaagttac cacagttatg cacagagctg caaacaacta tacatgatat
181 aatattagaa tgtgtgtact gcaagcaaca gttactgcga cgtgaggtat atgactttgc
241 ttttcgggat ttatgcatag tatatagaga tgggaatcca tatgctgtat gtgataaatg
301 tttaaagttt tattctaaaa ttagtgagta tagacattat tgttatagtt tgtatggaac
361 aacattagaa cagcaataca acaaaccggt gtgtgatttg ttaattaggt gtattaactg
421 tcaaaagcca ctgtgtcctg aagaaaagca aagacatctg gacaaaaagc aaagattcca
481 taatataagg ggtcgggtgga cgggtcgatg tatgtcttgt tgcagatcat caagaacagc
541 tagagaaacc cagctgtaat catgcatgga gatacaccta cattgcatga atatatgtta
601 gatttgcaac cagagacaac tgatctctac tgttatgagc aattaaatga cagctcagag
661 gaggaggatg aaatagatgg tccagctgga caagcagaac cggacagagc ccattacaat
721 attgtaacct tttgttgcaa gtgtgactct acgcttcggt tgtgctgaca aagcacacac
781 gtagacattc gtactttgga agacctgtta atgggcacac taggaattgt gtgccccatc
841 tgttctcaga aaccataatc taccatggct gatcctgcag gtaccaatgg ggaagagggc
901 acgggatgta atggatgggt ttatgtagag gctgtagtgg aaaaaaaaaa aggggatgct
```

961 atatcagatg acgagaacga aaatgacagt gatacaggtg aagatttggt agattttata
 1021 gtaaatagata atgattatatt aacacaggca gaaacagaga cagcacatgc gttgtttact
 1081 gcacaggaag caaaacaaca tagagatgca gtacagggtc taaaacgaaa gtatttggtta
 1141 gtccacttag tgatattagt ggatgtgtag acaataatat tagtcctaga ttaaaagcta
 1201 tatgtataga aaaacaaagt agagctgcaa aaaggagatt atttgaaagc gaagacagcg
 1261 ggtatggcaa tactgaagtg gaaactcagc agatgttaca ggtagaaggg cgccatgaga
 1321 ctgaaacacc atgtagtcag tatagtgggtg gaagtggggg tggttgcagt cagtacagta
 1381 gtggaagtgg gggagagggg gttagtgaag gacacactat atgccaaaca ccacttacaa
 1441 atatttttaa tgtactaaaa actagtaatg caaaggcagc aatgttagca aaattttaaag
 1501 agttatacgg ggtgagtttt tcagaattag taagaccatt taaaagtaat aaatcaacgt
 1561 gttgcgattg gtgtattgct gcatttggac ttacaccag tatagctgac agtataaaaa
 1621 cactattaca acaatattgt ttatatattac acattcaaag tttagcatgt tcatggggaa
 1681 tggttgtggt actattagta agatataaat gtggaaaaaa tagagaaaca attgaaaaat
 1741 tgctgtctaa actattatgt gtgtctccaa tgtgtatgat gatagagcct caaaattgca
 1801 gtagtacagc agcagcatta tattgggtata aaacagggtat atcaaatatt agtgaagtgt
 1861 atggagacac gccagaatgg atacaaagac aaacagtatt acaacatagt tttaatgatt
 1921 gtacatttga attatcacag atggtacaat gggcctacga taatgacata gtagacgata
 1981 gtgaaattgc atataaatat gcacaattgg cagacactaa tagtaatgca agtgcctttc
 2041 taaaaagtaa ttcacaggca aaaattgtaa aggattgtgc aacaatgtgt agacattata
 2101 aacgagcaga aaaaaaaca atgagtatga gtcaatggat aaaatataga tgtgataggg
 2161 tagatgatgg aggtgattgg aagcaaattg ttatgttttt aaggtatcaa ggtgtagagt
 2221 ttatgtcatt ttttaactgca ttaaaaagat ttttgcaagg catacctaaa aaaaattgca
 2281 tattactata tgggtgcagct aacacaggta aatcattatt tggtagagt ttaatgaaat
 2341 ttctgcaagg gtctgtaata tgttttgtaa attctaaaag ccatttttgg ttacaacat
 2401 tagcagatgc caaaataggt atggttagatg atgctacagt gccctgttgg aactacatag
 2461 atgacaattt aagaaatgca ttggatggaa atttagtttc tatggatgta aagcatagac
 2521 cattggtaca actaaaatgc cctccattat taattacatc taacattaat gctggtacag
 2581 attctaggtg gccttattta cataatagat tgggtggtgtt tacatttcct aatgagtttc

2641 catttgacga aaacggaaat ccagtgtatg agcttaatga taagaactgg aaatcctttt
 2701 tctcaaggac gtggtccaga ttaagtttgc acgaggacga ggacaaggaa aacgatggag
 2761 actctttgcc aacgttttaa tgtgtgtcag gacaaaatac taacacatta tgaaaatgat
 2821 agtacagacc tacgtgacca tatagactat tggaaacaca tgcgcctaga atgtgctatt
 2881 tattacaagg ccagagaaat gggattttaa catattaacc accaagtggg gccaacactg
 2941 gctgtatcaa agaataaagc attacaagca attgaactgc aactaacgtt agaaacaata
 3001 tataactcac aatatagtaa tgaaaagtgg acattacaag acgttagcct tgaagtgtat
 3061 ttaactgcac caacaggatg tataaaaaaa catggatata cagtggaagt gcagtttgat
 3121 ggagacatat gcaatacaat gcattatata aactggacac atatatatat ttgtgaagaa
 3181 gcatcagtaa ctgtggtaga ggggtcaagtt gactattatg gtttatatta tgttcatgaa
 3241 ggaatacgaa catattttgt gcagttttaa gatgatgcag aaaaatatag taaaaataaa
 3301 gtatgggaag ttcatgcggg tggtcaggta atattatgtc ctacatctgt gtttagcagc
 3361 aacgaagtat cctctcctga aattattagg cagcacttgg ccaaccaccc cgccgcgacc
 3421 cataccaaag ccgtcgcctt gggcaccgaa gaaacacaga cgactatcca gcgaccaaga
 3481 tcagagccag acaccgaaa cccctgccac accactaagt tgttgcacag agactcagtg
 3541 gacagtgtc caatcctcac tgcatttaac agctcacaca aaggacggat taactgtaat
 3601 agtaacacta caccatagt acatttaaaa ggtgatgcta atactttaa atgtttaaga
 3661 tatagattta aaaagcattg tacattgtat actgcagtgt cgtctacatg gcattggaca
 3721 ggacataatg taaaacataa aagtgcaatt gttacactta catatgatag tgaatggcaa
 3781 cgtgaccaat ttttgtctca agttaaata caaaaacta ttacagtgtc tactggattt
 3841 atgtctatat gacaaatctt gatactgcat ccacaacatt actggcgtgc tttttgcttt
 3901 gctttgtgtg cttttgtgtg tctgcctatt aatacgtccg ctgcttttgt ctgtgtctac
 3961 atacacatca ttaataatat tgggtattact attgtggata acagcagcct ctgcgtttag
 4021 gtgttttatt gtatatatta ttttgttta tataaccatta tttttaatac atacacatgc
 4081 acgcttttta attacataat gtatatgtac ataagttaat tgttacatat aattgttgta
 4141 taccataact tactatTTTT tcttttttat tttcatatat aatTTTTTT tttgtttgtt
 4201 tgtttgtttt ttaataaact gttattactt aacaatgcga cacaacgtt ctgcaaacg
 4261 cacaacacgt gcatcggcta cccaacttta taaaacatgc aaacaggcag gtacatgtcc

4321 acctgacatt atacctaagg ttgaaggcaa aactattgct gaacaaatat tacaatatgg
 4381 aagtatgggt gtatTTTTTg gtgggttagg aattggaaca gggtcgggta caggcggacg
 4441 cactgggtat attccattgg gaacaaggcc tcccacagct acagatacac ttgctcctgt
 4501 aagaccccct ttaacagtag atcctgtggg ccttctgat ccttctatag tttctttagt
 4561 ggaagaaact agttttattg atgctgggtgc accaacaatct gtaccttcca tttccccaga
 4621 tgtatcagga tttagtatta ctacttcaac tgataccaca cctgctatat tagatattaa
 4681 taatactgtt actactgtta ctacacataa taatcccact ttcactgacc catctgtatt
 4741 gcagcctcca acacctgcag aaactggagg gcattttaca ctttcatcat ccactattag
 4801 tacacataat tatgaagaaa ttcctatgga tacatttatt gttagcaca accctaacac
 4861 agtaactagt agcacacca taccagggtc tcgcccagtg gcacgcctag gattatatag
 4921 tcgcacaaca caacaggtta aagttgtaga cctgctttt gtaaccactc ccactaaact
 4981 tattacatat gataatcctg catatgaagg tatagatgtg gataatacat tatatTTTTc
 5041 tagtaatgat aatagtatta atatagctcc agatcctgac tttttggata tagttgcttt
 5101 acataggcca gcattaacct ctaggcgtac tggcattagg tacagtagaa ttggtaataa
 5161 acaaacacta cgtactcgta gtggaaaatc tataggtgct aaggtacatt attattatga
 5221 ttttaagtact attgatcctg cagaagaaat agaattacaa actataacac cttctacata
 5281 tactaccact tcacatgcag cctcacctac ttctattaat aatggattat atgatattta
 5341 tgcagatgac tttattacag atacttctac aaccccggtc ccatctgtac cctctacatc
 5401 tttatcaggt tatattcctg caaatacaac aattcctttt ggtgggtgcat acaatattcc
 5461 tttagtatca ggtcctgata taccattaa tataactgac caagctcctt cattaattcc
 5521 tatagttcca ggtctccac aatatacaat tattgctgat gcaggtgact tttatttaca
 5581 tcctagtatt tacatgttac gaaaacgacg taaacgttta ccatatTTTT tttcagatgt
 5641 ctctttgggt gcctagttag gccactgtct acttgccctc tgtcccagta tctaagggtg
 5701 taagcacgga tgaatatgtt gcacgcacaa acatatatta tcatgcagga acatccagac
 5761 tacttgagtg tggacatccc tattttccta ttaaaaaacc taacaataac aaaatattag
 5821 ttcctaaagt atcaggatta caatacaggg tattttagaat acatttacct gacccaata
 5881 agtttggttt tcctgacacc tcattttata atccagatac acagcggtg gtttgggcct
 5941 gtgtaggtgt tgaggtaggt cgtgggtcagc cattaggtgt gggcattagt ggccatcctt

6001 tattaataaa attggatgac acagaaaatg ctagtgctta tgcagcaa at gcaggtgtgg
 6061 ataatagaga atgtatatct atggattaca aacaaacaca atttgtgttta attggttgca
 6121 aaccacctat aggggaacac tggggcaaag gatcccatg taccaatgtt gcagtaa atc
 6181 caggtgattg tccaccatta gagttaataa acacagttat tcaggatggg gatatggttc
 6241 atactggctt tggtgctatg gactttacta cattacaggc taacaaaagt gaagttccac
 6301 tggatatattg tacatctatt tgcaaatatc cagattatat taaaatgggtg tcagaacat
 6361 atggcgacag cttatTTTTT tatttacgaa gggaacaa at gtttgttaga cttttattta
 6421 atagggctgg tactgttggg gaaaatgtac cagacgattt atacattaaa ggctctgggt
 6481 ctactgcaa tttagccagt tcaaattatt ttctacacc tagtggttct atggttacct
 6541 ctgatgccca aatattcaat aaaccttatt gggtacaacg agcacagggc cacaataatg
 6601 gcatttggtg gggtaaccaa ctatttggtt ctgttggtga tactacagc agtacaata
 6661 tgtcattatg tgctgccata tctacttcag aaactacata taaaaatact aactttaagg
 6721 agtacctacg acatggggag gaatatgatt tacagtttat ttttcaactg tgcaaaaata
 6781 ccttaactgc agacgttatg acatacatc attctatgaa ttccactatt ttggaggact
 6841 ggaatTTTTg tctacaacct ccccgaggag gcacactaga agatacttat aggtttgtaa
 6901 cccaggcaat tgcttgctca aaacatacac ctccagcacc taaagaagat gatcccccta
 6961 aaaaatacac tttttgggaa gttaaatttaa aggaaaagtt ttctgcagac ctagatcagt
 7021 ttcttttagg acgcaaattt ttactacaag caggattgaa ggccaaacca aaatttacat
 7081 taggaaaacg aaaagctaca cccaccacct catctacctc tacaactgct aaacgcaaaa
 7141 aacgtaagct gtaagtattg tatgtatgtt gaattagtgt tgtttgttgt gtatatgttt
 7201 gtatgtgctt gtatgtgctt gttaaattta agttgtatgt gtgtttgtat gtatgggtata
 7261 ataaacacgt gtgtatgtgt ttttaa atgc ttgtgtaact attgtgtcat gcaacataaa
 7321 taaacttatt gtttcaacac ctactaattg tgttgtgggt attcattgta tataaactat
 7381 atttgctaca tctgtttttt gttttatata tactatatatt tgtagcgcca ggccattttt
 7441 gtagcttcaa ccgaattcgg ttgcatgctt tttggcaca aatgtgtttt tttaaatagt
 7501 tctatgtcag caactatggg ttaaacttgt acgtttcctg cttgccatgc gtgcaaatc
 7561 cctgttttcc tgacctgcac tgcttgccaa ccattccatt gttttttaca ctgcactatg
 7621 tgcaactact gaatcactat gtacattgtg tcatataaaa taaatcacta tgcgccaacg

7681 ccttacatac cgctgtagg cacatatattt tggcttggtt taactaacct aattgcatat
7741 ttggcataag gtttaactt ctaaggccaa ctaaagtca ccctagttca tacatgaact
7801 gtgtaaagggt tagtcataca ttgttcattt gtaaaactgc acatgggtgt gtgcaaaccg
7861 attttgggtt acacatttac aagcaactta tataataata ctaa

//

پیوست 2: نتیجه همترازی 534 سکوانس HPV و پرایمرهای GP.

HPV1a-e-/6419-6563
HPV1a 3-3-g2-/6419-6563
-V-HPV 1a 3-3-U06714/6419-6566
HPV1a-g-/6418-6563
HPV1a-g-/6418-6563
-HPV1aNA V01116/6418-6562
HPV1aL1L2-g2-/1805-1949
HPV1aL1-g2-/1006-1150
HPV41-g-/6563-6707
HPV41-g-/6563-6707
HPV41-g-/6563-6707
HPV41-g2-/6563-6707
HPV41-g2-/6563-6707
-HPV41NA V51147/6563-6707
HPV63-2-g2-/6370-6517
-HPV63NA X07028/6370-6517
HPV 63 L1-/6370-6517
HPV63-2-g2-/6370-6517
HPV63-g-/6370-6517
HPV63-g2-/6370-6517
HPV 50 L1-/6239-6413
HPV50-g-/6239-6413
HPV50-g2-/6239-6413
HPV50-g2-/6239-6413
HPV50-2-g2-/6239-6413
-HPV50NA AF31190/6239-6413
-V-HPV52NA AF531420/6655-6805
HPV 24 L1-/6739-6898
HPV24-e-/6739-6898
HPV24-g-/6739-6898
HPV24-g2-/6739-6898
-V-HPV24NA X11782/6739-6898
-V-HPV3NA AY382778/6666-6822
Liclonewal-3/7-166
HPVcloneJBL1-g2-/92-242
HPV49-g-/6825-6975
-V-HPV49insertinBcoRiIsiteofpG8
HPV49-e-/6825-6975
HPV49-g-/6825-6975
HPV75-g2-/6785-6935
-V-HPV75NA Y15173/6785-6935
HPV 75 L1-/6785-6935
HPV75-g2-/6785-6935
-V-HPV76NA Y15174/6813-6963
HPVcloneA3L1-g2-/92-251
HPVcloneJL1-g2-/92-242
HPV5b-g-/6970-7129
HPV5b-e-/6970-7129
-V-HPV5b-1-NA D90252/6970-7129
HPV 5 L1-/6937-7096
HPV5-g-/6937-7096
-V-HPV5NA M17463/6937-7096
HPV5-g-/6937-7096
-V-HPV3NA X11785/6911-7070
HPV36-g2-/6911-7070
HPV36-g2-/6911-7070
HPV 36 L1-/6911-7070
HPV 47 L1-/6917-7076
HPV47-e-/6917-7076
HPV47-g2-/6917-7076
-V-HPV47NA M32305/6917-7076
HPV 8 L1-/6868-7027
HPV8-e-/6868-7027
-V-HPV5NA M12737/6868-7027
HPV5-g2-/6868-7027
LiclonedL347/7-166
LHPVZ59563/37-196
LHPVZ59571/37-196
LHPVcloneS1-g2-/92-242
HPV 12 L1-/6864-7023
-V-HPV12insertinHindIIIsiteofp
HPV12-e-/6864-7023
HPV12-g-/6864-7023
HPV12RTRX7 U85660/6941-7100
HPV12RTRX7-g-/6941-7100
LHPV12RTRX7/681-840
LiclonedL347/7-166
HPV 14L1-g2-/6629-6788
HPV14L1-g-/6629-6788
HPV14L1-g-/6629-6788
-V-HPV14L1insertinHindIIIsiteof
HPV 20 L1-/6913-7076
F10L1

HPV1a-e-/6419-6563
HPV1a 3-3-g2-/6419-6563
-V-HPV 1a 3-3-U06714/6419-6566
HPV1a-g-/6418-6563
HPV1a-g-/6418-6563
-HPV1aNA V01116/6418-6562
HPV1aL1L2-g2-/1805-1949
HPV1aL1-g2-/1006-1150
HPV41-g-/6563-6707
HPV41-g-/6563-6707
HPV41-g-/6563-6707
HPV41-g2-/6563-6707
HPV41-g2-/6563-6707
-HPV41NA V51147/6563-6707
HPV63-2-g2-/6370-6517
-HPV63NA X07028/6370-6517
HPV 63 L1-/6370-6517
HPV63-2-g2-/6370-6517
HPV63-g-/6370-6517
HPV63-g2-/6370-6517
HPV 50 L1-/6239-6413
HPV50-g-/6239-6413
HPV50-g2-/6239-6413
HPV50-g2-/6239-6413
HPV50-2-g2-/6239-6413
-HPV50NA AF31190/6239-6413
-V-HPV52NA AF531420/6655-6805
HPV 24 L1-/6739-6898
HPV24-e-/6739-6898
HPV24-g-/6739-6898
HPV24-g2-/6739-6898
-V-HPV24NA X11782/6739-6898
-V-HPV3NA AY382778/6666-6822
Liclonewal-3/7-166
HPVcloneJBL1-g2-/92-242
HPV49-g-/6825-6975
-V-HPV49insertinBcoRiIsiteofpG8
HPV49-e-/6825-6975
HPV49-g-/6825-6975
HPV75-g2-/6785-6935
-V-HPV75NA Y15173/6785-6935
HPV 75 L1-/6785-6935
HPV75-g2-/6785-6935
-V-HPV76NA Y15174/6813-6963
HPVcloneA3L1-g2-/92-251
HPVcloneJL1-g2-/92-242
HPV5b-g-/6970-7129
HPV5b-e-/6970-7129
-V-HPV5b-1-NA D90252/6970-7129
HPV 5 L1-/6937-7096
HPV5-g-/6937-7096
-V-HPV5NA M17463/6937-7096
HPV5-g-/6937-7096
-V-HPV3NA X11785/6911-7070
HPV36-g2-/6911-7070
HPV36-g2-/6911-7070
HPV 36 L1-/6911-7070
HPV 47 L1-/6917-7076
HPV47-e-/6917-7076
HPV47-g2-/6917-7076
-V-HPV47NA M32305/6917-7076
HPV 8 L1-/6868-7027
HPV8-e-/6868-7027
-V-HPV5NA M12737/6868-7027
HPV5-g2-/6868-7027
LiclonedL347/7-166
LHPVZ59563/37-196
LHPVZ59571/37-196
LHPVcloneS1-g2-/92-242
HPV 12 L1-/6864-7023
-V-HPV12insertinHindIIIsiteofp
HPV12-e-/6864-7023
HPV12-g-/6864-7023
HPV12RTRX7 U85660/6941-7100
HPV12RTRX7-g-/6941-7100
LHPV12RTRX7/681-840
LiclonedL347/7-166
HPV 14L1-g2-/6629-6788
HPV14L1-g-/6629-6788
HPV14L1-g-/6629-6788
-V-HPV14L1insertinHindIIIsiteof
HPV 20 L1-/6913-7076
F10L1

HPV1a-e-/6419-6563
HPV1a 3-3-g2-/6419-6563
-V-HPV 1a 3-3-U06714/6419-6566
HPV1a-g-/6418-6563
HPV1a-g-/6418-6563
-HPV1aNA V01116/6418-6562
HPV1aL1L2-g2-/1805-1949
HPV1aL1-g2-/1006-1150
HPV41-g-/6563-6707
HPV41-g-/6563-6707
HPV41-g-/6563-6707
HPV41-g2-/6563-6707
HPV41-g2-/6563-6707
-HPV41NA V51147/6563-6707
HPV63-2-g2-/6370-6517
-HPV63NA X07028/6370-6517
HPV 63 L1-/6370-6517
HPV63-2-g2-/6370-6517
HPV63-g-/6370-6517
HPV63-g2-/6370-6517
HPV 50 L1-/6239-6413
HPV50-g-/6239-6413
HPV50-g2-/6239-6413
HPV50-g2-/6239-6413
HPV50-2-g2-/6239-6413
-HPV50NA AF31190/6239-6413
-V-HPV52NA AF531420/6655-6805
HPV 24 L1-/6739-6898
HPV24-e-/6739-6898
HPV24-g-/6739-6898
HPV24-g2-/6739-6898
-V-HPV24NA X11782/6739-6898
-V-HPV3NA AY382778/6666-6822
Liclonewal-3/7-166
HPVcloneJBL1-g2-/92-242
HPV49-g-/6825-6975
-V-HPV49insertinBcoRiIsiteofpG8
HPV49-e-/6825-6975
HPV49-g-/6825-6975
HPV75-g2-/6785-6935
-V-HPV75NA Y15173/6785-6935
HPV 75 L1-/6785-6935
HPV75-g2-/6785-6935
-V-HPV76NA Y15174/6813-6963
HPVcloneA


```

-V-HPV65NA_X70829/6337-6490  TATTGTGACACCTCTGACAAACATATAACTAAATTACTATCTCTAAA-----ACAGAAGCAGCGATGAATCTATAAA-----ATAAAGCAGG-----GATTTTAAACAGTATT-TAAGACACATT-GAGGAGCTTGAAATGGAAATTAACTTTTCAGC-- 154
HPV95-g2-/6379-6532  CTTTTTGTAACCTGGTIGATAATACCCATAAACCTAACTTTACTATTTCTGAAA-----GCAAGAAGGAGGATAACAATATACA-----ATAAAGCAAAAT-----GATTTTAAACAGTATT-TAAGACACATT-GAGGAAATTGAATGGAGTTTAACTTTTCAGC-- 154
HPV 60_L-/6394-6553  TTATTCATTACTATAGTAGATAAATACCGAAATACTAAATTATCTATTTTCAGTTTA-----CAAAACAAGATGCTGCTAATTGATAACAGA-----TATAAAATATAAAC-----AGGAAGATTTTAGACAGTATT-TACGCCATACT-GAAGAAATGAAGTAGAGTTAACTCTGAGAC-- 160
HPV60-e-/6394-6553  TTATTCATTACTATAGTAGATAAATACCGAAATACTAAATTATCTATTTTCAGTTTA-----CAAAACAAGATGCTGCTAATTGATAACAGA-----TATAAAATATAAAC-----AGGAAGATTTTAGACAGTATT-TACGCCATACT-GAAGAAATGAAGTAGAGTTAACTCTGAGAC-- 160
HPV60-g-/6394-6553  TTATTCATTACTATAGTAGATAAATACCGAAATACTAAATTATCTATTTTCAGTTTA-----CAAAACAAGATGCTGCTAATTGATAACAGA-----TATAAAATATAAAC-----AGGAAGATTTTAGACAGTATT-TACGCCATACT-GAAGAAATGAAGTAGAGTTAACTCTGAGAC-- 160
HPV60-g2-/6394-6553  TTATTCATTACTATAGTAGATAAATACCGAAATACTAAATTATCTATTTTCAGTTTA-----CAAAACAAGATGCTGCTAATTGATAACAGA-----TATAAAATATAAAC-----AGGAAGATTTTAGACAGTATT-TACGCCATACT-GAAGAAATGAAGTAGAGTTAACTCTGAGAC-- 160
HPV60-2-g2-/6394-6553  TTATTCATTACTATAGTAGATAAATACCGAAATACTAAATTATCTATTTTCAGTTTA-----CAAAACAAGATGCTGCTAATTGATAACAGA-----TATAAAATATAAAC-----AGGAAGATTTTAGACAGTATT-TACGCCATACT-GAAGAAATGAAGTAGAGTTAACTCTGAGAC-- 160
-V-HPV60NA_U31792/6394-6553  TTATTCATTACTATAGTAGATAAATACCGAAATACTAAATTATCTATTTTCAGTTTA-----CAAAACAAGATGCTGCTAATTGATAACAGA-----TATAAAATATAAAC-----AGGAAGATTTTAGACAGTATT-TACGCCATACT-GAAGAAATGAAGTAGAGTTAACTCTGAGAC-- 160
HPV 48_L-/6201-6375  CTGTTTATTACAGTTTTTGATAAATACCTATAAATGTGAATTTTACTATTAGTGTAA-----GAATGATAAAACGCAATTAACGAAAAC-----TACATAGATAAATGGTTACAAAATAAATAATGCAGATTTTAAACAATATC--TTCGACATACA-GAAGAAATGAATAGAGTTGGTTTTTCAGT-- 175
HPV48-e-/6201-6375  CTGTTTATTACAGTTTTTGATAAATACCTATAAATGTGAATTTTACTATTAGTGTAA-----GAATGATAAAACGCAATTAACGAAAAC-----TACATAGATAAATGGTTACAAAATAAATAATGCAGATTTTAAACAATATC--TTCGACATACA-GAAGAAATGAATAGAGTTGGTTTTTCAGT-- 175
HPV48-g-/6201-6375  CTGTTTATTACAGTTTTTGATAAATACCTATAAATGTGAATTTTACTATTAGTGTAA-----GAATGATAAAACGCAATTAACGAAAAC-----TACATAGATAAATGGTTACAAAATAAATAATGCAGATTTTAAACAATATC--TTCGACATACA-GAAGAAATGAATAGAGTTGGTTTTTCAGT-- 175
HPV48-2-g2-/6201-6375  CTGTTTATTACAGTTTTTGATAAATACCTATAAATGTGAATTTTACTATTAGTGTAA-----GAATGATAAAACGCAATTAACGAAAAC-----TACATAGATAAATGGTTACAAAATAAATAATGCAGATTTTAAACAATATC--TTCGACATACA-GAAGAAATGAATAGAGTTGGTTTTTCAGT-- 175
-V-HPV48NA_U31789/6201-6375  CTGTTTATTACAGTTTTTGATAAATACCTATAAATGTGAATTTTACTATTAGTGTAA-----GAATGATAAAACGCAATTAACGAAAAC-----TACATAGATAAATGGTTACAAAATAAATAATGCAGATTTTAAACAATATC--TTCGACATACA-GAAGAAATGAATAGAGTTGGTTTTTCAGT-- 175
HPV5b-g-/7360-7536  GTTGTGTCTACAAGACTCAAACTGACCCCTGTGCTCCGGTCCCGAGTGTCTCTCCAAAT-----TCCCACCACTCACTTTGACATGAATGTCTCAACATCACAGTCGCCCC-----CTAGCTCTCCCACTAACAGCCCTGCACTGGATGGCTGCTGGTCCCGGGGACACACCTTTCTCTAGATG 177
-V-HPV5b_2_NA_D26561/7360-7536  GTTGTGTCTACAAGACTCAAACTGACCCCTGTGCTCCGGTCCCGAGTGTCTCTCCAAAT-----TCCCACCACTCACTTTGACATGAATGTCTCAACATCACAGTCGCCCC-----CTAGCTCTCCCACTAACAGCCCTGCACTGGATGGCTGCTGGTCCCGGGGACACACCTTTCTCTAGATG 177
HPV18L1-g2/2-178  ATGNTTGANCNNGCGNNGGNANNNCTNGTGCAGACCTTGAAATCTTGNCNTTGGCA-----TATTGACCCANGGNCATCTCTGGCTTCTTGCCATGTCTATGACCCCTGGG-----CAGATTGTACAAAACGATATGATCCACCCAACTAGTAGTGGCGGGGGGGAACACCAAAAGTCCAAAT-- 177
HPVLIpartial3-g2-/42-190  ATCTTCTGA--GTCCAAGACGGTGTGTGGCACCGATCTGATCTATAAGGCA-----ACAACCTGACGAGCTGACCGGG-----TGCTGCGG-----ATCCTTGGGAAGCTATATCTAGTCAGAGTAAACAAACATCTCTTGAATCTGTGTAAGT-- 149
ruler 1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....90.....100.....110.....120.....130.....140.....150.....160.....170.....180.....

```



S= G/C	Y= C/T	M= A/C	H= A/C/T	D= A/G/T	N= A/C/G/T	X = Modif.
W= A/T	R= A/G	K= G/T	B= C/G/T	V= A/C/G	I= inosin	S = Thio

>HPV 18

KKWTTTGTACTGTGGTAGATAC^YACTC^{SY}AGTACCAATTTAACAATATGTGCTTCTACACAGTCTC
CTGTACCTGGGCAR^TTATGATGCTACCAAAT^YTAR^{GC}AGTATAGCAGACATGTTGAR^{RG}AATATGATT
TRCAGTTTATTTTTCAN^H

>HPV 45

TTGTTTGTACTGTAGTGGAY^YACTACCCGCAGTACTAATTTAACATTATGTGCCTCTACASAAAM^{TC}
CTGTGCCAR^{RR}TACATATGAY^CCTACTAAGTTTAAGCA^VTATAGTAGACATGTGGAGGAATATGATT
ACAGTTTATTTTTCAGT

>HPV 39

TTATTTCTTACTGT^WGTGGACACTACCCGTAGTACCAACTTTACATTATCTACCTCTATAGAGTCTT
CCATACCTTCTACATATGATCCTTCTAAGTTTAAGGAATATAY^CCAGGCACGTGGAGGAGTATGATT
ACAATTTATATTTCAAC

>HPV70

TTGTTTATTACTGTGGTGGACACTACACGTAGTACTAATTTTACATTGTCTGCCTGCACCGAAACGG
CCATACCTGCTGTATATAGCCCTACAAAGTTTAAGGAATATACTAGGCATGTGGAGGAATATGATT
TACAATTTATATTTCAAT

>HPV68

TTATTTCTTAC^YGTTGTGGATAC^MACK^CGCAGTAC^YAATTTTAC^WTTGTC^YACTACTAC^WGAM^{TCW}
RCTGTACCAR^{MT}RT^KTATGAT^YCTAATAAR^TTTTAAGGAATAT^RTTAGGCATGTTGAGGAATATGATT
TGCA^{RT}TYATATTTTCAGT

>HPV59

TTGTTTTTAACAGTTGTAGATACTAC^YCGCAGCACCAATCTTTCTGTGTGTGCTTCTACTAC^{KB}CTTC
TATTCCTAATGTATACACACCTACCAGTTTTAAAGAATATGCCAGACATGTGGAGGAATTTGATTG
CAGTTTATATTTCAAC

>HPV61

TTGTTTGTAAACCGTTGTGGATACCACCCGCAGTACTAATTTAACCATTTGTACTGCTACATCCCCC
CTGTATCTGAATATAAAGCCACAAGCTTTAGGAATATTTGCGCCATACAGAGGAGTTTGATTG
AATTTATTTTTCAGT

>HPV81

ATGTTTGTACAGTGGTGGATACTACCAGAAGCACCAATTTTACTATTTGCACAGCTACATCTGCTG
CTGCAGAATACAAGGCCCTCTA^{CT}TTAAGGAATTTCTGCGCCATACAGAGGAATATGATTTGCAGT
TTATTTTCCAAT

>HPV72

CTTTTTGTGACAGTTGTAGATACTACTCGCAGTACTAATGTA^{CT}ATTTGTACTGCCACAGCGTCCT
CTGTATCAGAATATACAGCTTCTA^{CT}ATTTTCGTGAGTATCTT^{CT}GCCACACTGAGGAATTTGATTGCA
GTTTATATTTCAAC

>HPV6

CTGTTTGTACTGTGGTAGATACCACACGCAGTACCAACATGACATTATGTGCATCCGTA^{CT}ACTACA
TCTTCCACATACCAATTCTGATTATAAAGAGTACATGCGTCATGTGGAAGAGTATGATTTACAAT
TTATTTTTCAT

>HPV11

TTGTTTGTACTGTGGTAGATACCACACGCAGTACAAATATGACACTATGTGCATCTGTGTCTAAAT
CTGCTACATACACTAATTCAGATTATAAGGAATACATGCGCCATGTGGAGGAGTTTGATTACAGT
TTATTTTCAAT

>HPV44

TTATTTGTACTGTTGTAGATACTACCCGTAGTACAAACATGACAATATGTGCTGCCACTACACAGT
CCCCTCCGTCTACATATACTAGTGAACAATATAAGCAATACATGCGACATGTTGAGGAGTTTGACT
TACAATTTATGTTTCAAT

>HPV16

BNWTTTGTACTGT**KGTW**GATACTAC**M**CGCAG**Y**ACAAAT**Y**GTCATTATGTGCTGCCATATC**W**ACT
TC**M**GARMCT**VCRT**TATAAAAATACTAACTTTAA**V**GAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTA
CAG**Y**TTATTTTCA**HN**

>HPV33

GTATTTGTACTGTGGTAGATACCACTCGCAGTACTAATATGACTTTATGCACACAAGT**M**ACTAGTG
ACAGTACATATAAAAAATGA**R**AATTTTAAAGAATATATAAGACATGTTGAAGAATATGAT**Y**TACAGTT
TGTTTTTCAAC

>HPV58

TTATTTGTACC**GT**R**GT**TGATACCACTCGTAGCACTAATATGACATTATGCACTGAAGTAACTA**RG**
AAG**RT**ACATATAAAAAAT**R**ATAATTTTAAAGAATATGTACGTCATGTTGAAGAATATGACTTACAGTT
TGTTTTTCAGC

>HPV52

TTGTTTGTACAGTTGTGGATACCACTCGTAGCACTAACATGACTTTATGTGCTGA**RGT****K**AMAAAG
GA**RR**CACATATAAAAAATGAAAATTTTAAAGGAATACCTTCGTCATGGCGAGGAATT**Y**GATTTACAA
TTATTTTCAAT

>HPV35

TTGTTTGTACTGTAGTTGATACAACCCGTAGTACAAATATGTCTGTGTGTTCTGCTGTGTCT**W**CTA
GTGACAGTACATATAAAAAATGACAATTTTAAAGGAATATTTAAGGCATGGTGAAGAATATGATTAC
AGTTTATTTTTCAGT

>HPV31

TTATTTGTACTGTGGTAGATACCACACG**Y**AGTACCAATATGTCTGT**K**TGTGCTGCAATTGCAAACA
GTGATACTACATTTAAAGTAGTAATTTTAAAGAGTATTTAAGACATGGTGAGGAATT**Y**GATTTACA
ATTTATATTTTCAGT

>HPV42

CTATTTTAACTGTGGTTGATACTACCCGTAGTACTAACATGACTTTGTGTGCCACTGCAACATCTG
GTGATACATATACAGCTGCTAATTTTAAAGGAATATTTAAGACATGCTGAAGAATATGATGTGCAATT
TATATTTCAAT

>HPV54

KTGTTTTTAAACAGTTGTAGATACCACCCG**Y**AGTACTAACCTAAC**W**TT**RT**GTGCTACAGCA**WCCWC**
GCAGGATA**SS**TTTAATAAT**KCT****R**ACTTT**R**GGAGTATAT**W**AGACATGTGGAGGAATATGATTTACA
RTTTATATTTTCAGT

>HPV40

TTATTTGTACAGTTGTAGACACCACTCGTAGCACTAATTTAACCTTATGTGCTGCCACACAGTCCC
CCACACCAACCCCATATAATAACAGTAATTTCAAGGAATATTTGCGTCATGGGGAGGAGTTTGATT
TGCAGTTTATTTTTCAGT

>HPV43

TTGTTTGTACAGTGGTAGATACCACTCGTAGTACAACTTAACGTTATGTGCCTCTACTGACCCTA
CTGTGCCAGTACATATGACAATGCAAAGTTTAAAGGAATACCTGCGGCATGTGGAAGAATATGATC
TGCAGTTTATATTTCAAT

>HPV73

TTATTTTAACTGTTGTAGATACTACTAGAAGCACTAATTTTCTGTATGTGTAGGTACACAGGCTA
GTAGCTCTACTACAACGTATGCCAACTCTAATTTTAAAGGAATATTTAAGACATGCAGAAGAGTTTG
ATTTACAGTTTGTTTTTCAGT

>HPV26

TTGTTTGTTACCTGTGTTGATACCACCCGCAGTACTAACCTTACCATTAGTACATTATCTGCAGCAT
CTGCATCCACTCCATTTAAACCATCTGATTATAACAATTTATAAGACATGGCGAAGAATATGAATT
ACAATTTATATTTCAAGT

>HPV51

CTTTTT~~R~~TTAC~~Y~~~~K~~~~K~~~~K~~GT~~W~~GATACTACCAGAAGTACAAATTTAACTATTAGCACTGCCACTGCTGCG
GTTTCCCCAACATTTACTCCAAGTAACTTTAAGCAATATATTAGGCATGGGGAAGAR~~T~~ATGA~~W~~TT~~R~~
CA~~R~~TTTATTTTCAAT

>HPV82

CTTTTTATTACTTGTGTTGACACTAC~~Y~~A~~R~~AAGTAC~~Y~~AATTTAACCATTAGCACTGCTG~~Y~~TACTCCATC
~~W~~GTTGCACARACATT~~Y~~ACTCCARCAAACCTTTAAGCAGTAYATTAGGCAYGGGGAAGAATATGAATT
RCAATTTAT~~W~~TTTCAAT

>HPV53

TTATTTGTAAGTGTGTTGGATACCACCAGGAATACAAACATGACTCTTTC~~Y~~GCAACCACACAGTCTA
TGTC~~Y~~ACATATAATTCAAAGCAAATTAACAGTATGTTAG~~R~~CATGCAGAGGAATATGAATTACAATT
TGTGTTTCAAC

>HPV56

TTATTTGTTACTGTAGTAGATACTACTAGAAGTACTAACATGACTATTAGTACTGCTACAGAACAGT
TAAGTAAATATGATGCACGAAAAATTAATCAGTACCTTAGACATGTGGAGGAATATGAATTACAAT
TTGTTTTTCAAT

>HPV66

GTATTTGTTACTGTTGTGGATACTACCAGAAG~~Y~~ACCAACATGACTATTAATGCAGCTAAAAGCACA
TTAAC~~W~~AAATATGATGCMCGTGAAATCAATCAATACCTTCGCCATGTGGAGGAATATGAAGTACA
GTTTGTGTTTCAAC

پیوست 4 : سکوانسهای HPV 18 (آخرین سکوانس به علت تفاوت زیاد با سکوانسهای دیگر حذف گردید) .

```

HPV18variant/862-1014 TTAATTGTTACTGTGGTAGATACCACTCGCAGTACCAATTAAACAATATGTGCTGC-----TACACAGTCTCCGTACCTG-----GGCAATATG-ATGC-----TACCAAATTTAAGCAGTATA-GCAGACATGTT-GAGGAATATGATTTCAGTTTATTTTCAGT----- 151
HPV_18_L_/6597-6749 TTAATTGTTACTGTGGTAGATACCACTCGCAGTACCAATTAAACAATATGTGCTGC-----TACACAGTCTCCGTACCTG-----GGCAATATG-ATGC-----TACCAAATTTAAGCAGTATA-GCAGACATGTT-GAGGAATATGATTTCAGTTTATTTTCAGT----- 151
-V-HPV18attataacttttaacaattgtta TTAATTGTTACTGTGGTAGATACCACTCGCAGTACCAATTAAACAATATGTGCTGC-----TACACAGTCTCCGTACCTG-----GGCAATATG-ATGC-----TACCAAATTTAAGCAGTATA-GCAGACATGTT-GAGGAATATGATTTCAGTTTATTTTCAGT----- 151
HPV18_2-g-/6597-6749 TTAATTGTTACTGTGGTAGATACCACTCGCAGTACCAATTAAACAATATGTGCTGC-----TACACAGTCTCCGTACCTG-----GGCAATATG-ATGC-----TACCAAATTTAAGCAGTATA-GCAGACATGTT-GAGGAATATGATTTCAGTTTATTTTCAGT----- 151
HPV18isolateIS002L1-g2-/40-192 TTAATTGTTACTGTGGTAGATACCACTCGCAGTACCAATTAAACAATATGTGCTGC-----TACACAGTCTCCGTACCTG-----GGCAATATG-ATGC-----TACCAAATTTAAGCAGTATA-GCAGACATGTT-GAGGAATATGATTTCAGTTTATTTTCAGT----- 151
HPV18isolateIS664L1-g2-/40-192 TTAATTGTTACTGTGGTAGATACCACTCGCAGTACCAATTAAACAATATGTGCTGC-----TACACAGTCTCCGTACCTG-----GGCAATATG-ATGC-----TACCAAATTTAAGCAGTATA-GCAGACATGTT-GAGGAATATGATTTCAGTTTATTTTCAGT----- 151
HPV18-g-/6597-6749 TTAATTGTTACTGTGGTAGATACCACTCGCAGTACCAATTAAACAATATGTGCTGC-----TACACAGTCTCCGTACCTG-----GGCAATATG-ATGC-----TACCAAATTTAAGCAGTATA-GCAGACATGTT-GAGGAATATGATTTCAGTTTATTTTCAGT----- 151
HPV18_3-g-/6597-6749 TTAATTGTTACTGTGGTAGATACCACTCGCAGTACCAATTAAACAATATGTGCTGC-----TACACAGTCTCCGTACCTG-----GGCAATATG-ATGC-----TACCAAATTTAAGCAGTATA-GCAGACATGTT-GAGGAATATGATTTCAGTTTATTTTCAGT----- 151
-V-HPV18NA_X08015/6597-6749 TTAATTGTTACTGTGGTAGATACCACTCGCAGTACCAATTAAACAATATGTGCTGC-----TACACAGTCTCCGTACCTG-----GGCAATATG-ATGC-----TACCAAATTTAAGCAGTATA-GCAGACATGTT-GAGGAATATGATTTCAGTTTATTTTCAGT----- 151
HPV18-e-/6597-6749 TTAATTGTTACTGTGGTAGATACCACTCGCAGTACCAATTAAACAATATGTGCTGC-----TACACAGTCTCCGTACCTG-----GGCAATATG-ATGC-----TACCAAATTTAAGCAGTATA-GCAGACATGTT-GAGGAATATGATTTCAGTTTATTTTCAGT----- 151
HPV18isolateIS326L1-g2-/40-192 TTAATTGTTACTGTGGTAGATACCACTCGCAGTACCAATTAAACAATATGTGCTGC-----TACACAGTCTCCGTACCTG-----GGCAATATG-ATGC-----TACCAAATTTAAGCAGTATA-GCAGACATGTT-GAGGAATATGATTTCAGTTTATTTTCAGT----- 151
HPV18isolateIS168L1-g2-/40-192 TTAATTGTTACTGTGGTAGATACCACTCGCAGTACCAATTAAACAATATGTGCTGC-----TACACAGTCTCCGTACCTG-----GGCAATATG-ATGC-----TACCAAATTTAAGCAGTATA-GCAGACATGTT-GAGGAATATGATTTCAGTTTATTTTCAGT----- 151
HPV18isolateIS768L1-g2-/40-192 TTAATTGTTACTGTGGTAGATACCACTCGCAGTACCAATTAAACAATATGTGCTGC-----TACACAGTCTCCGTACCTG-----GGCAATATG-ATGC-----TACCAAATTTAAGCAGTATA-GCAGACATGTT-GAGGAATATGATTTCAGTTTATTTTCAGT----- 151
HPV18isolateIS172L1-g2-/40-192 TTAATTGTTACTGTGGTAGATACCACTCGCAGTACCAATTAAACAATATGTGCTGC-----TACACAGTCTCCGTACCTG-----GGCAATATG-ATGC-----TACCAAATTTAAGCAGTATA-GCAGACATGTT-GAGGAATATGATTTCAGTTTATTTTCAGT----- 151
HPV18isolate9L1-g2-/2-154 GGTTCGTTACTGTGGTAGATACCACTCGCAGTACCAATTAAACAATATGTGCTGC-----TACACAGTCTCCGTACCTG-----GGCAATATG-ATGC-----TACCAAATTTAAGCAGTATA-GCAGACATGTT-GAGGAATATGATTTCAGTTTATTTTCAGT----- 151
HPV18isolate2L1-g2-/1-150 GTTCGTTACTGTGGTAGATACCACTCGCAGTACCAATTAAACAATATGTGCTGC-----TACACAGTCTCCGTACCTG-----GGCAATATG-ATGC-----TACCAAATTTAAGCAGTATA-GCAGACATGTT-GAGGAATATGATTTCAGTTTATTTTCAGT----- 148
HPV18isolate1L1-g2/1-151 GTTCGTTACTGTGGTAGATACCACTCGCAGTACCAATTAAACAATATGTGCTGC-----TACACAGTCTCCGTACCTG-----GGCAATATG-ATGC-----TACCAAATTTAAGCAGTATA-GCAGACATGTT-GAGGAATATGATTTCAGTTTATTTTCAGT----- 149
HPV18isolate17L1-g2-/1-146 GTTCGTTACTGTGGTAGATACCACTCGCAGTACCAATTAAACAATATGTGCTGC-----TACACAGTCTCCGTACCTG-----GGCAATATG-ATGC-----TACCAAATTTAAGCAGTATA-GCAGACATGTT-GAGGAATATGATTTCAGTTTATTTTCAGT----- 144
HPV18isolate3L1-g2-/1-150 GTTCGTTACTGTGGTAGATACCACTCGCAGTACCAATTAAACAATATGTGCTGC-----TACACAGTCTCCGTACCTG-----GGCAATATG-ATGC-----TACCAAATTTAAGCAGTATA-GCAGACATGTT-GAGGAATATGATTTCAGTTTATTTTCAGT----- 148
HPV18isolate8L1-g2-/1-150 GTTCGTTACTGTGGTAGATACCACTCGCAGTACCAATTAAACAATATGTGCTGC-----TACACAGTCTCCGTACCTG-----GGCAATATG-ATGC-----TACCAAATTTAAGCAGTATA-GCAGACATGTT-GAGGAATATGATTTCAGTTTATTTTCAGT----- 148

```