

HPV 基因芯片检测质控点设计和参数优化研究\*

兰金芝<sup>1</sup>, 刘 扬<sup>1</sup>, 徐 澍<sup>2</sup>, 张金娟<sup>3</sup>, 王 欢<sup>4</sup>, 肖 俊<sup>5</sup>, 江银辉<sup>6\*\*</sup>, 陈腾祥<sup>1\*\*</sup>

(1. 贵州医科大学 基础医学院 生理学教研室, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学 临床医学院 病理学教研室, 贵州 贵阳 550004; 3. 贵州医科大学 基础医学院 机能学实验室, 贵州 贵阳 550004; 4. 贵州医科大学 基础医学院 人体组织与胚胎学教研室, 贵州 贵阳 550004; 5. 贵州医科大学 生物与工程学院 物理学教研室, 贵州 贵阳 550004; 6. 贵州医科大学 贵州省分子生物学重点实验室, 贵州 贵阳 550004)

**[摘 要]** 目的: 设计人乳头状瘤病毒(HPV)基因芯片的质量控制点, 优化质量控制探针和人 $\beta$ 珠蛋白基因引物浓度以及 HPV 引物浓度比例, 以提高基因芯片的检测质量。方法: 收集临床 HPV 患者宫颈刮片样本, 提取样本 HPV58 的 DNA, 用 HPV 通用引物扩增病毒 DNA; 利用人 $\beta$ 珠蛋白引物扩增样本中的 $\beta$ 珠蛋白 DNA, 将扩增的 PCR 产物与线性化的 pMD18-T 载体连接, 构建人 $\beta$ 珠蛋白和 HPV58 L1 区 DNA 质粒, 转化大肠杆菌后, 进行单克隆培养, 获得 HPV58 样本和人 $\beta$ 珠蛋白的 DNA 模板; 以 HPV58 和人 $\beta$ 珠蛋白 DNA 基因信息设计并制备扩增 HPV 和人 $\beta$ 珠蛋白探针及 PCR 引物, 将人 $\beta$ 珠蛋白基因探针固定于基因芯片作为质量控制点(QC), 按 1: 20、1: 10、1: 5 和 1: 4 比例混合单克隆 HPV 扩增引物与人 $\beta$ 珠蛋白扩增引物, 采用 PCR 反向点杂交技术, 对模板进行扩增后, 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物的产量, 进行基因芯片孵育杂交和显色; 用扫描仪扫描芯片, 采用 Image J 软件对各阳性杂交信号点进行信号强度采集, 计算最佳的人 $\beta$ 珠蛋白扩增引物 and HPV 扩增引物浓度比值; 将 QC 的探针点样浓度设为 0. 1 pmol/L、1 pmol/L、10 pmol/L、50 pmol/L 和 100 pmol/L, 检测信号强度, 优化质量控制探针点样浓度。结果: 扩增了 HPV58 病毒 DNA 和人 $\beta$ 珠蛋白的 DNA 模板, 设计了 HPV58 和人 $\beta$ 珠蛋白探针及 PCR 引物; 琼脂糖凝胶电泳检测分析发现, 当人 $\beta$ 珠蛋白扩增引物与 HPV 扩增引物的浓度比例为 1: 10 时, 二者同时 PCR 扩增时, 扩增的强度较为一致, 得到的产物量相当, 用此引物浓度比例进行 PCR 获得的产物与测试芯片进行杂交, 显色的平衡性较好; 对 QC 的点样浓度进行测试发现, 当 QC 点样探针浓度为 50 pmol/L 时, 可以获得最佳的检测效果。结论: 通过对 $\beta$ 珠蛋白扩增引物与 HPV 扩增引物的最佳浓度比例和质量控制探针最佳点样浓度的优化, 提高了 HPV 检测点的检测质量。

**[关键词]** 人乳头状瘤病毒; 基因芯片; 引物; 探针;  $\beta$ 珠蛋白; 质量控制

**[中图分类号]** Q789; R373; R446.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2018)10-1221-06

**DOI:** 10. 19367/j. cnki. 1000-2707. 2018. 10. 019

Design of Quality Control and Parameter Optimization  
for HPV Gene Chip Detection

LAN Jinzhi<sup>1</sup>, LIU Yang<sup>1</sup>, XU Shu<sup>2</sup>, ZHANG Jinjuan<sup>3</sup>, WANG Huan<sup>4</sup>,  
XIAO Jun<sup>5</sup>, JIANG Yinhui<sup>6</sup>, CHEN Tengxiang<sup>1</sup>

(1. Department of Physiology, School of Basic Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China;  
2. Department of Pathology, School of Clinical Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou China;  
3. Laboratory of Medical function, School of Basic Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China;  
4. Department of Human Histology and Embryology, School of Basic Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China;  
5. Department of Physics, School of Biology and Engineering, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China;  
6. Key Laboratory of Molecular Biology of Guizhou Province, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

\*[基金项目] 国家自然科学基金项目(81060176); 贵州省科技合作计划项目[黔科合 LH 字(2016)7348]; 贵阳市人民政府 - 贵州医科大学联合基金项目[筑科合同(20161001)002 号]

\*\* 通信作者 E-mail: gzctxin@ qq. com; hzjyh123@ qq. com

网络出版时间: 2018 - 10 - 10 网络出版地址: <http://kns. cnki. net/kcms/detail/52. 1164. R. 20181010. 2224. 009. html>

[ **Abstract** ] **Objective:** To design a quality control point for human papillomavirus (HPV) gene chip, optimize quality control probe, human  $\beta$ -globin gene primer concentrations, and HPV primer concentration ratio to improve the quality of gene chip detection. **Methods:** Cervical smear samples were collected from patients with clinical manifestations of HPV related infections, and HPV58 DNA was extracted from the samples. HPV universal primer and the human  $\beta$ -globin primer were used to amplify the HPV58 and  $\beta$ -globin gene respectively. The amplified PCR product was ligated with the linearized pMD18-T vector to construct human  $\beta$ -globin and HPV58 L1 region DNA plasmids, which were transformed into *E. coli*. After the transformation, monoclonal cultivation was used to obtain DNA templates of HPV58 samples and human  $\beta$ -globin. Amplified HPV, human  $\beta$ -globin probes and PCR primers were designed and prepared using HPV58 and human  $\beta$ -globin DNA gene information. The probes fixed on the gene chip were used as a quality control point (QC). Monoclonal HPV amplification primers and human  $\beta$ -globin amplification primers were mixed at a ratio of 1:20, 1:10, 1:5 and 1:4 to amplify the templates with PCR reverse dot blot (RDB) hybridization that the products were detected by agarose gel electrophoresis. Then gene chips were incubated for hybridization and coloration. Scanned the chip with a scanner to collect the signal intensity of each positive hybridization signal point by Image J software to calculate the optimal concentration ratio of primers of human  $\beta$ -globin and HPV, set the QC probe spot concentration to 0.1 pmol/L, 1 pmol/L, 10 pmol/L, 50 pmol/L and 100 pmol/L, detect signal strength and optimize concentration of the QC probe. **Results:** HPV58 DNA and human  $\beta$ -globin were amplified; Probes and PCR primers were designed to detect HPV58 and human  $\beta$ -globin. Agarose gel electrophoresis analysis showed that when the concentration ratio of primers ( $\beta$ -globin/HPV58) is 1:10, and both were simultaneously PCR amplified, the amplification intensity was relatively uniform, and the obtained products were equivalent. The products obtained by PCR using this primer concentration ratio is hybridized with the test chip, and the color balance is better. The QC spotting concentration was tested and found to be the best when the QC spotting probe concentration was 50 pmol/L. **Conclusion:** The optimization of the quality control points and the concentration ratio of probes of human  $\beta$ -globin and HPV amplification primers improves the detection quality of HPV detection points.

[ **Key words** ] human papillomavirus; gene chip; primer; probe;  $\beta$ -globin; quality control

基因芯片(gene chip)技术是20世纪90年代末迅速发展起来的一项应用性技术<sup>[1]</sup>,其作为一项低消耗、高灵敏度、高通量检测方法,近年来已经被广泛应用于疾病的诊断和分型<sup>[2]</sup>。人类乳头状瘤病毒(human papillomavirus, HPV)是一种嗜上皮性病毒,目前已鉴定出80多种HPV型别,可特异性地感染人和动物,以其感染的上皮所在部位分为皮肤型HPV和生殖道上皮HPV,大约35种HPV亚型可感染妇女生殖道,引起宫颈癌<sup>[3]</sup>。不同型别HPV引起宫颈癌的能力不同,根据危险性高低分为低危险型和高危险型HPV<sup>[4-6]</sup>,因此HPV的基因诊断和分型鉴定对于预防宫颈癌,决定临床治疗方案具有关键的指导意义<sup>[7-8]</sup>。基因芯片技术是目前HPV基因诊断和分子分型检测最好的解决方案<sup>[9-13]</sup>,目前已经有研究开发基因芯片对HPV

基因型进行检测<sup>[14-15]</sup>,但是能够检测的HPV亚型种类还有限,质控还有待进一步的提高,而芯片点样探针的浓度和引物的比例是其中重要的影响因素。本研究通过对检测引物浓度以及探针浓度进行优化,筛选出最佳的检测引物浓度和点样探针浓度,以提高HPV基因芯片检测质量和效率。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本来源

感染HPV女性患者门诊宫颈刮片脱落细胞标本(40例)取材于清镇市第一人民医院,患者年龄为21~67岁,平均37.9岁。40例标本已经由临床检验科室用人乳头瘤病毒基因分型检测试剂盒、PCR和测序等其它检测方法明确了HPV亚型,并

在其中获得了 HPV58 的样本,人 $\beta$  珠蛋白 DNA 标本由本实验室提供。

1.2 主要试剂与仪器

HPV 分型基因芯片由本课题组研发制备。Ex Taq Marster DNA Mix、pMD18-T simple vector 和 DNA Marker 购自宝生物(大连)有限公司, HPV DNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司,生物素标记引物和氨基标记探针由天一辉远生物科技有限公司合成,TBM 显色液、Gel Extraction Kit 和 DNA Clean-up Kit 购自康为世纪生物科技有限公司,Biodyne<sup>®</sup>C 膜购自 Pall Life Science,Streptavidin-HRP 购自碧云天生物科技有限公司。ABI 9700 型 PCR 仪购自 Life Technologies,恒温孵育摇床购自杭州米欧仪器有限公司,凝胶成像仪购自英国 Syngene。

1.3 临床样本 HPV 的 DNA 抽提

向 HPV 感染的宫颈脱落细胞标本管中加入

DNA 提取液 50  $\mu$ L,充分混匀,100  $^{\circ}$ C 保温 10 min,以 10 000 r/min 离心 5 min,保留上清液,DNA 样品立即使用或放置于 -20  $^{\circ}$ C 保存。

1.4 HPV58 基因组 L1 区重组质粒的构建

扩增临床样品中的 HPV58 基因,94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94  $^{\circ}$ C 变性 40 s,55  $^{\circ}$ C 退火 45 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 40 s,共 35 个循环,72  $^{\circ}$ C 延伸 7 min,扩增结束后进行琼脂糖凝胶电泳检测。采用 DNA 回收试剂盒纯化 HPV58 PCR 产物,连接 pMD18-T 载体,按比例加入大肠杆菌感受态细胞热击转化,涂布含氨苄的 LB 平板,挑选单菌落进行菌落 PCR 检测。

1.5 HPV 引物与探针的设计

参考 Gravitt 等改进的引物<sup>[13]</sup>,在 HPV 基因组的 L1 区域保守区内设计 4 条正向引物和 4 条反向引物(见表 1),4 条反向引物的 5'末端均用生物素标记,根据人 $\beta$  珠蛋白基因设计引物和阳性质量控制探针,在探针的 5'端标记氨基(见表 1)。

表 1 HPV 扩增正向引物、反向引物及质控探针序列  
Tab.1 Sequences of the forward and reverse HPV primers and quality control probes

Seq. No	Name	Sequence(5'→ 3')
1	det -1A	GC(I)CATGG(I)CAAAACAATGG
2	det -1B	GC(I)CAAGG(I)CAGAAAAATGG
3	det -1C	GC(I)CATGG(I)CAGAACAATGG
4	det -1D	GC(I)CACGG(I)CAAAAGAATGG
5	det -2A	(Biotin)GAAAAATAAACTGTAAGTCACATTCCTC
6	det -2B	(Biotin)GAAAAATAAACTGTAACTCATATTCGTC
7	det -2C	(Biotin)GAAAAATAAACTGTAAGTCACATTCATC
8	det -2D	(Biotin)GAAAAATAAACTGTAAGTCAGATTCGTC
9	PC04	CAACTTCATCCACGTTCAAC
10	GH20	GAAGAGCCAAGGACAGGTAC
11	PC	(NH <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> )TTTTTTTTTTTTTCACAACCTGTTCACTAGCAACCTCAAACAG
12	QC	(NH <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> )TTTTTTTTTTTTTTGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTTC
13	HPV-58	(NH <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> )TTTTTTTTTTTTTTATATGTACCTTCCTTAGTTACTTCAGTGCA

注:1~8 为 HPV 基因组 L1 区域保守区引物,9、10 为人 $\beta$  珠蛋白基因引物,11、12 为阳性质量控制探针,13 为 HPV 探针

1.6 测试基因芯片的制备

测试质量控制探针点样浓度和引物浓度的 HPV 基因芯片设计为 3 $\times$ 1 的阵列,探针点阵列共 3 个点,包括 2 个质控点和 1 个 HPV 检测点(HPV58),如图 1 所示。阵列中的 PC(positive control)为阳性质控点,为人 $\beta$  珠蛋白基因,用于监控 HPV DNA 的提取和 PCR 扩增过程;QC(quality control)为质量控制点,用于监控 HPV 扩增引物;58 是 HPV58 探针检测点。点样前将 Biodyne C 膜剪成大小为 3 cm $\times$

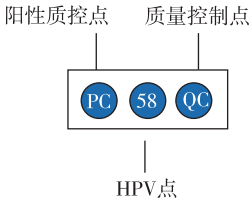


图 1 测试用 HPV 基因芯片的探针点样矩阵  
Fig.1 Layout of testing HPV genotyping arrays

1.5 cm 膜条,用 0.1 mol/L HCl 溶液处理 1 min 后于 20% EDC 溶液中激活 15 min,用 0.1 mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$  缓冲液 (pH8.4) 稀释探针浓度至 2 pmol/L,有序地固定于 Biotin C 膜上,最后用 0.1 mol/L NaOH 中和 10 min。

## 1.7 HPV L1 片段和人 $\beta$ 珠蛋白基因的扩增与杂交检测

以 HPV58 重组质粒和人  $\beta$  珠蛋白基因为模板,扩增 HPV 重组质粒和人  $\beta$  珠蛋白基因混合物,94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,54 °C 退火 40 s,72 °C 延伸 30 s,40 次循环,72 °C 延伸 7 min,扩增结束后 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,阳性产物变性后直接用于芯片杂交。转移基因芯片至 15 mL 离心管中,加入 45 °C 预热的 5 mL 杂交液 I 和 40  $\mu\text{L}$  变性 PCR 产物,45 °C 温育 30 min,用 10 mL 预热杂交液 II 于 45 °C 恒温摇床重复洗膜 2 次,每次洗膜 15 min,弃杂交液 II,加入 5 mL 辣根过氧化物酶标记亲和和霉素溶液,室温避光反应 10 min,10 mL 室温杂交液 I 重复洗膜 2 次,每次洗膜 2 min,加入 5 mL TMB 显色液避光反应 5 min;10 mL 无菌蒸馏水洗膜 3 min,室温晾干。待基因芯片干后于扫描仪上扫描,采用 Image J 软件进行灰度分析。杂交显色的蓝色点显色强度用靶点信号 Intensity Value 值 (INS 值) 表示。

## 2 结果

### 2.1 人 $\beta$ 珠蛋白与 HPV L1 片段的扩增引物的浓度比例影响基因的扩增效率

将人  $\beta$  珠蛋白扩增引物与 HPV 扩增引物分别按 1:20、1:10、1:5 和 1:4 的浓度比例混合,观察扩增样品中的 HPV58 和人  $\beta$  珠蛋白基因。检测结果如图 2 所示,人  $\beta$  珠蛋白扩增产物大小为 240 bp,HPV58 扩增产物大小为 180 bp。从电泳图均可见约为 180 bp 大小的扩增条带和 240 bp 大小的扩增条带,其大小与预计相符。180 bp 处的条带亮度由弱到强趋势为 1:4 < 1:5 < 1:10 < 1:20,250 bp 处条带也有相应减弱, $\beta$  珠蛋白扩增引物与 HPV 检测引物浓度比例为 1:10 时,两者的扩增强度一致,提示该 PCR 产物可用于进一步验证。

### 2.2 人 $\beta$ 珠蛋白与 HPV L1 片段的扩增引物浓度比例影响基因芯片杂交的显色

将人  $\beta$  珠蛋白扩增引物与 HPV 扩增引物分别按 1:20、1:10、1:5 和 1:4 的浓度比例混合配制引物混合物,然后进行扩增反应,扩增产物与制备好的

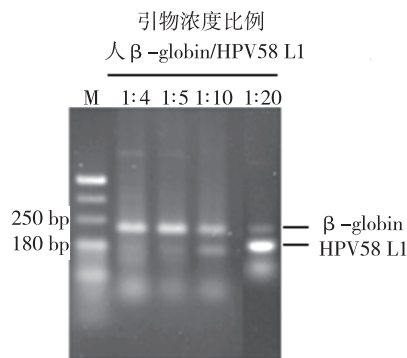


图 2 PCR 扩增引物浓度比例对 HPV58 的 L1 片段和人  $\beta$  珠蛋白基因扩增效率的影响  
Fig.2 Effect of PCR amplification primer concentration ratio on the amplification efficiency of HPV58 L1 fragment and human  $\beta$ -globin gene

HPV 基因芯片 (见图 1) 杂交。结果显示,PC 阳性质控点与 HPV58 检测点均有阳性显色 (见图 3A),PCR 产物杂交结果与电泳结果一致,提示杂交信号来源于临床样本 DNA。将图 3A 杂交图进行灰度分析,使杂交图像转化为 INS 数据进行分析 (见图 3B),结果 HPV58 检测点阳性杂交信号强度趋势为 1:4 < 1:5 < 1:10 < 1:20,当人  $\beta$  珠蛋白扩增引物与 HPV 扩增引物浓度为 1:10 时,HPV58 检测点与 PC 检测点的显色强度较为均衡,杂交信号强度达到一致,提示人  $\beta$  珠蛋白扩增引物与 HPV 扩增引物的最佳浓度比例为 1:10。

### 2.3 基因芯片质控点 (QC) 探针点样浓度优化

将 QC 探针浓度稀释成 0.1、1、10、50 及 100 pmol/L,PC 探针和 HPV58 探针浓度分别稀释成 2  $\mu\text{mol/L}$ 。将不同浓度探针按图 1 阵列进行点样,制备测试芯片用于 PCR 产物杂交显色,得到图 4A 杂交结果,通过灰度值分析将杂交图像转化为 INS 数据,得到图 4B 所示结果。结果显示,QC 检测点的阳性杂交信号强度随着 QC 探针点样浓度的增高而增强,当 QC 点样探针浓度为 50 pmol/L 时,QC 检测点、HPV58 检测点以及 PC 检测点的显色强度达到一致,提示 QC 探针的最佳点样浓度为 50 pmol/L。

## 3 讨论

基因芯片技术是目前运用广泛的技术之一,已成为当今研究的热点<sup>[16]</sup>。基因芯片技术具有微型化、集成化和自动化等特征,能实现对生物样品高



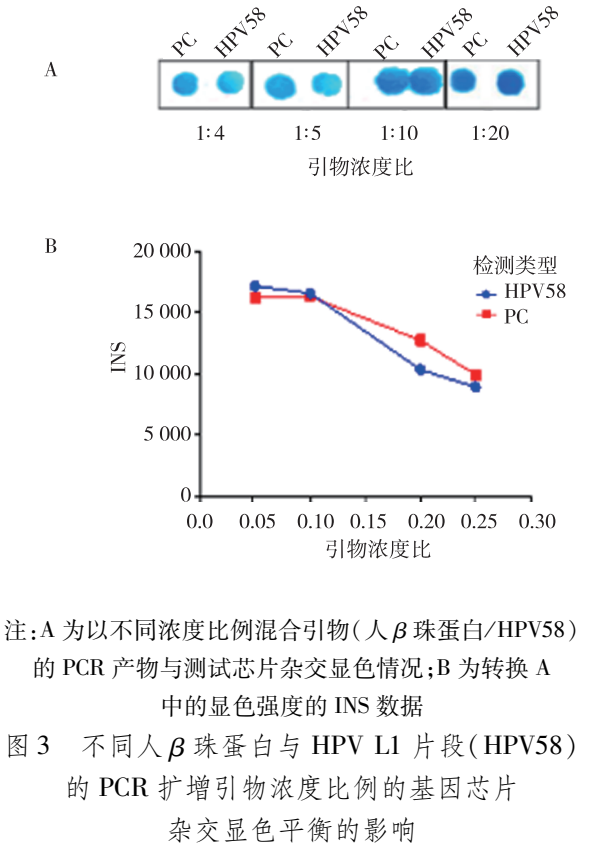
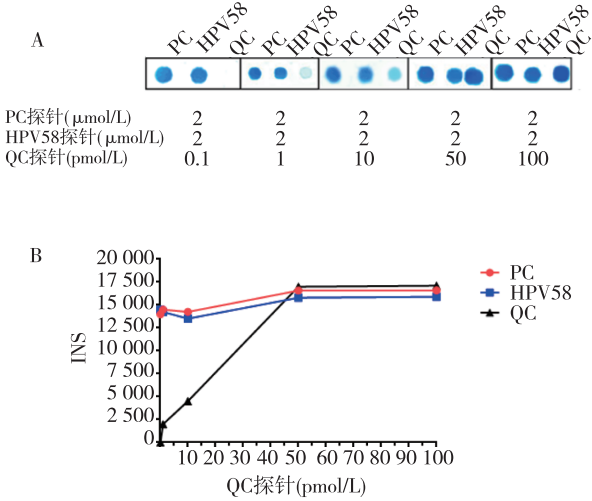


Fig. 3 Concentration ratio of PCR amplified primers between human  $\beta$ -globin and HPV L1 fragment affects the balance of gene chromatographic hybridization

通量和高灵敏度检测,是鉴定 HPV 及进行分型的有效检测手段<sup>[17]</sup>。通过 HPV 基因分型检测可以及早发现和控制感染潜伏期和中间环节,筛查出高危患者,并给予感染者防治性指导,使得宫颈癌能够早发现、早治疗,将其遏制在癌前病变阶段,有利于降低宫颈癌的发生率<sup>[18-20]</sup>,提高患者的生活质量。基因芯片技术工作原理是利用碱基互补原则,将大量寡核苷酸分子(探针)固定在支持物上,与标记的待测样品的核苷酸进行杂交,通过检测杂交信号的强弱对待测样品中的核酸进行定性或定量分析<sup>[21]</sup>。其主要操作步骤包括样本提取、基因扩增、杂交、洗膜、显色、结果判读。

在制备 HPV 基因芯片检测试剂盒的过程中,PC 点和 QC 点的设置是保障检测质量的重要措施,质控点包括反映 PCR 质量的 PC 质控点和反映杂交显色的 QC 质控点,PC 质控点主要选用检测人样品中固有的基因(本研究选用的人 $\beta$ 珠蛋白)。PC 点显色,说明基因芯片检测试剂盒的 PCR 系统没有问题,而且说明临床样本中含有需



注:A 为不同 QC 探针点样浓度的测试芯片与 HPV58 临床样品杂交显色情况;B 为转换图 A 中的显色强度的 INS 数据

图 4 基因芯片质控点(QC)探针点样浓度影响基因芯片杂交显色的平衡

Fig. 4 Probe concentration of gene chip quality control (QC) point affects the balance of gene chip hybridization

要检测的目标组织;QC 质控点是氨基和生物素标记的质控,该点显色,说明引物的生物素标记和探针的氨基标记正常,杂交和显色系统没有问题。然而,试剂盒混合引物中人 $\beta$ 珠蛋白和 HPV 引物浓度的配比,以及不同探针的点样浓度对基因芯片的杂交质量和显色效率至关重要。尤其是 QC 的探针点样浓度,因为该点的杂交较其它 HPV 检测点的杂交更容易实现,因此显色浓度往往更高,容易掩盖其它弱杂交点的显色,降低检测灵敏度,带来假阴性结果,本研究对如何优化混合引物中人 $\beta$ 珠蛋白和 HPV 引物浓度的配比、探针的点样浓度进行探索,成功地实现临床样本 HPV58 和人 $\beta$ 珠蛋白的 DNA 的扩增和探针制备,通过测试小芯片的摸索,确认 QC 探针最佳点样浓度为 50 pmol/L,PC 扩增引物与 HPV 扩增引物浓度比为 1:10。结果中可以看出 QC 探针最佳点样浓度远远小于 PC 和 HPV 探针点样浓度,其原因是 QC 质控点和 HPV 检测点之间存在竞争关系,HPV 检测产物会优先与 QC 探针结合。这种竞争关系的存在是因为 QC 质控点是监控基因芯片检测的整个过程中 HPV 扩增引物是否存在污染。由于 QC 探针序列相比其他探针序列更短,更容易与 HPV 检测产物结合,因此 QC 阳性质控点的阳性杂交信号远远强于 HPV

检测点的阳性杂交信号。因此,通过阳性质控点的全程监控可以排除检测中的假阳性和假阴性,使检测结果更可靠。

综上所述,本研究优化了人 $\beta$ 珠蛋白扩增引物与 HPV 扩增引物的浓度比例和质量控制探针的浓度,确认 QC 探针最佳点样浓度为 50 pmol/L,PC 扩增引物与 HPV 扩增引物浓度比为 1:10,此时 HPV 检测点能获得较好的检测质量。

## 4 参考文献

- [1] STANLEY M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females[J]. *Gynecologic Oncology*, 2010, 117(2 Suppl):5-10.
- [2] GONG P, WANG Z, GENG J, et al. Comparative study on detection and typing of human papillomavirus (HPV) infection with microarray using Paraffin-embedded specimens from squamous cell carcinoma and cervical precursor lesions[J]. *Journal of Nanoscience & Nanotechnology*, 2017, 17(2):990.
- [3] 李晶,刘志英,王博,等. 女性生殖道人乳头状瘤病毒感染亚型分布分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2012, 22(17):3777-3779.
- [4] 李世君,王芳. 1803 例女性人乳头瘤病毒基因分型检测及感染情况分析[J]. *内蒙古医学杂志*, 2016, 48(1):46-48.
- [5] 黄秀珍,姚心韵,陈文学,等. 人乳头瘤病毒基因型与宫颈病变的相关性分析[J]. *实验与检验医学*, 2015(1):34-36.
- [6] 魏宝丽,王海平. 北京密云地区宫颈液基薄层细胞学检测与人乳头瘤病毒检测对诊断宫颈病变的临床分析[J]. *中国现代医生*, 2018(2):54-56.
- [7] EIDE M L, DEBAQUE H. HPV detection methods and genotyping techniques in screening for cervical cancer. [J]. *Annales De Pathologie*, 2012, 32(6):15-23.
- [8] 彭秀红,毛玲芝,邓群娣,等. 人乳头瘤病毒-DNA 分型检测在年轻妇女宫颈病变诊断中的价值[J]. *中国生育健康杂志*, 2009, 20(2):92-95.
- [9] HAMPSON L, MARANGA I O, MASINDE M S, et al. A single-arm, proof-of-concept trial of Lopimmune (Lopinavir/Ritonavir) as a treatment for HPV-related pre-invasive cervical disease[J]. *Plos One*, 2016, 11(1):e0147917.
- [10] ZILS K, BIELACK S, WILHELM M, et al. Osteosarcoma of the mobile spine. [J]. *Annals of Oncology*, 2013, 24(8):2190-2195.
- [11] MASROUHA K Z, KHATTAB R, TAWIL A, et al. A preliminary investigation of Beta-hCG expression in patients with osteosarcoma [J]. *Journal of Bone & Joint Surgery British Volume*, 2012, 94(3):419-424.
- [12] HILDESHEIM A, GRAVITT P, SCHIFFMAN M H, et al. Determinants of genital human papillomavirus infection in low-income women in Washington, D. C [J]. *Sexually Transmitted Diseases*, 1993, 20(5):279-285.
- [13] RAHMAN M, SASAGAWA T, YAMADA R, et al. High prevalence of intermediate-risk human papillomavirus infection in uterine cervixes of kenyan women infected with human immunodeficiency virus [J]. *Journal of Medical Virology*, 2011, 83(11):1988-1996.
- [14] 钟泽艳,赵花,钟兴明,等. 广东省流动人口育龄妇女 HPV 感染状况调查 [J]. *中国妇幼保健*, 2013, 28(10):1635-1637.
- [15] 周琴,钱文艳,朱艳,等. 1081 例患者宫颈 HR-HPV 感染情况分析 [J]. *现代肿瘤医学*, 2018, 26(06):917-919.
- [16] 曹友洪. 一种新型基因芯片技术在人乳头瘤病毒 (HPV) 高通量基因分型检测的应用研究 [J]. *生物医学工程学进展*, 2013, 34(3):20-27.
- [17] DUDDA-SUBRAMANYA R, LUCCHESI G, KANDUC D, et al. Clinical applications of DNA microarray analysis [J]. *Journal of Experimental Therapeutics & Oncology*, 2003, 3(6):297.
- [18] RAHMAN M, SASAGAWA T, YAMADA R, et al. High prevalence of intermediate-risk human papillomavirus infection in uterine cervixes of kenyan women infected with human immunodeficiency virus [J]. *Journal of Medical Virology*, 2011, 83(11):1988-1996.
- [19] BLATT A J, KENNEDY R, LUFF R D, et al. Comparison of cervical cancer screening results among 256,648 women in multiple clinical practices [J]. *Cancer Cytopathology*, 2015, 123(5):282.
- [20] TIRUNEH F N, CHUANG K Y, NTENDA P A M, et al. Individual-level and community-level determinants of cervical cancer screening among Kenyan women: a multilevel analysis of a Nationwide survey [J]. *Bmc Womens Health*, 2017, 17(1):109.
- [21] RAHMAN M, SASAGAWA T, YAMADA R, et al. High prevalence of intermediate-risk human papillomavirus infection in uterine cervixes of kenyan women infected with human immunodeficiency virus [J]. *Journal of Medical Virology*, 2011, 83(11):1988-1996.

(2018-07-09 收稿,2018-09-05 修回)

中文编辑:周 凌;英文编辑:张文龙