

HPV 病毒检测分型芯片的研制和优化

危 敏¹, 马文丽^{1*}, 孙朝晖², 张晋芳¹, 李 凌¹, 郑文岭³

(1. 南方医科大学 基因工程研究所, 中国广东 广州 510515; 2. 广州军区广州总医院 检验科, 中国广东 广州 510010; 3. 华南基因组研究中心, 中国广东 广州 510800)

摘 要: 研制和优化寡核苷酸芯片以初步实现对多种常见 HPV (Human papillomavirus) 病毒的分型检测. 应用生物学软件对四型常见 HPV 病毒 (6、11、16、18 型) 的全基因组序列进行分析, 设计具有型特异性、熔解温度 (T_m) 相近的 ~60 mer 寡核苷酸探针, 对玻片片基进行优化处理后, 点样制备成寡核苷酸基因芯片. 将含 HPV 全长基因序列的质粒作为阳性标准品, 利用梯度限制性荧光标记技术对其进行荧光标记, 标记好的样品与芯片杂交. 结果显示 HPV 样品与相应的型特异性探针杂交有明显的荧光信号, 而与阴性对照探针和空白对照探针没有杂交信号. 通过对芯片片基处理和样品荧光标记方法的优化, 可以提高芯片检测的杂交特异性和荧光信号强度.

关键词: 人乳头瘤病毒 (HPV); 寡核苷酸芯片; 限制性荧光标记技术; 检测

中图分类号: R372

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2009)03-0240-06

Development and Optimization of Oligonucleotide Microarray for Detection and Sub-typing of Human Papillomavirus

WEI Min¹, MA Wen-li^{1*}, SUN Zhao-hui², ZHANG Jin-fang¹,
LI Ling¹, ZHENG Wen-ling³

(1. *Institute of Genetic Engineering, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China*; 2. *Clinical Laboratory, General Hospital of Guangzhou Command, Guangzhou 510515, Guangdong, China*; 3. *Southern China Genomics Research Center, Guangzhou 510800, Guangdong, China*)

Abstract: An oligonucleotide microarray assay for detection and sub-typing of human papillomavirus (HPV) was developed and optimized. Biological softwares Arraydesigner 2.0 and BLAST program were applied to analyze the whole genome of four different HPV types (6, 11, 16 and 18) to design ~ 60 mer oligonucleotide probes with high specificity and similar melting temperature (T_m). The cultured HPV samples were labeled with fluorescence dyes Cy3 using a method of restriction display PCR (RD-PCR). The labeled samples were hybridized with the oligo microarray. HPV DNA samples were hybridized specifically with multiple spots correspondingly to show positive signals and the corresponding HPV subtypes were recognized as well, while no signals were detected of all the negative and blank controls. With optimization of glass slide treatment and fluorescence labeling method, the hybrid specificity and fluorescence signal intensity of oligo microarray were heightened.

Key words: human papillomavirus; oligonucleotide microarray; RD-PCR; detection

(*Life Science Research* 2009, 13(3) 240~245)

收稿日期: 2008-10-28; 修回日期: 2009-03-27

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (D07300239); 广东省医学科学技术研究基金 (WSTJJ20071201360103197802270749) 资助

作者简介: 危敏 (1978-), 女, 江西南昌人, 南方医科大学讲师, 博士, 主要从事基因芯片研究, Tel: 020-62789385; E-mail: weimin78@126.com;

* 通讯作者: 马文丽 (1964-), 女, 江西南昌人, 南方医科大学教授, 博士生导师, 主要从事生物芯片研究, Tel: 020-62789386, Fax:

020-627893831, E-mail: wenli668@gmail.com

宫颈癌是世界女性癌症第二大杀手,高危型别的人乳头瘤病毒感染是引起宫颈癌的主要原因。HPV主要通过性传播或直接/间接接触污染物品感染人类^[1],不产生病毒血症,持续感染在 高危型 HPV 中更常见,是宫颈癌进展中的重要决定因素^[2]。同时有研究显示多型 HPV 感染发生率最高可达 39%。多重 HPV 感染可能增加宫颈疾病的严重性,大多数多重感染含有 2 种 HPV 基因型,也能检测到 3 种、4 种甚至 5 种基因型同时感染^[3,4]。HPV 感染的早期分型检测对预警宫颈细胞癌变倾向,对宫颈癌的预防、早期发现和治疗极为关键。然而,目前临床上应用的 HPV 检测方法存在假阳性率高、检测效率低、操作繁琐、成本高昂等问题,极大地限制了其推广应用。因此,开发一种更为快速、敏感、高效、准确的 HPV 检测和分型方法是目前亟待解决的问题。

新兴的基因芯片技术与传统的分子生物学技术相比,具有明显的优势,可以将多种型特异性的基因探针显微集成于极小面积的固体介质表面,具有大规模、高通量的特点,不但可以用于病毒分型,而且可以对多个型别的混合感染情况同时进行监控,在临床 HPV 感染高通量筛查中有巨大的应用潜力。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 HPV 质粒

含 HPV 全长基因的 4 种 HPV 质粒(包括 HPV6、HPV11、HPV16 和 HPV18 型)由德国海德堡癌症研究中心的 De Villier EM 教授惠赠。

1.1.2 主要试剂

pMD-18 T 载体、限制性内切酶 *Sau3A*、*Taq* 聚合酶、T4 DNA 连接酶等购自 TaKaRa 公司,通用引物(5'-GTTTGGCTGGTCTCCATC-3')、接头(SIP 5'-CCAGCCAAACCCA-3'; SIR: 5'-GGTTTGGCTGGTGTG-3')采用本室 ABI 3900 基因合成仪合成,Cy3 标记的通用引物 U (5'-Cy3-UGTTTGGCTGGTCTCCATC-3')和 Cy3 标记的 9 mer 随机引物由 Trilink 公司合成。芯片打印用 60~70 mer 寡核苷酸探针由上海博亚公司合成。

1.2 寡核苷酸探针的设计

从 GenBank 数据库中获取 HPV6、HPV11、HPV16、HPV18 基因组 DNA 全长序列,采用 Array Designer 2.0 和在线 BLAST 分析软件设计 HPV 型特异性寡核苷酸探针,要考虑的主要因素有探针特异性、 T_m 值和二级结构的稳定性(包括发夹结构和二聚体的数目),设计并经杂交试验筛选了 4 个型别 HPV 共 10 条探针(表 1)。

表 1 寡核苷酸探针编号、位置及序列组成

Table 1 HPV specific, positive and negative control oligonucleotide probes of microarray

Target	Probe No.	Region	Sequence (5'-3')	$T_m / ^\circ\text{C}$
HPV6	1	L2	CCCAACCACCCGTGGAGGCTAATGGACATATATT AATTTCTGCACCCACTATAACGTCACACCCT	89.5
	4	E2	GGCACTGGGCCCTCCTCAAAGGCACCACATAAAC ATGCCATTGTAACGTAAACATATCATAGTGAG	88.9
HPV11	1	E6	ATGCCTATAAGAACCTAAAGGTTGTGTGGCGAG ACAACCTTCCCTTTGCAGCGTGTGCCTGTGCT	90.0
	4	L1	AACAAGTTTGCATTACCTGATTCATCCCTGTTTT ACCCCACTACACAGCGTTTATGATGG	87.2
	5	L2	TGCTGAACCATTTGACCCTATCCCTGACCCTGTC CAACATTCTGTTACACAGTCTTATCTTACCTCCA	87.8
HPV16	1	E6	GCAATGTTTCAGGACCCACAGGAGCGACCCAGA AAGTTACCACAGTTATGCACAGAGCTG	90.5
	4	L1	ACATTAGGAAAAACGAAAAAGCTACACCCACCACC TCATCTACCTCTACAACCTGCTAAACGCA	87.6
	8	E2	CCTGCCACACCACTAAGTTGTGACACAGAGACT CAGTGGACAGTGTCCAATCCTCACTGATT	90.0
HPV18	4	L2	AGTGGCTAACCCCTGAGTTTCTTACACGTCATC CTCTTFAATTACATATGACAACCCGGC	87.8
	5	L2	GCCTACCAACAAGTGTGAGTGGCTAACCCCTGAG TTTCTTACACGTTCCATCCTCTTFAATTACA	87.8
Positive probes	1		GTTTGGCTGGTGTGGATCGTTTGGCTGGTGTGGA TCGTTGGCTGGTGTGGATCGTTTGG	92.1
Negative probes	1		GTATTAATTATTGCTAGCTGATCATACCACGTTA GTCGTTAAGCATGCATGCAGCTAGGA	85.7
Negative probes	2		GTAACGTTAAGAGACTACCAATTGCACATGCCCT AAGAACAGGTACAATAGAGTAGGTACA	86.2

1.3 改进的多聚左旋赖氨酸 (poly-L-lysine) 包被玻片的制备

1.3.1 硅烷化处理

将清洗后玻片放入含 1% 的缩水甘油-丙氧基三甲氧基硅烷(GOPS)的 95% 的乙醇溶液中硅化反应 30 min, 500 r/min 振荡。用乙醇溶液清洗, 烘干。

1.3.2 Poly-L-lysine 包被

将 70 mL poly-L-lysine 和 70 mL PBS 溶液置于塑料烧杯中混匀, 加入 600 mL 水, 形成包被液, 迅速将上述漂洗干净的玻片置入包被液中, 500 r/min 转速室温振荡 1 h 后, 漂洗, 烘干。

1.3.3 表面活化

将上一步 poly-L-lysine 包被的玻片放入活化液 (组成为 0.2% 的次亚苯基二异硫氰酸盐 PDITC, 10% 的无水吡啶, 89.8% 的二甲基甲酰胺) 中, 室温反应 2 h, 500 r/min 室温振荡, 进行表面活化。

1.3.4 避光保存

45 °C 真空干燥箱中烘干, 暗盒中保存备用。改进后方法制得的玻片称为 GOPS/poly-L-lysine 玻片, 简称 GOPS-PLL 玻片。

1.4 玻片探针固定效率的比较

将阳性对照探针溶于 50% DMSO, 将终浓度调整至 1 g/L, 用 Pixsys5500 基因芯片点样仪将该探针分别点样于上述未经改进的 poly-L-lysine 玻片和改进后的 GOPS-PLL 玻片上, 成 5×5 点阵。Cy3 标记的 9 mer 随机片段与芯片杂交, 用 GenePix 4100A 基因芯片扫描仪和 GenPix Pro 6.0 软件进行图象分析和荧光信号的采集, 通过杂交后的荧光强度值估测其探针固定效率。

1.5 芯片的打印

将合成后的寡核苷酸探针加 DMSO 调整浓度为 1 g/L。以通用引物序列为阳性对照, 水稻基因组 DNA 为阴性对照, 50% 二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO) 为空白对照, 用 Pixsys5500 型芯片打印仪 (购自 Cartesian 公司) 在自制的 GOPS-PLL 玻片上进行打印, 每个探针重复打印 5 个点, 形成 8×10 的点阵。打印后的玻片经再水合化, 干燥, 再用 BIO-RAD 紫外交联仪进行交联固定 (能量 65 mJ), 避光保存后备用。

1.6 样品核酸的限制性荧光标记^[5]

将质粒 DNA 1 μg 用 Sau3A 1 μL 37 °C 下酶切 4 h。酶切后所有的 DNA 片段均应具有

GATC 的黏性末端。通用接头由两条单链寡核苷酸(SIP、SIR)逐渐降温退火而成, 含有与 Sau3A

酶切位点互补的黏性末端, 用 T4 DNA 连接酶连接酶切片段与通用接头, 此连接产物作为限制性荧光标记反应的模板。根据接头和酶切位点的序列设计引物, 该引物 5' 端连接了荧光标记物 Cy3, 进行 PCR 扩增并荧光标记, 扩增产物用 3S PCR Product Purification Kit (上海申能博彩生物技术公司) 过滤纯化。

由于 Sau3A 酶切片段长度不一致, 原有的限制性荧光扩增 PCR 反应采用一个退火温度可能导致某些片段得到优势扩增, 同时某些片段扩增效率较低, 影响芯片杂交结果的判定, 因此我们对退火温度进行了梯度设置: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 58 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 7 min。

1.7 杂交与检测

取 5 μL 荧光标记好的限制性 DNA 片段, 加入等体积的 2×杂交液 (50% Formamide, 10×SSC, 0.2% SDS), 95 °C 变性 5 min, 滴加在已预杂交的芯片阵列上, 盖玻片封片, 放入杂交盒内置于 42 °C 杂交过夜。杂交结束后, 按顺序用 2×SSC + 1% SDS、0.1×SSC + 1% SDS、0.1×SSC 清洗, 空气干燥。

1.8 结果与分析

将芯片置于 Agilent-2565 B 基因芯片扫描仪中进行扫描检测, 用 Array-Pro 软件进行图象分析和荧光信号的采集, 采用信噪比 (signal-to-noise ratio, SNR) 均值作为标准进行判断, 信噪比低于 4.0 为阴性 (-), 高于 4.0 为阳性 (+)。

2 结果

2.1 限制性荧光标记技术的优化

图 1A 显示 HPV16、HPV18 质粒 DNA 样品经 Sau3A 酶切后成为长度不一的片段, 加接头后的扩增产物多集中在 250~1 000 bp 之间, 以 250~500 bp 之间的弥散条带浓度亮度最高 (图 1 B, C)。

如图 2 所示, RD-梯度 PCR 与采用单一退火温度的 RD-PCR 相比, 能够更好的扩增出全基因组酶切后的各个片段, 降低优势扩增。

2.2 片基的活化对探针固定效率的影响

分别以 poly-L-lysine 处理玻片、GOPS-PLL 玻片作为片基点样, 杂交后的结果如图 3 所示。由

图中可以看出经过优化的玻片探针形状规则, 荧光强度明显增强, 芯片杂交背景降低.

2.3 芯片杂交结果

前期杂交实验已筛选出 4 个型别 HPV 的型特异性探针共 10 条, 应用改进后的 GOPS-PLL 玻片重新打印芯片, RD-梯度 PCR 法对四型 HPV 质粒样品进行荧光标记, 芯片杂交检测结

果如图 4 所示, 可见设计的 HPV 分型探针具有高度特异性, 荧光标记后的 HPV DNA 片段能特异性地与芯片中相应的位点发生杂交产生阳性杂交信号, 而与阴性对照及空白对照无杂交信号, 可以根据杂交图像对 HPV 病毒进行分型. 同一探针 5 个位点的杂交信号强度一致性好, 同时芯片荧光背景低.

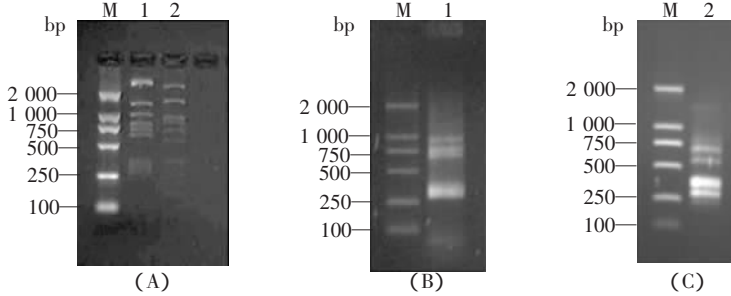


图 1 HPV16, 18 质粒 DNA 酶切、扩增电泳结果

(A) HPV16, 18 质粒 DNA 经 Sau3A 酶切后的限制性片段电泳结果; (B) HPV16 质粒 DNA 用 Cy3-标记通用引物扩增产物电泳结果; (C) HPV18 质粒 DNA 用 Cy3-标记通用引物扩增产物电泳结果.

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of digestion and amplification of HPV16 , HPV18 plasmids DNA

(A) Agarose gel electrophoresis of restricted fragments of HPV16 , HPV18 plasmids DNA digested by Sau3A ; (B) Agarose gel electrophoresis of amplified products of HPV16 plasmids DNA with Cy3-labeled universal primers ; (C) Agarose gel electrophoresis of amplified products of HPV18 plasmids DNA with Cy3-labeled universal primers ; M : DL 2000 ; 1 : HPV16 plasmid DNA ; 2 : HPV18 plasmid DNA.

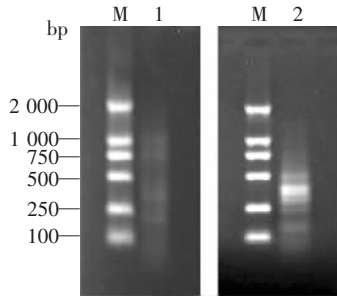


图 2 HPV11 质粒 RD-梯度 PCR 和 RD-PCR 产物的电泳图

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of amplified HPV11 fragments of RD-PCR and RD-gradient PCR

M : DL2000 ; Lane 1 : Amplified fragments of RD-PCR ; Lane 2 : Amplified fragments of RD-gradient PCR.

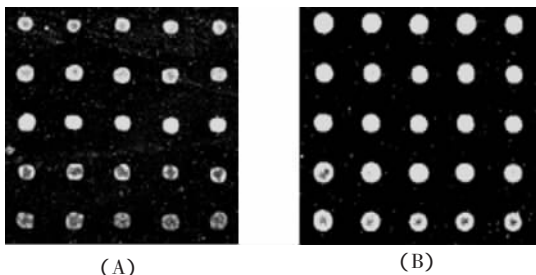


图 3 两种不同芯片探针固定效率的比较

Fig.3 Result of immobilization ratio experiment of two different slides

(A) poly-L-lysine coated slide ; (B) GOPS-PLL slide.

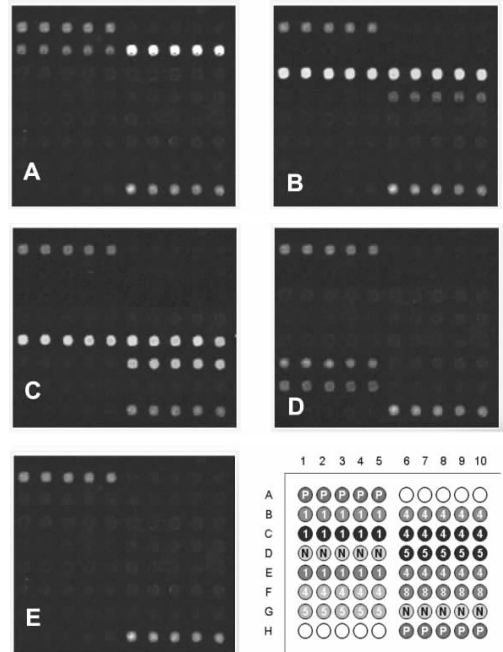


图 4 优化后的芯片杂交结果

Fig.4 Scanning results of optimized microarray hybridization

(A) Sample of HPV6 ; (B) Sample of HPV11 ; (C) Sample of HPV16 ; (D) Sample of HPV18 ; (E) Sample of human DNA.

A1 ~5, H6 ~10 : Positive controls ; A6 ~10, H1 ~5 : Blank controls ; D1 ~5, G6 ~10 : Negative controls ; B1 ~10 : HPV6 probes ; C1 ~10, D6 ~10 : HPV11 probes ; E1 ~10, F6 ~10 : HPV16 probes ; F1 ~5, G1 ~5 : HPV18 probes.

3 讨论

迄今为止, HPV 尚不能进行体外培养, 血清学检测方法主要是针对 HPV E6、E7 特异性蛋白的血清学免疫吸附试验, 诊断价值并不可靠, 因此目前对 HPV 感染的诊断主要依赖分子生物学手段对 HPV DNA 进行检测, 包括基于核酸杂交和基于 PCR 的方法. Hybrid Capture Systems 是目前唯一以商品形式提供的、得到美国 FDA 认证支持其应用于临床的检测系统, 已成为许多国家的标准方法并被广泛应用于临床研究中. 不过 HC 系统只能进行分组鉴定而不能确定具体基因型别, 两组混合探针间存在的交叉反应也影响其检测的准确性^[6]. HPV 的定性检测通常采用通用引物介导的 PCR (General Primer-mediated PCR, GP-PCR), 针对不同类型 HPV 所共有的保守序列, 采用通用引物对已知和未知的 HPV 序列扩增, 进行广谱的 HPV 检测^[7,8], 其缺点是不能对 HPV 感染进行分型. 而型特异性 PCR (Type-Specific PCR, TS-PCR) 选用不同的具有型特异性的引物, 通量有限, 往往一个样品需要进行多次 PCR, 且无法检测出新的 HPV 基因型, 所以不适于临床检测. 其他 HPV 分型检测的方法包括限制性片段长度多态性(RFLP)、斑点印迹(Dot blotting)、微量滴定酶联免疫分析(microtiter enzyme immunoassays)、线性探针反向杂交检测(reverse hybridization line probe assays)以及测序等^[9-11]. 这些方法有较高的灵敏度, 方法灵活, 可以进行多重分析, 但研究方法多为自我开发, 结果缺乏统一标准, 扩增时出现交叉污染的几率较高, 还无法直接应用于临床检测.

新兴的基因芯片技术与传统的分子生物学技术相比, 具有明显的优势, 可以将多种型特异性的基因探针显微集成于极小面积的固体介质表面, 具有大规模、高通量的特点, 不但可以用于分型, 而且可以对多个型别的混合感染情况同时进行监控, 具有重要的临床应用价值. 由于基因芯片技术在实现检测标准化和程序化上具有较大优势, 利用其多基因多位点同步检测及检测结果的计算机处理, 将会成为病毒检测中的有力工具. 国内外众多研究者都尝试利用该技术对临床 HPV 感染进行检测和分型^[12,13]. Biomedlab Company (Seoul, Korea)^[14]研发了可以同时检测 22 种 HPV 型的寡核苷酸检测芯片. 将 HPV 型特

异性寡核苷酸探针和对照探针(β 珠蛋白)固定在醛基化包被的玻片上, 目的 DNA 采用针对 HPV 各型 L1 区域改进的 Gp5/6 引物和针对 β 珠蛋白的引物进行 PCR 扩增、荧光(Cy5 或 Cy3)标记与芯片杂交检测, 可以同时检测多重感染. Klaassen 等^[15]设计了一种高密度的 DNA 检测芯片, 固定的 20 mer 寡核苷酸探针可以对 53 种粘膜型 HPV 同时进行检测分型. 其中 45 个 HPV 的型别只需单个特异探针就能鉴别, 另外八型 HPV 能够用特殊的探针组合加以鉴别. 这些研究目前主要集中在短链寡核苷酸芯片的制备上, 多采用 20 ~25 mer 的寡核苷酸探针. 关键在于选择 HPV 基因组的保守区域, 设计 PCR 引物进行扩增, 扩增产物与芯片杂交进行分型. 然而, 由于 HPV 型别之间存在的基因组差异, 难以找到涵盖所有 HPV 型别的保守区域, 不得不设计几套 PCR 引物分别扩增杂交, 检测过程比较繁琐. 此外, 短链寡核苷酸探针的长度决定了其负电性较小, 玻片的固定效率上存在技术障碍. 本研究采用 60 mer 长链寡核苷酸设计的探针, 配合本实验室发明的特殊的样品标记方法——限制性显示标记法(Restriction Display PCR, RD-PCR), 在保证芯片杂交的特异性的同时, 可增加检测灵敏度. 并且, RD 标记法可以对待测的长基因片段甚至复杂的基因组实行片段化处理, 酶切片段短而均一, 因而能使寡核苷酸探针与样品的空间位阻减少, 杂交效率大大增加.

我们在初步研究中^[16]发现部分软件设计的 60 mer 寡核苷酸探针在与样品杂交后没有检测到杂交信号, 分析原因可能有几个方面: 首先与探针的固定效率有关, 我们在以往的实验中采用多聚左旋赖氨酸包被的玻片作为载体进行寡核苷酸探针的固定, 它主要利用物理吸附的特性来吸附核酸, 存在连接效率不高、表面稳定性差的缺点. 某些探针可能在芯片杂交后的多次清洗中被洗掉, 造成荧光效率很低甚至检测不到; 其次与标记方法有关, 理论上样品 DNA 限制性酶切片段长度均一, 但实际上由于基因组 DNA 酶切位点随机分布造成酶切片段长度不同, 与接头结合效率以及扩增的效率都存在差异, 某些片段较易得到优势扩增; 此外, 寡核苷酸探针与样品杂交存在的空间位阻对杂交效率至关重要, 因此, 必须根据多次杂交结果筛选杂交效果好, 特异性强的探针, 同时优化杂交条件. 在本研究中我们

针对玻片片基的处理和样品荧光标记方法进行了优化。

为了克服探针固定效率较低的问题,我们采用了本室自行研制的多聚赖氨酸偶联的优化方法,在原有 poly-L-lysine 表面处理基础上,在玻片表面偶联上多聚赖氨酸聚合物分子层。这些聚合物涂层以共价键连接在玻片表面,经 PDITC 交联剂活化后,能将寡核苷酸以共价键结合的形式固定在玻片上。同时针对 RD-PCR 标记中的优势扩增,我们将单一退火温度改为 55、58、60 °C 3 个梯度退火温度,更适合不同长度的酶切片度与通用引物的退火,从而降低优势扩增。最后采用 GOPS-PLL 玻片重新打印筛选出的型特异性 HPV 探针, RD-梯度 PCR 方法标记样品进行杂交,结果显示阳性对照探针都有杂交信号,空白对照和阴性对照探针基本没有荧光信号。而四型 HPV 样品都和探针有特异性的杂交,且荧光信号强度较前有了显著增强。说明筛选出的探针型特异性好,改进后的 GOPS-PLL 玻片探针固定效率提高,芯片整体杂交效率要高于常规 poly-L-lysine 法包被的玻片。

参考文献 (References):

- [1] RODEN R B, LOWY D R, SCHILLER J T. Papillomavirus is resistant to dessication[J]. *J Infect Dis*, 1997, 176(4): 1076-1079.
- [2] ADAM E, BERKOVA Z, DAXNEROVA Z, *et al.* Papillomavirus detection: demographic and behavioral characteristics influencing the identification of cervical disease [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2000, 182(2): 257-264.
- [3] SNIJDERS P J, VAN DEN BRULE A J, JACOBS M V, *et al.* HPV DNA detection and typing in cervical scrapes [J]. *Methods Mol Med*, 2005, 119: 101-114.
- [4] QUINT W G, SCHPLTE G, VAN DOORN L J, *et al.* Comparative analysis of human papillomavirus infections in cervical scrapes and biopsy specimens by general SPF(10) PCR and HPV genotyping [J]. *J Pathol*, 2001, 194(1): 51-58.
- [5] LI Ling, MA Wen-li, ZHU Ji, *et al.* A modified restriction display PCR method in sample-labelling of DNA microarray [J]. *J Virol Methods*, 2003, 114(1): 71-75.
- [6] CASTLE P E, SCHIFFMAN M, BURK R D, *et al.* Restricted cross-reactivity of hybrid capture 2 with nononcogenic human papillomavirus types [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2002, 11(11): 1394-1399.
- [7] GRAVITT P E, PEYTON C L, ALESSI T Q, *et al.* Improved amplification of genital human papillomaviruses [J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(1): 357-361.
- [8] COUTLEE F, GRAVITT P, KORNEGAY J, *et al.* Use of PGM1 primers in L1 consensus PCR improves detection of human papillomavirus DNA in genital samples [J]. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(3): 902-907.
- [9] VAN DEB BRULE A J, POL R, FRANSEN-DAALMEIJER N, *et al.* GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes [J]. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(3): 779-787.
- [10] VERNON S D, UNGER E R, WILLIAMS D. Comparison of human papillomavirus detection and typing by cycle sequencing, line blotting, and hybrid capture [J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(2): 651-655.
- [11] ZERBINI M, VENTUROLI S, CRICCA M, *et al.* Distribution and viral load of type specific HPV's in different cervical lesions as detected by PCR-ELISA [J]. *J Clin Pathol*, 2001, 54(5): 377-380.
- [12] LIU Chui-hua, MA Wen-li, SHI Rong, *et al.* Possibility of using DNA chip technology for diagnosis of human papillomavirus [J]. *J Biochem Mol Biol*, 2003, 36(4): 349-353.
- [13] DELRIO-LAFRENIERE S A, BROWNING M K, MCGLENNEN R C. Low-density addressable array for the detection and typing of the human papillomavirus [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2004, 48(1): 23-31.
- [14] CHO N H, AN H J, JEONG J K, *et al.* Genotyping of 22 human papillomavirus types by DNA chip in Korean women: comparison with cytologic diagnosis [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2003, 188(1): 56-62.
- [15] KLAASSEN C H, PRINSEN C F, DE VALK H A, *et al.* DNA microarray format for detection and subtyping of human papillomavirus [J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(5): 2152-2160.
- [16] 危敏, 马文丽, 张宝, 等. 长链寡核苷酸芯片用于人乳头瘤病毒分型检测的初步研究 [J]. *解放军医学杂志 (WEI Min, MA Wen-li, ZHANG Bao, et al. Preparation of long oligonucleotide microarray for detection and subtyping of human papillomavirus [J]. Med J Chin PLA)*, 2006, 31(2): 120-123.