

基于R6G-ddATP/SNaPShot-凝胶荧光法的高危型人乳头瘤病毒基因型微量检测

冯传芮¹, 杨森², 王悦琦², 刘莹珂³, 陈修远², 曾树树¹, 罗亚雄¹, 高秀峰¹△

1. 四川大学华西基础医学与法医学院 生物化学与分子生物学教研室(成都 610041);

2. 四川大学华西基础医学与法医学院(成都 610041); 3. 四川大学华西口腔医学院(成都 610041)

【摘要】 目的 使用R6G-ddATP作为双脱氧荧光底物建立单碱基末端延伸(SNaPShot)-凝胶荧光法快速检测3种高危型人乳头瘤病毒(high risk human papillomavirus, HR-HPV)(HPV18、HPV33、HPV35)基因型。方法 使用HPV质控品作为样本, R6G-ddATP双脱氧荧光试剂作为底物, 首先利用通用引物对HPV进行扩增, 得到第一轮扩增产物, 经纯化后作为后续SNaPShot反应的模板; 然后利用特异性的一步延伸引物进行SNaPShot反应, 生成带有R6G荧光标记的DNA延伸产物; 产物经过琼脂糖凝胶电泳, 在凝胶成像仪下观察电泳结果, 通过不同的一步延伸引物对HPV进行分型。每个样本均重复检测3次, 并与DNA测序结果进行比较。结果 优选的SNaPShot反应的退火温度为55℃; 仅需3 h即可对HPV进行分型; 在该最适条件下使用R6G-ddATP/SNaPShot-凝胶荧光法检测3种HPV基因型, 检测结果与测序结果一致。结论 成功建立了3种HR-HPV基因型的微量检测方法——R6G-ddATP/SNaPShot-凝胶荧光法, 可用于HPV基因型的快速检测。

【关键词】 HR-HPV R6G-ddATP SNaPShot技术 凝胶荧光法

Microassay of High-Risk Human Papillomavirus Genotype Based on R6G-ddATP/SNaPshot-Gel Fluorescence

Method FENG Chuan-rui¹, YANG Sen², WANG Yue-qi², LIU Ying-ke³, CHEN Xiu-yuan², ZENG Shu-shu¹, LUO Ya-xiong¹, GAO Xiu-feng¹△. 1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, West China School of Basic Medical Sciences and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. West China School of Basic Medical Sciences and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: xiufengg@163.com

【Abstract】 Objective R6G-ddATP was used as a dideoxy fluorescence substrate to establish the single base end extension (SNaPShot)-gel fluorescence method for the rapid detection of the genotypes of three high-risk human papillomaviruses (HR-HPV) (HPV18, HPV33 and HPV35) genotypes. **Methods** HPV quality control products were used as samples, and R6G-ddATP dideoxy fluorescence reagent was used as substrate. Firstly, HPV was amplified by using universal primers to obtain the first round of amplified products, which were purified and used as templates for subsequent SNaPShot reactions. Then, specific one-step extension primers were used to perform SNaPShot reaction to generate R6G-fluorescence-labeled DNA extension products. The product was subjected to agarose gel electrophoresis, the results of which were observed under a Gel Imager, and the HPV genotyping was done with different one-step extension primers. Each sample was tested three times and the results were compared with DNA sequencing results. **Results** The preferred annealing temperature for SNaPShot reaction is 55 °C. Three HPV genotypes were examined by R6G-ddATP/SNaPShot gel fluorescence assay under optimal conditions, and the results were consistent with DNA sequencing results. **Conclusion** The R6G-ddATP/SNaPShot-gel fluorescence method for the micro-detection methods of three HR-HPV genotypes was successfully established and can be used for rapid detection of HPV genotypes.

【Key words】 HR-HPV R6G-ddATP SNaPShot technology Gel fluorescence method

人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)是一种双链DNA病毒, 根据其致病能力可分为低危型HPV(low-risk human papillomavirus, LR-HPV)及高危型HPV(high-risk human papillomavirus, HR-HPV)^[1]。HR-HPV的感染与宫颈癌^[2]、肺癌^[3]、口咽癌^[4]、食管癌^[5-6]等恶性肿瘤的发生有关, 其中HPV16、18、33、35等亚型感染是常

见的类型^[7]。不同的HR-HPV亚型的致癌性不同, 多种亚型感染的疾病的发病率及复发率高于单型感染^[8-9]; 此外, HR-HPV亚型的感染还具有地域差异性^[10]。因此, HR-HPV的分型检测对高风险患者的筛选、疫苗开发及指导患者预后等方面均有重大的意义^[11-12]。

细胞形态学方法^[13]和免疫学方法^[14]可以用于HPV检测, 然而这两种方法只能定性有无HPV的感染, 并不能对感染的HPV进行分型, 限制了临床中的应用。此外, 基因

△ 通信作者, E-mail: xiufengg@163.com

分子生物学方法具有灵敏度高及特异性好等优点, 已成为临床检测HPV基因型的主要方法, 如二代杂交捕获法、单管多重PCR毛细电泳法、*TaqMan*荧光探针法^[15]、限制性片段长度多态性分析^[16]、基因芯片及末端延伸-荧光偏振技术等。但是上述方法需要昂贵的检测仪器和试剂, 导致测试成本高, 不适用大规模的临床筛查。在前期研究中, 本课题组基于单碱基末端延伸(SNaPShot)和荧光毛细分析法(FCA), 采用两种双脱氧荧光试剂(R6G-ddATP、cy5-ddCTP), 建立了一种新的检测乙醛脱氢酶2(ALDH2)基因型的SNaPShot-FCA法^[17]。为了进一步降低检测成本, 本研究使用一种荧光试剂(R6G-ddATP), 采用凝胶成像, 建立了一种能快速检测3种HR-HPV(HPV18、HPV33、HPV35)基因型的新型的SNaPShot-凝胶荧光法。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

主要仪器: PCR仪及凝胶成像仪为美国Bio-Rad公司产品。主要试剂: HPV质控品购自广州创仑生物制品有限公司; 引物由北京擎科新业生物技术有限公司合成;

R6G-ddATP购自美国Perkin Elmer; *Taq*酶、PCR mix购自南京诺唯赞生物科技有限公司; 核酸外切酶*Exo I*购自宝日生物技术(北京)有限公司; 虾碱性磷酸酶(SAP)购自美国NEW ENGLAND Biolabs公司。

1.2 试剂配制

R6G-ddATP工作液的配置: 在EP管中, 加入1 μL 100 $\mu\text{mol/L}$ R6G-ddATP, 用ddH₂O将上述溶液稀释至20 μL , 得到5 $\mu\text{mol/L}$ 的工作液。

1.3 实验方法

1.3.1 检测原理 SNaPShot是基于荧光标记单碱基延伸原理的分型技术。反应原理如图1A所示, 在含有R6G-ddATP荧光底物、*Taq* DNA酶、紧邻检测位点5'端的延伸引物、PCR缓冲液的体系中, 通过单碱基末端延伸反应, 引物与模板完全结合延伸一个碱基后终止反应, 生成3'末端带有荧光标记的DNA产物。

凝胶荧光法主要将SNaPShot反应生成的产物在琼脂糖凝胶(不含核酸染料)电泳中进行分离, 仅带有荧光标记的延伸产物在凝胶成像仪中有可见的条带; 通过样本组及对照组条带的对比可以直接分析样本感染的基因型(原理如图1B所示)。

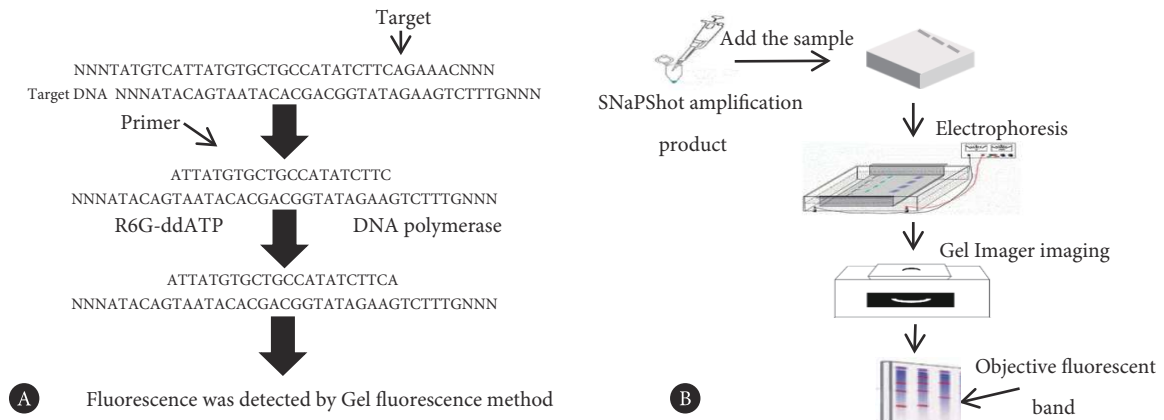


图1 反应原理及测定过程示意图

Fig 1 Schematic diagram of the reaction principle and measurement process

A: SNaPShot technology reaction principle; B: Gel fluorescence method measurement process.

1.3.2 引物设计 使用HPV通用引物PGMY09/11引物组^[18], 可同时扩增不同HPV基因组L1区域的目的DNA片段; 针对不同的HPV扩增后的DNA片段的碱基序列, 分别设计特异性的一步延伸引物(一型一引物), 使每条延伸引物与模板结合后3'末端延伸碱基均为A, 延伸引物具体序列如表1所示。引物^[19-20]使用Primer5软件设计, 经NCBI Blast比对, 其特异性良好。

1.3.3 SNaPShot反应

1.3.3.1 L1区目的基因片段扩增 PCR反应总体积为25 μL ,

其中PCR mix 12.5 μL , 上、下游引物各1 μL (10 $\mu\text{mol/L}$), 模板1 μL , ddH₂O 9.5 μL 。PCR反应条件为95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性15 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸30 s, 共

表1 SNaPShot一步延伸引物序列

Table 1 SNaPShot extension primer sequence

Genotype	Primer name	Primer sequence (5'-3')
HPV18	18P	TGCTTCTACACAGTCTCCTGTACCTGGGCA
HPV33	33P	TTTATGCACACAAGTAACTAGTGACAGTAC
HPV35	35P	ATCATCTTTAGGTTTTGGTGC

35个循环;72℃再延伸5 min。PCR结束后,取15 μL PCR产物加入5 U SAP、2 U *Exo I*,于37℃反应1 h后,75℃灭活15 min,去除PCR产物中多余的引物及dNTPs。

1.3.3.2 SNaPShot反应退火温度优选 由于R6G-ddATP荧光试剂价格昂贵,故在优选过程中采用dNTPs代替R6G-ddATP试剂作为底物,在50~57℃的温度范围内对SNaPshot反应的退火温度进行优选。反应总体积为10 μL,其中PCR mix 5 μL,一步延伸引物1 μL(10 μmol/L),模板1 μL, ddH₂O 3 μL。反应条件中,除退火温度外,其余与1.3.3.1相同。PCR反应结束后,通过电泳对产物进行鉴定。

1.3.3.3 单碱基延伸 每个样本均分2管进行反应,分别为该基因型相对应的样品组及阴性对照组。样品组PCR反应总体积为10 μL,其中R6G-ddATP 1 μL, *Taq*酶0.3 μL, 10×*Taq* buffer(Mg²⁺ plus)1 μL,相应单型延伸引物1 μL,纯化后PCR产物2 μL, ddH₂O 4.7 μL;对照组PCR反应总体积为10 μL, R6G-ddATP 1 μL, *Taq*酶0.3 μL, 10×*Taq* buffer(Mg²⁺ plus)1 μL,相应延伸引物1 μL, ddH₂O 6.7 μL。以1.3.3.2中优选的条件进行SNaPShot反应,具体反应条件为96℃预变性1 min;96℃变性10 s,55℃退火5 s,60℃延伸30 s,30个循环。反应结束后,进行琼脂糖凝胶电泳,并使用凝胶成像仪观察电泳结果,对基因型进行分析。

1.3.3.4 对照组荧光杂带的检测 在使用过程中,本课题组发现凝胶中阴性对照组也有荧光条带,由于R6G-ddATP是一种荧光试剂,紫外激发下也可能产生荧光条带,因此我们怀疑该荧光条带出现,可能是PCR过程中因操作导致的污染,或者为R6G-ddATP荧光底物自身形成。为了考察阴性对照组出现荧光杂带的原因,本课题组配置了两种含有该荧光底物的不同体系(配置体系如表2所示),经SNaPShot反应后进行琼脂糖凝胶电泳并在凝胶成像中观察结果。

表 2 荧光杂带检测体系的配置

Table 2 Configuration of fluorescence heteroband detection system

Reagent	A	B
Extension primer/μL	1	-
10× <i>Taq</i> buffer (Mg ²⁺ plus)/μL	1	-
<i>Taq</i> DNA polymerase/μL	0.3	-
R6G-ddATP/μL	1	1
ddH ₂ O/μL	6.7	9
Total volume/μL	10	10

A: Control group; B: R6G-ddATP group.

1.3.4 凝胶荧光法分析样本感染的HR-HPV亚型 使用不含核酸染料的3%琼脂糖凝胶对SNaPShot产物进行电

泳,上样量均为10 μL;电泳结束后使用凝胶成像仪观察电泳结果,通过样本及对照组荧光条带的对比,分析样本的感染亚型。

1.3.5 DNA测序 DNA测序是检验所有检测方法准确性的一个金标准。为了确认R6G-ddATP/SNaPShot-凝胶荧光法检测的准确性,将3例样本(HPV质控品)的基因组L1区域扩增DNA片段送往测序公司进行测序,并将测序结果与R6G-ddATP/SNaPShot-凝胶荧光法的检测结果进行比较,检验该方法的准确性。

2 结果

2.1 L1区目的基因片段扩增结果

PCR反应结束后使用琼脂糖凝胶电泳对PCR产物进行鉴定。电泳结果如图2所示,1~3泳道上均只有相对分子质量约为450 bp的单一明亮的目的条带,说明3种HR-HPV基因组扩增产物均可作为后续反应的模板。

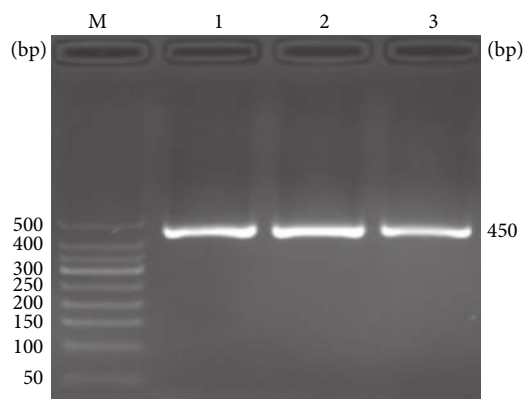


图 2 PCR产物电泳检测

Fig 2 Detection of PCR amplified products

M: 50 bp DNA ladder; 1: HPV18; 2: HPV33; 3: HPV35.

2.2 SNaPShot反应退火温度优选结果

电泳结果如图3所示。在图3A中,除2泳道外,其余泳道中均在360 bp位置处有产物条带,其中4泳道(55.7℃)中的产物条带最为明亮,故选55℃作为HPV18基因型的退火温度;图3B与图3C的1~5泳道(50~57℃)均在370 bp位置处有较明亮的产物条带,故50~57℃均可作为HPV33及HPV35基因型SNaPShot反应的退火温度;综合考虑后选择55℃作为3种HPV基因型SNaPShot反应的退火温度。

2.3 阴性对照组荧光杂带的鉴定结果

本课题组将阴性对照组及R6G-ddATP荧光试剂经PCR循环后的产物进行电泳,考察了阴性对照中出现荧光杂带的来源,结果如图4所示,A、B泳道中均有两条相同的荧光条带(条带1、条带2);由此可得出阴性对照组出

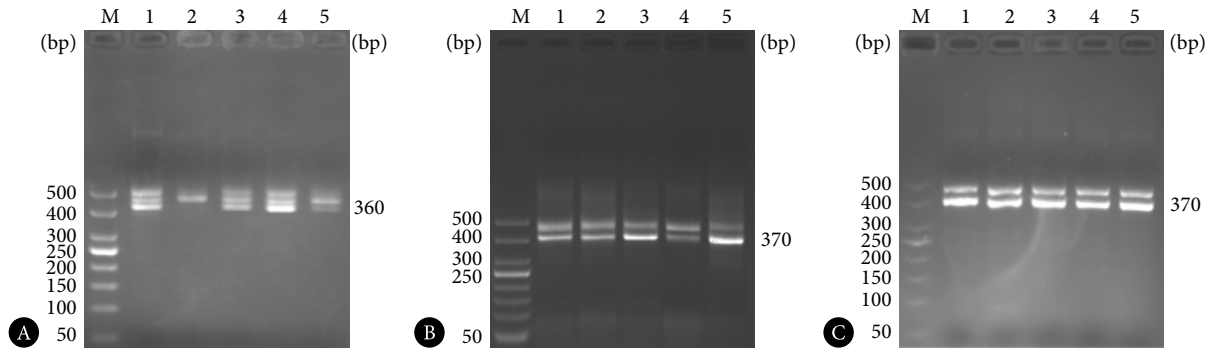


图 3 SNaPShot反应退火温度优选结果

Fig 3 SNaPShot reaction annealing temperature optimization results

M: 50 bp DNA Ladder; 1: 50 °C; 2: 52.6 °C; 3: 53.5 °C; 4: 55.7 °C; 5: 57 °C; A: HPV18; B: HPV33; C: HPV35.

现的荧光杂带实为R6G-ddATP荧光试剂自身形成的条带,并非PCR反应中出现污染所导致。

2.4 R6G-ddATP/SNaPShot-凝胶荧光法基因分型结果

根据3种不同HR-HPV(HPV18、HPV33、HPV35)基因型样本组及阴性对照组电泳凝胶图,检测结果如图5所示,样本组有3条荧光条带(条带1、条带2、条带3),对照组有两条荧光条带,条带1和条带2为荧光底物自身形成的条带,条带3则为SNaPShot的产物条带。HPV18基因型、HPV33基因型和HPV35基因型均仅有样本组在条带3的位置有荧光条带。使用凝胶荧光法对每一个样本均重复检测3次,检测结果均相同,证实R6G-ddATP/SNaPShot-凝胶荧光法可用于对HPV基因型的分型检测。

2.5 R6G-ddATP/SNaPShot-凝胶荧光法方法的准确性验证

3种HPV基因型(HPV18、HPV33、HPV35)的测序结果如图5所示,由于HPV35的延伸引物为反向引物,故延

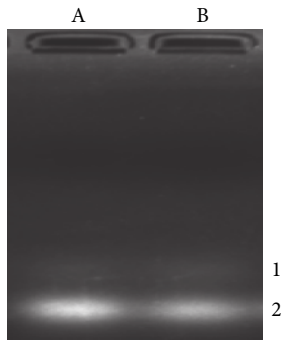


图 4 阴性对照组荧光杂带的鉴定

Fig 4 Identification of fluorescent heteroband in the control group

A: Control group; B: R6G-ddATP; 1, 2: Fluorescent heteroband.

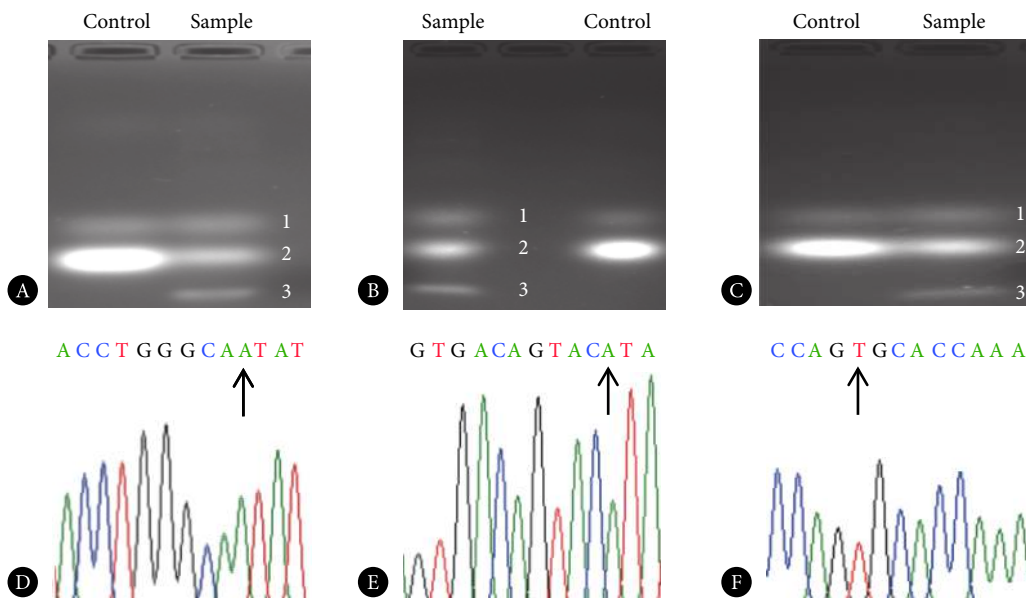


图 5 SNaPShot-凝胶荧光法基因分型 (A、B、C) 和测序结果 (D、E、F)

Fig 5 SNaPShot-gel fluorescence method basis typing (A, B, C) and sequencing results (D, E, F)

A, D: HPV18; B, E: HPV33; C, F: HPV35; 1, 2: Fluorescent heteroband; 3: Product band. Arrow shows SNaPShot-gel fluorescence method detection site.

伸引物与模板链的结合位点为碱基T,末端延伸碱基为A。证实本研究使用R6G-ddATP/SNaPShot-凝胶荧光法检测3种不同的HPV基因型结果与测序结果一致。

3 讨论

目前基因分子检测方法主要分为两类:核酸杂交技术以及以聚合酶链式反应为基础的检测方法。但是由于核酸杂交技术对样本的要求较高,所需样本DNA浓度也较高,导致该方法灵敏度较低、易出现假阴性结果^[21];因此,以聚合酶链式反应为基础的HPV检测方法更为适用。

基于PCR的HPV检测方法包括单管多重PCR毛细电泳法、TaqMan荧光探针法、基因芯片法、TDI-FP技术等。单管多重PCR毛细电泳法为海尔施基因科技开发的一种HPV检测试剂盒,利用单管多重PCR扩增、毛细管电泳及新一代片段分析(advanced fragment analysis, AFA)等技术检测HPV基因型并通过软件判读结果;该方法操作简便,判读结果客观。但是该方法需要使用毛细管电泳对产物进行分离,对电泳条件要求较高。基因芯片是一种快速、高通量的HPV基因型检测方法^[22],该方法将大量的寡核苷酸探针固定在固体载体上,制作DNA探针微阵列,收集探针与标记的样本杂交所产生的荧光信号并利用软件分析结果,但是该方法制作成本较高,操作较为复杂,所需样本量较多。TDI-FP技术^[23]是单碱基延伸法与荧光偏振技术相结合的一种技术,可快速高效的检测8种HPV的基因型;但是该方法需要单独的检测仪器,成本较高。

SNaPShot技术是一种适用于检测中高通量的单核苷酸多态性(SNP)的基于荧光标记的单碱基延伸技术^[24];除了可检测SNP位点外,也可检测病毒亚型基因组的特异性位点,适用于病毒基因的分型。传统的SNaPShot技术在生成3'末端带有不同荧光标记的DNA产物后还需要进行毛细管电泳并通过特有的软件对测序结果进行分型。虽然在同一根毛细管内电泳保证产物的迁移率不受泳道差异的影响,但是该方法对设备、电泳条件要求极为苛刻,成本较高并不适用于临床大规模筛查。

为了弥补上述不足,本研究基于SNaPShot技术,利用凝胶电泳代替毛细管电泳,建立了一种新型的HPV基因型的微量检测方法,即R6G-ddATP/SNaPShot-凝胶荧光法。该方法首先利用通用引物对HPV进行扩增,得到第一轮扩增产物,经纯化后作为后续SNaPShot反应的模板;然后利用特异性的一步延伸引物进行SNaPShot反应,生成带有R6G荧光标记的延伸产物,在琼脂糖凝胶(不含核

酸染料)中进行电泳,对产物及游离的双脱氧荧光底物进行分离,最后在凝胶成像仪中成像,观察并分析结果,有荧光条带为阳性,否则为阴性,通过不同的一步延伸引物可对HPV进行分型。该检测方法的特点:样品用量少,只需1 μ L模板便足以进行HPV基因型的检测;反应中只含有一种荧光标记的双脱氧碱基(R6G-ddATP),相比cy5-ddCTP而言,R6G-ddATP的价格更低且消耗量更少,每个HPV基因型仅需5 μ mol/L R6G-ddATP试剂1 μ L,进一步降低了检测的成本;结果检测使用简单的琼脂糖凝胶电泳代替了繁琐的毛细管电泳,操作时间更短(仅需3 h即可对HPV进行分型)、设备要求低;因此相比传统的SNaPShot技术,该方法检测时间短、操作简便、设备要求低、适用范围更广。R6G-ddATP/SNaPShot-凝胶荧光法目前存在的问题是荧光标记双脱氧底物的价格较昂贵,但是随着方法的应用与推广,试剂的价格会得到改善,可以使该方法更适合大规模的临床应用。

本研究利用R6G-ddATP/SNaPShot-凝胶荧光法成功的检测了3例样本,其中HPV18基因型1例,HPV33基因型1例,HPV35基因型1例;检测结果与测序结果一致,证明该方法具有很好的准确性。根据此方法可以进一步对其他各型进行检测。

综上,本研究成功建立了一种适用于HPV基因型微量检测的方法即R6G-ddATP/SNaPShot-凝胶荧光法,该方法操作简便、设备要求低、准确性好、灵敏度高,具有良好的应用前景。

参 考 文 献

- [1] HARDENA M E, MUNGER K. Human papillomavirus molecular biology. *Mutat Res Rev Mutat Res*, 2017, 772: 3-12.
- [2] SCHIFFMAN M, HYUN N, RAINE-BENNETT T R, et al. A cohort study of cervical screening using partial HPV typing and cytology triage. *Int J Cancer*, 2016, 139(11): 2606-2615.
- [3] DE OLIVEIRA T H A, DO AMARAL C M, DE FRANÇA S A O MARCOS B, et al. Presence and activity of HPV in primary lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2018, 144(12): 2367-2376.
- [4] TABEMA M, MENA M, PAVON M A, et al. Human papillomavirus-related oropharyngeal cancer. *Ann Oncol*, 2017, 28(10): 2386-2398.
- [5] GUO L W, ZHANG S K, LIU S Z, et al. Human papillomavirus type-18 prevalence in oesophageal cancer in the Chinese population: a meta-analysis. *Epidemiol Infect*, 2016, 144(3): 469-477.
- [6] BUCCHI D, STRACCI F, BUONORA N, et al. Human papillomavirus and gastrointestinal cancer: a review. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(33): 7415-7430.
- [7] MUNOZ N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol*, 2000, 19(1): 1-5.

- [8] KLIFF M, SORB B, MORDHORST L B, *et al.* Findings of multiple HPV genotypes in cervical carcinoma are associated with poor cancer-specific survival in a Swedish cohort of cervical cancer primarily treated with radiotherapy. *Oncotarget*, 2018, 9(27): 18786–18796.
- [9] BAANDRUP L, THOMSEN L T, OLESEN T B, *et al.* The prevalence of human papillomavirus in colorectal adenomas and adenocarcinomas: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer*, 2014, 50(8): 1446–1461.
- [10] LUDMIR E B, STEPHENS S J, PALTA M, *et al.* Human papillomavirus tumor infection in esophageal squamous cell carcinoma. *J Gastrointest Oncol*, 2015, 6(3): 287–295.
- [11] AZ-ZULUETA M, ALVAREZ-PAREDE L, RODRIGUEZ DIAZ J C, *et al.* Prevalence of high-risk HPV genotypes, categorised by their quadrivalent and ninevalent HPV vaccination coverage, and the genotype association with high-grade lesions. *BMC Cancer*, 2018, 112(18): 2–9.
- [12] NI G Y, HUANG K S, YI L, *et al.* Human papillomavirus infection among head and neck squamous cell carcinomas in southern China. *PLoS One*, 2019, 14(9): e0221045[2020-05-11]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221045>.
- [13] CUZICK J, CLAVEL C, PETRY K, *et al.* Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer*, 2006, 119(5): 1095–1101.
- [14] 王薇, 马丁. 不同人乳头瘤病毒检测方法的临床应用价值. *实用妇产科杂志*, 2013, 29(3): 165–167.
- [15] LINDH M, GORANDER S, ANDRESSON E, *et al.* Real-time Taqman PCR targeting 14 human papilloma virus types. *J Clin Virol*, 2007, 40(4): 321–324.
- [16] MAVER P J, POLIJAK M, SEME K, *et al.* Detection and typing of low-risk human papillomavirus genotypes HPV 6, HPV11, HPV 42, HPV 43 and HPV 44 by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. *J Virol Methods*, 2010, 169(1): 215–218.
- [17] 曾树树, 高秀峰, 张义, 等. 基于SNaPShot-FCA的乙酰脱氢酶2基因型微量检测. *四川大学学报(医学版)*, 2019, 50(5): 737–742.
- [18] QU W M, JIANG G, CRUZ Y, *et al.* PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP51/GP61 primer systems. *J Clin Microbiol*, 1997, 35(6): 1304–1310.
- [19] GRACITT P E, L PEYTON C, J APPLE R, *et al.* Genotyping of 27 human papillomavirus types by using L1 consensus PCR products by a single-hybridization, reverse line blot detection method. *J Clin Microbiol*, 1998, 36(10): 3020–3027.
- [20] 党倩丽, 超陈, 篷杜, 等. 人乳头瘤病毒基因分型液态芯片构建中的影响因素. *第三军医大学学报*, 2009, 31(1): 89–91.
- [21] WANG Y M, LIU Y, DING Y P, *et al.* A PCR-based microwell-plate hybrid capture assay for high-risk human papillomavirus. *Arch Virol*, 2014, 159(12): 3365–3370.
- [22] AN H, SONG K S, NIMSE S B, *et al.* HPV 9G DNA chip: 100% clinical sensitivity and specificity. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(3): 562–568.
- [23] 张菊, 高艳娥, 闫小君, 等. 高通量人乳头瘤病毒分型基因诊断方法的研究. *中华检验医学杂志*, 2003, 26(3): 16–18.
- [24] DANIEL R, SANTOS C, PHILLIPS C, *et al.* A SNaPshot of next generation sequencing for forensic SNP analysis. *Forensic Sci Int Genet*, 2015, 14: 50–60.

(2020-01-16收稿, 2020-05-11修回)

编辑 余琳