



HIV-1 耐药基因型检测试剂盒(PCR-测序法)

产品组成:

组分	MT424-01 (100 次)	数量
DR-RT mix (Colorless)	1200 μL/管	1
E mix	100 μL/管	1
DR-RT 引物	200 μL/管	1
DR-PCR Mix (Green)	1000 μL/管	5
DR-PCR 引物	100 μL/管	1
H ₂ O(RNase free)	1000 μL/管	1
阳性质粒对照品	100 μL/管	1

储存条件: -20°C保存, 避免反复冻融。

产品介绍:

本试剂盒适用于定性检测 HIV-1 RNA *pol* 区基因 (蛋白酶区 1-99 和逆转录酶区 1-273 氨基酸) 的基因突变, 评估由突变引起的病毒耐药性。检测区域覆盖临床常见耐药突变位点, 支持蛋白酶抑制剂 (Protease Inhibitors), 核苷类逆转录酶抑制剂 (Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors, NRTIs) 和非核苷类逆转录酶抑制剂 (Non-nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors, NNRTIs) 等三类药物的耐药性分析。

检测原理:

基于 HIV-1 基因蛋白酶区与逆转录酶区的特异性引物, 通过以下步骤完成检测:

1. RT-PCR 与巢式 PCR 扩增: 两轮扩增获取目标基因片段。
2. Sanger 测序: 对获得的目标基因片段进行测序。
3. 耐药性分析: 将测序结果与斯坦福大学 HIV 耐药数据库 (<https://hivdb.stanford.edu/hivdb/by-patterns/>) 比对, 判定毒株耐药状态。

使用方法:

一、核酸提取

有多种商品化的核酸提取试剂盒可用于 RNA 提取。推荐使用硅基膜吸附离心柱法或磁珠法 (兼容全自动核酸提取仪)。提取病毒 RNA 时, 需采取 RNA 保护措施 (如带一次性手套操作), RNA 应保存于 -70°C, 避免降解。实验需设置阳性对照、阴性对照, 必要时设立环境样品对照。

二、核酸扩增与检测

试剂准备区, 从 -20°C 冰箱中取出试剂, 室温解冻后混匀, 短暂离心备用。

1. RT-PCR

按照下表配制第一轮 RT-PCR 体系, 逆转录 PCR 扩增体系为 25 μL。

成分	体积 (单次反应)	体积 (10 次反应)
DR-RT mix	12 μL	120 μL
E mix	1 μL	10 μL
DR-RT 引物	2 μL	20 μL
RNA	10 μL	100 μL
总体积	25 μL	250 μL

在试剂准备区配制和分装试剂。根据表格中的成分比例, 按照所需要的反应次数, 计算所需要的各组分体积来配制试剂。将各组充分混合, 短暂离心。在洁净工作台中, 按体系要求, 15 μL/管或孔的量分装到 PCR 管或 PCR 板中, 然后将分装好的 PCR 管或 PCR 板传递到**样品制备区**中。在生物安全柜中, 每管或每孔中补加 10 μL 提取好的 RNA。盖紧管盖 (最好使用连排盖或硅胶垫, 能够最大程度降低蒸发), 混匀, 短暂离心, 转移至 **PCR 扩增区**。

RT-PCR 扩增程序:

50°C 30 分钟 → 94°C 2 分钟 → (94°C 15 秒 → 55°C 15 秒 → 72°C 1 分钟) ×30 循环 → 72°C 2 分钟 → 4°C 保存。(模板浓度低时, 使用 35-40 个循环)。

2. 第二轮 PCR (巢式扩增)

PCR 扩增区

按照下表配制第二轮 PCR 体系, PCR 扩增体系为 50 μL。

成分	体积 (单次反应)	体积 (10 次反应)
DR-PCR Mix	47 μL	470μL
第一轮产物	2 μL	20 μL
DR-PCR 引物	1 μL	10 μL
总体积	50 μL	500 μL

在试剂准备区配制和分装试剂。根据表格中的成分比例, 按照所需要的反应次数, 计算所需要的各组分体积来配制试剂。将各组分充分混合, 短暂离心。如样本量超过 20 次反应, 尤其是使用 96 孔 PCR 反应板扩增时, 可使用简单方法配制和分装试剂: 每管 1000 μL 的 DR-PCR Mix 中直接加 20 μL 的 DR-PCR 引物, 混匀, 离心后即可分装。在洁净工作台中, 按 48 μL/管或孔的量分装到 PCR 管或 PCR 板中备用, 然后将 PCR 管或 PCR 板传递到 PCR 扩增区中。每管/孔补加 2 μL 扩增好的第一轮 PCR 产物。盖紧管盖, 离心数秒, 转移至 PCR 扩增区进行扩增。

第二轮 PCR 扩增程序: 94°C 2 分钟 → (94°C 15 秒 → 58°C 15 秒 → 72°C 45 秒) ×35 循环 → 72°C 2 分钟 → 4°C 保存。

3. 扩增产物鉴定 (产物分析区)

扩增产物用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增情况。称取 2.0 克琼脂糖, 加入 100ml 的 1×TAE, 加热熔化, 冷却至 60°C, 加入核酸染料如 GelRed 或 GelGreen (按照产品说明书进行)。混合后均匀导入胶槽中制备凝胶, 待凝胶完全凝固后即可进行电泳。取 5 μL 第二轮 PCR 产物直接上样, 选择合适的 DNA 分子量标准作为条带参考标准, 以 5V/cm 的电压降电泳 20~30 分钟, 待黄色指示剂距离加样孔 3-4cm 时, 停止电泳, 凝胶成像分析仪观察并照相保存。

三、PCR 产物回收及测序

目的条带在 2% 的琼脂糖凝胶中完全分离, 切下目的条带装入 2.0ml 离心管中。用商品化凝胶回收试剂盒按操作说明书操作进行。

回收的 DNA 通常采用 Sanger 法进行 DNA 测序 (下面提供的测序引物序列供参考)。按照设定的程序进行测序反应, 在测序仪中读取序列数据。测序完成的序列保存为 ABI 格式。经过测序后获得的核酸序列, 在进行耐药分析以前, 需要对序列进行初步的质量评估、拼接、混合碱基判读、清理和质量控制等一系列流程。

供参考的测序引物:

PROS3: GCCAACAGCCCCACCA (HXB2:2151-2166)

RTAS: CTCAGATTGGTTGCAC (HXB2:2524-2539)

RTB: CCTAGTATAACAATGAGACAC (HXB2:2946-2967)

PROC1S: GCTGGGTGTGGTATTCC (HXB2:2826-2842)

RT4R: CTTCTGTATATCATTGACAGTCCAGCT (HXB2:3299-3327)

四、注意事项

1. 质控要求: 阳性对照的 PCR 结果应显示单一条带 (1200bp 左右), 阴性对照和环境样品对照的 PCR 结果无条带。若样本无条带, 可能因 RNA 浓度低于检测限 (2×10^2 copies/mL) 或核酸降解。

2. 灵敏度: 检测范围为 2×10^2 - 1×10^8 copies/mL, 最低检出限为 2×10^2 copies/mL。

3. 操作规范: 结果受样本采集、运输及保存条件影响, 需严格遵循实验流程。

4. 适用范围: 本产品仅用于科研用途, 不用于临床诊断。