



HIV-1 耐药基因型检测试剂盒 II (PCR-测序法)--科研版

试剂盒组成

组分	MT426-01 (100 次)	数量
DR-RT mix (Colorless)	1250μL/管	1
E mix	100 μL/管	1
DR-RT2 引物	200 μL/管	1
DR-PCR Mix (Green)	1000 μL/管	5
DR-PCR2 引物	100 μL/管	1
RNase free water	1000 μL/管	2
DR2 阳性质粒对照品	100 μL/管	1

储存条件

-20℃保存，避免反复冻融。

产品介绍

本试剂盒用于定性检测 HIV-1 蛋白酶区 (PR 区) 和逆转录酶区 (RT 区) 的耐药相关基因突变，以评估基因突变所致的病毒耐药性。检测区域涵盖 HIV-1 PR 区 (1-99 aa) 和 RT 区 (1-416 aa)，覆盖所有的常见耐药突变位点。可检测蛋白酶抑制剂 (PIs Protease Inhibitors)、核苷类逆转录酶抑制剂 (NRTIs Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors) 和非核苷类逆转录酶抑制剂 (NNRTIs Non-nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors) 等三类抗逆转录病毒药物的耐药相关突变。

检测原理

针对 HIV-1 基因组 PR 区和 RT 区设计特异性引物，采用逆转录 PCR (RT-PCR) 和套式 PCR 两轮扩增，结合 Sanger 测序法获得目标基因片段序列；将序列提交至斯坦福 HIV 耐药数据库 (<https://hivdb.stanford.edu/hivdb/by-patterns/>) 进行比对，以判定待检毒株的耐药状态。

核酸提取

目前市售核酸提取试剂盒种类较多，可选择适宜试剂盒并按其说明书操作，常见方法包括离心柱法和磁珠法。提取病毒 RNA 时，应采取防止 RNA 降解的保护措施。提取后的 RNA 应保存于 -70℃。核酸提取过程中应设置阳性和阴性对照，必要时设置环境样本对照。

核酸扩增与检测

在试剂准备区从冰箱中取出 PCR 检测试剂，室温化冻后颠倒混匀，短暂离心数秒，备用。

1. 逆转录 PCR (RT-PCR)

按照下表配制第一轮 RT-PCR 体系，逆转录 PCR 扩增体系总反应体积为 25μL，

成分	体积 (单次反应)	体积 (20 次反应)
DR-RTmix	12 μL	240 μL
E mix	1 μL	20 μL
DR-RT2 引物	2 μL	40 μL
RNA	10 μL	—
总体积	25 μL	500 μL

在试剂准备区按表中各组分比例，根据所需反应数计算各组分体积并配制试剂。充分混匀后短暂离心，使液体收集至管底；在洁净工作台中按 15 μL/管或孔分装至 PCR 管或 PCR 板中备用。将分装好预混液的 PCR 管或 PCR 板传递至样品制备区。在生物安全柜中，每管或每孔加入 10 μL 提取的 RNA。盖紧管盖（推荐使用 8 连排盖或硅胶垫，以最大程度减少蒸发），震荡混匀，离心数秒后转移至 PCR 扩增区。

第一轮 PCR 运行程序：50℃/30 min；94℃/2 min；94℃/15 s，55℃/15 s，72℃/90 s，30-35 个循环（模板浓度较低时使用 35 个循环）；72℃ 2 min；4℃保存。

2. 第二轮 PCR (PCR 扩增区)

按照下表配制第二轮 PCR 体系，扩增体系总反应体积为 50 μL 。

成分	体积 (单次反应)	体积 (20 次反应)
DR-PCR Mix (Green)	47 μL	940 μL
DR-PCR2 引物	1 μL	20 μL
第一轮产物	2 μL	—
总体积	50 μL	1000 μL

在**试剂准备区**按表中各组分比例，根据所需反应数计算各组分体积并配制试剂。充分混匀后短暂离心，使液体收集至管底；在洁净工作台中按 48 μL /管或孔分装至 PCR 管或 PCR 板中备用。将分装好预混液的 PCR 管或 PCR 板传递至**PCR 扩增区**；每管或每孔加入 2 μL 第一轮 PCR 产物，盖紧管盖，离心数秒后进行扩增。

第二轮 PCR 反应条件：94°C/2 min；94°C/10 s，58°C/10 s，72°C/60 s，35 个循环；72°C/2 min；4°C 保存。

3. 扩增产物鉴定 (产物分析区)

采用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。称取 2.0 g 琼脂糖，加入 100 mL 1×TAE，加热熔化，冷却至 60°C 后加入核酸染料（如 GelRed 或 GelGreen，按产品说明书使用）。混匀后均匀倒入胶槽中制备凝胶，待完全凝固后进行电泳。取 5 μL 第二轮 PCR 产物直接上样，选择合适的 DNA 分子量标准作为参照，以 5 V/cm 电压梯度电泳 20–30 min；待黄色指示剂迁移至距加样孔 3–4 cm 时停止电泳，使用凝胶成像分析仪观察并拍照保存。

4. PCR 产物回收及测序

目的条带经 2% 琼脂糖凝胶电泳完全分离后，切下目的条带并置于 2.0 mL 离心管中；使用商品化凝胶回收试剂盒按说明书进行回收。

回收的 DNA 通常采用 Sanger 法测序（以下测序引物序列供参考）。按设定程序进行测序反应，并在测序仪中读取序列数据。测序完成后，序列数据保存为 ABI 格式。获得核酸序列后，在进行耐药分析前，需进行初步质量评估、序列拼接、混合碱基判读、序列清理及质量控制等流程。

供参考的测序引物

PROS3:GCCAACAGCCCCACCA (HXB2:2151-2166)

RTAS:CTCAGATTGGTTGCAC (HXB2:2524-2539)

RT-B:CCTAGTATAAACAATGAGACAC (HXB2:2946-2967)

PROC1S:GCTGGGTGTGGTATTCC (HXB2:2826-2842)

RT4R:CTTCTGTATATCATTGACAGTCCAGCT (HXB2:3299-3327)

POL-R:CTCCCACTCAGGAACCAGGT (HXB2:4135-4154)

注意事项

1. 阳性质控品应在约 1600 bp 处出现单一条带，阴性质控品应无条带；仅当上述质控条件满足时，样本检测结果方可判为可信。
2. 不同核酸提取试剂盒所提取核酸的浓度、纯度及完整性存在差异，应选择符合本试剂盒要求的提取试剂。
3. 若无目的条带，可能提示样本 RNA 浓度低于本试剂盒最低检出限，或核酸发生降解。
4. 浓度低于本试剂盒最低检出限的样本仍可能出现一定程度的阳性扩增，但阳性检出率无法保证。
5. 检出限：本试剂盒对 HIV-1 样本的检测范围为 $2 \times 10^2 \sim 1 \times 10^8$ copies/mL，最低检出限为 2×10^2 copies/mL。
6. 检测结果与样本采集、处理、运输及保存质量有关。

本试剂仅供科学研究使用。

For Research Use Only.

本试剂仅供科学研究使用!

Research Use Only!