

【产品名称】

通用名称：人类免疫缺陷病毒1型&2型双重探针法荧光定量RT-PCR试剂盒

【产品编号】 PR64381

【包装规格】 50T/盒

【检验原理】

人类免疫缺陷病毒（HIV）是一种逆转录病毒，能导致获得性免疫缺陷综合征（AIDS），这是一种严重的、致死性的传染病。HIV主要通过性接触、血液传播和母婴传播等方式传播，感染后会使得机体免疫功能受损，最终并发各种机会性感染和肿瘤。可分为 HIV1和HIV2。本试剂盒可在一次反应中快速检测两种病毒：HIV1和HIV2。根据探针法荧光定量 RT-PCR 原理开发。

它具有下列特点：

1. 即开即用，用户只需要提供核酸（含 DNA 和 RNA）模板。
2. 提供两种病毒的阳性对照，便于区分假阴性样品。
3. 反应快速，灵敏度高。
4. 对所有单个病原体的高灵敏度和强特异性。
5. 可用于高通量检测。
6. 本试剂盒足够做 25 μ L 体系的探针法荧光定量 RT-PCR 50 次，只能用于科研。

【试剂组成】

名 称	规 格
2 ×OneStep Probe Mix	650 μ L×1管
OneStep Probe Enzyme Mix	55 μ L×1管
DEPC-H ₂ O	1 mL×1 管
荧光模板稀释液	1 mL×1 管
HIV1& HIV2 双重 RT-qPCR引物-探针混合液	160 μ L ×1 管
HIV1& HIV2 双重 RT-qPCR 阳性对照(1×10 ⁸ 拷贝/ μ L)	50 μ L ×1 管

说明：不同批号的试剂盒组分不可交互使用。

【储存条件及有效期】

1. 避光-20 $^{\circ}$ C储存，有效期 12个月。
2. 低温运输，运输不超过 4 天；开封后避光-20 $^{\circ}$ C储存对有效期没有影响；避免反复冻融，冻融6次不影响检测效果。
3. 阳性对照需要单独放置，不要污染其他试剂。
4. 生产日期、有效期至：见外包装盒。

【适用仪器】

ABI、安捷伦MX3000P/3005P、LightCycler、Bio-Rad、eppendorf等系列荧光定量PCR检测仪。

【使用方法】

一、核酸提取(样本制备区)

用自选方法提取纯化样品核酸，本试剂盒跟市场上大多数核酸提取试剂盒兼容。病毒 DNA/RNA 提取试剂盒（吸附柱法）提取核酸。

二、稀释标准曲线样品(样本制备区)

（由于阳性对照浓度高，因此下列稀释操作一定要在独立的区域进行，避免污染样品或本试剂盒的其他成分）。

1. 标记 6 个离心管，分别为 7，6，5，4，3，2。
2. 用带芯枪头分别加入 45 μL 荧光模板稀释液，（最好用带芯枪头，下同）。
3. 在 7 号管中加入 5 μL 1×10^8 拷贝/ μL 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1×10^7 拷贝/ μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头，在 6 号管中加入 5 μL 1×10^7 拷贝/ μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10^6 拷贝/ μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头，在 5 号管中加入 5 μL 1×10^6 拷贝/ μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1×10^5 拷贝/ μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
6. 重复上面的操作直到得到 6 个稀释度的标准曲线样品。放冰上待用。

若无需制作标准曲线，将阳性对照稀释到 1×10^5 拷贝/ μL 即可。

三、试剂配制(试剂准备区)

准备足量的 qPCR 管（样品管、阴性对照管、阳性对照管），向各 qPCR 管中分别加入下列成分：

成分	N个 待检样品 管	qPCR 阴性对照	qPCR 阳性对照
2 \times OneStep Probe Mix	各 12.5 μL	12.5 μL	12.5 μL
OneStep Probe Enzyme Mix	各 1 μL	1 μL	1 μL
HIV1 & HIV2 双重 RT-qPCR 引物-探针混合液	各 3 μL	3 μL	3 μL
DEPC-H ₂ O	各 6.5 μL	6.5 μL	6.5 μL

转移至模版添加区。

• 添加模板(模板添加区)

向 qPCR 管中分别加入 2 μ L 模板，顺序为阴性对照（DEPC-H₂O）、待测样品模板。HIV1& HIV2 双重 RT-qPCR 阳性对照，离心 30 秒，立即进行扩增反应。

• 扩增反应(扩增及产物分析区)

将 qPCR 管放置在 qPCR 扩增仪器样品槽相应位置，进行扩增，扩增程序如下：

过程	温度	时间
反转录	50°C	15 min
预变性	95°C	3min
qPCR 反应 (40 个循环)	95°C	15 sec
	60°C	20 sec
信号通道	同时选择 FAM/VIC 通道采集荧光信号	

荧光基团和淬灭基团选择如下表：

Target	荧光基团	淬灭基团
HIV1	FAM	BHQ1
HIV2	VIC	BHQ1

六、结果分析

1. 如果制作标准曲线，则以阳性对照浓度的 log 值为横轴，以 Ct 值为纵轴，绘制

标准曲线。再以待测样品的 Ct 值从标准曲线上推算出样品 RNA 浓度的 log 值，推算出其浓度。

2. 如果无需制作标准曲线，按照如下标准判定结果：

阳性对照（1 \times 10⁵ 拷贝/ μ L）结果：Ct 值<30，有明显指数增长，呈典型的 S 型曲线。

阴性对照结果：Ct 值>38 或无 Ct 值，无明显指数增长期和平台期。

样本检测结果：Ct 值<35，有明显指数增长，表明样本中检测出该病毒，结果为阳

性；Ct 值>38 或无 Ct 值，表明样本中未检测出该病毒，结果为阴性；Ct 值在 35-38 范围，应对样本进行复检，如重复实验结果 Ct 值仍在 35-38 范围，有明显指数增长，则判定为阳性，否则为阴性。

七、【注意事项】

1. PCR 操作各阶段应严格分区操作，避免交叉污染。
2. 各组分不得与其他产品或不同批号的相应成分进行互换。
3. 待测标本若不及时检测，应保存于-20°C或-70°C。
4. 样品的处理应该严格按照生物安全规范操作。

5. PCR 操作人员应具有经验和受过专业培训。
6. 本试剂盒仅用于科研使用，不做为临床诊断使用。

www.pyram.cn