【结果分析与判定】

1. 将四个工作标准品的浓度输入，F1 (FAM) 通道选择样点拟合法进行分析，基线（零点调整）取为10-15个循环的荧光信号，F2 (HEX) 通道基线（零点调整）取为15—25个循环的荧光信号，噪声容限以基线超过正常阴性对照品扩增曲线（无规则的噪音线）的最高点，或根据仪器噪音情况另行调整,并且基线调整的位置在0.5-5的范围内，然后进行定量分析。
2. 检测样本中 $500 \text{ IU/ml} \leq \text{HIV RNA} \leq 1 \times 10^8 \text{ IU/ml}$ ，测定结果有效，可直接报告阳性及相应的拷贝量。
3. 检测样本中 $\text{HIV RNA} > 1 \times 10^8 \text{ IU/ml}$ ，即可直接报告为 $> 1 \times 10^8 \text{ IU/ml}$ ，也可用正常人HIV RNA阴性血清按10倍梯度做相应稀释，使其拷贝量落在 $1 \times 10^5 - 5 \times 10^7 \text{ IU/ml}$ 范围内再重新测定，测定结果应以稀释倍数进行校正。
4. HIV RNA的拷贝量 $< 500 \text{ IU/ml}$ ，建议重测或跟踪检查。
5. Ct值不显示时，该样本HIV RNA为阴性。

【质量控制】

1. 标准曲线的相关系数小于等于-0.970;
2. 阴性对照的Ct值应不显示;
3. 阳性对照的Ct值应小于35。

【产品性能指标】

本试剂盒的灵敏度为 500 IU/ml ，线性范围为 $1 \times 10^3 \text{ IU/ml} \leq \text{HIV RNA} \leq 1 \times 10^8 \text{ IU/ml}$ 。

【注意事项】

1. 本试剂盒仅用于科研。
2. 操作之前应仔细阅读说明书，操作人员必须经过培训，合格后方能上岗。
3. 实验器皿要求无RNA酶污染。
4. 实验全过程必须配带一次性的PE或橡胶手套，扩增结束后不要打开管子，应密封丢弃于指定的容器内。
5. 为避免实验过程中的交叉污染，每一步吸液过程都必须使用新的枪头。
6. 为了最大程度的减小携带污染，应使RNA准备间与其他实验室完全分离。
7. 实验结束后用75%酒精或10%次氯酸清理实验工作台，并用紫外灯照射，以防止实验室污染。

【生产企业】

杭州博日科技有限公司

地址：杭州市滨江区滨安路 1192 号

邮政编码：310053

电话：0571-87774567;

传真：0571-87774553

网址：www.bioer.com.cn

人类免疫缺陷病毒(HIV-1)荧光定量 RT-PCR 检测试剂盒 (内标磁珠法) 说明书

【产品名称】

通用名称：人类免疫缺陷病毒(HIV-1)荧光定量 RT-PCR 检测试剂盒

英文名称：HIV-1 RT-PCR Fluorescence Quantitative Detection Kit

【包装规格】48 人份/盒

【用途】

本试剂盒用于人血浆中人类免疫缺陷病毒核酸（HIV-1 RNA）的定量检测。

【检验原理】

本试剂盒从人血浆中提取人类免疫缺陷病毒核酸（HIV-1 RNA），通过 RT-PCR 一步法反应，利用特异性引物对 HIV-1 RNA 进行体外扩增，在体系中采用 Taqman-MGB 探针法来定量检测人血浆中人类免疫缺陷病毒核酸（HIV-1 RNA）的数量。可用于临床对艾滋病的辅助诊断和抗病毒药物的疗效观察。

【主要组成成份】

		试剂组分	体积	数量
1	病毒核酸提取试剂	裂解液	25ml	1 瓶
2		磁珠悬液	0.5ml	1 管
3		去蛋白漂洗液	18ml	1 瓶
4		洗涤液	6ml	2 瓶
5		洗脱液	10ml	1 瓶
6	PCR 试剂	RT-PCR MIX	1200μl	1 管
7		Mn ²⁺	120μl	1 管
8		HIV Probe Mix	120μl	1 管
9		Internal control	250μl	1 管
10		Negative control	500μl	1 管
11		Positive control	500μl	1 管
12		Standard control 1: 5.0×10 ⁷ copies/ml	100μl	1 管
13		Standard control 2: 5.0×10 ⁶ copies/ml	100μl	1 管
14		Standard control 3: 5.0×10 ⁵ copies/ml	100μl	1 管
15	Standard control 4: 5.0×10 ⁴ copies/ml	100μl	1 管	

注：18ml 去蛋白漂洗液使用前加入 12ml 无水乙醇。

6ml 洗涤液使用前加入 24ml 无水乙醇。

工作标准品 1-4 的参数根据批号不同而不同。详见试剂盒盒内标签。

工作标准品 1-4 用国家参考品或经国家参考品标定的企业工作参考品进行标定。

【储存条件及有效期】

- 1) 试剂盒必须在冷藏条件下运输。
- 2) 试剂盒保存：除病毒核酸提取试剂于 2-8℃ 保存。
其余试剂均保存于-20℃，应避免反复冻融。
- 3) 有效期：本试剂盒有效期 12 个月，请在有效期内使用。

【适用仪器】

博日公司 Line-Gene 系列荧光定量 PCR 检测系统，NPA-32+核酸纯化仪，ABI7500 以及 Bio-rad Chromo4 等。

【自备设备及试剂】

1. 无RNA酶污染的枪头。
2. 0.2 ml PCR 薄壁管，96孔板封口膜。
3. 离心机，涡流震荡器，96孔板磁力架，金属浴或水浴锅。

【样本要求】

1. 样本采集：用无菌注射针头采2ml静脉血于含有EDTA作为抗凝剂的无菌离心管中，室温放置不应超过4hr，4hr内室温1,600g离心20min，分离血浆转入无菌离心管中备用。
2. 存放：分离后的血浆标本在2℃-8℃条件下保存应不超过72hr；-70℃以下可长期保存，但应避免反复冻融（最多冻融3次）。
3. 运输：采用冰壶或泡沫箱加冰密封进行运输。

【检验方法】**(一) 标本提取（在标本处理区进行）**

将标本、对照品在室温进行解冻，解冻完全后，开始提取，操作步骤如下：

1. 取出500µl 裂解液加入到1.5 ml无核酸酶离心管中；
2. 加入5µl内标到相应离心管内；
3. 加入200µl待测血清和对照品到相应离心管内，充分振荡混匀；
4. 然后将离心管放置到70℃恒温金属浴上温育5分钟；
5. 从恒温金属浴上取出离心管，在离心管中加入10µl的磁珠（使用之前将装有磁珠悬液的离心管快速颠倒摇晃10次，使磁珠颗粒在缓冲液中充分悬浮分散均匀），室温下颠倒混匀10分钟；
6. 将离心管置于磁力架上1分钟，使管内磁珠被吸附，用移液器移走管内液体，取下离心管；
7. 加入 500µl 去蛋白漂洗液，使磁珠重新悬浮，将离心管置于磁力架上1分钟，用移液器移走管内液体，取下离心管；
8. 加入 500µl 洗涤液，使磁珠重新悬浮，将离心管置于磁力架上1分钟，用移液器移走管内液体，取下离心管；
9. 再加入 500µl 洗涤液，使磁珠重新悬浮，将离心管置于磁力架上1分钟，用移液器移走管内液体，同时保持离心管置于磁力架上，使磁珠继续被吸附，室温晾干 5min；
10. 从磁力架上取下离心管，加入 100µl 洗脱液，使磁珠重新悬浮，55℃水浴 5分钟，其间轻轻晃动两次使核酸充分洗脱；
11. 将离心管置于磁力架1分钟，使磁珠被吸附，将液体转移至新的 1.5 ml无RNA酶离心管。

注：如操作时，发现管壁和管盖有液体，请短暂离心使液体甩入管底，再置于磁力架上。
如要配套自动化仪器使用，深孔板裂解温度和洗脱温度需要根据仪器型号调整优化。

以博日公司生产的NPA-32+为例：（可选板式预分装试剂）

1. 在2.2ml 96孔深孔板第1、7列中各加入500µl 裂解液，第2、8列中各加入500µl 去蛋白漂洗液，第3、4列和第9、10列中各加入500µl 洗涤液，第5、11列中加入100µl 洗脱液，第6、12列中加入190µl 纯水和 10µl 磁珠悬液。
2. 将200µl 样品和 5µl 内标加入96孔试剂板的第1及第7列孔中，避免交叉污染。
3. 将96孔试剂板放入NPA-32+核酸纯化仪中，装上磁棒护套，按以下程序进行自动化提取实验：

步骤	槽位	名称	等待时间 (min : ss)	混合时间 (min : ss)	磁吸时间 (min : ss)	强力吸附	混合速度	体积 (µl)
1	1	裂解	0 : 0	10 : 0	0 : 0		快速	700
2	6	吸磁珠	0 : 0	0 : 15	0 : 30		中速	200
3	1	结合	0 : 0	10 : 0	0 : 35	强力吸附	快速	700
4	2	洗涤 1	0 : 0	2 : 0	0 : 30	强力吸附	快速	500
5	3	洗涤 2	0 : 0	1 : 0	0 : 30	强力吸附	快速	500
6	4	洗涤 3	0 : 0	1 : 0	0 : 30	强力吸附	快速	500
7	5	洗脱	1 : 0	5 : 0	0 : 30		中速	100
8	6	弃磁珠	0 : 0	0 : 30	0 : 0		中速	200

加热设置： 裂解温度： 85℃，裂解加温终止步骤： 2 ；
洗脱温度： 70℃，洗脱开始加温步骤： 7 。

4. 自动化程序结束后，将96孔试剂板从NPA-32+核酸纯化仪中取出，第5及第11排的洗脱液可以直接用于下游HIV定量PCR；如不马上使用，请将液体转移至新的0.5 ml无核酸酶离心管中，-80度保存。

（二）PCR 反应液配制（在试剂准备区进行）

1. 试剂配制：将试剂盒中的HBV PCR反应液、标准品及提取好的对照品进行室温解冻。试剂配制前，将所有试剂振荡后短暂离心。按标本的数量加上标准品和对照品的数量进行PCR反应配置，配置如下：
每个反应的试剂用量：

试剂	RT-PCR MIX	Mn2+	HIV Probe Mix
用量	25 µl	2.5 µl	2.5 µl

混合好上述反应液后，以每管 30µl 分装于 0.2ml 的 PCR 反应管中。将分装好的 PCR 反应管转移至标本处理区。

2. 加样：分装好的反应管分别加入已提取好的标本、对照品及标准品各 20 µl。
3. PCR反应（在PCR检测区进行）反应程序设置如下：

90℃：30 秒；
61℃：20 分钟；
95℃：1 分钟；
95℃：15 秒；
60℃：60 秒； } 45 个循环

仪器检测通道选择: 荧光信号收集设定为 F1 (FAM) 和 F2 (HEX) 通道，60℃检测荧光，调节增益使荧光 F1 (FAM) 通道本底值在 30-40 之间，F2 (HEX) 通道本底值在 20-30 之间。