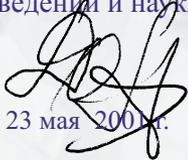


МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

СОГЛАСОВАНО

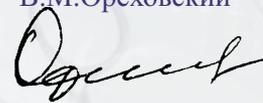
Заместитель начальника
Главного управления кадровой политики,
учебных заведений и науки Н.И. Доста



23 мая 2001 г.

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель
министра здравоохранения
В.М.Ореховский



23 мая 2001 г.
Регистрационный № 92-0008

**ПЦР-ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИИ,
ВЫЗАННОЙ РАЗНЫМИ СУБТИПАМИ ВИРУСА
ИММУННОГО ДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА**

Минск 2001

[Перейти к оглавлению](#)

Учреждение-разработчик: НИИ эпидемиологии и микробиологии

Авторы: д-р мед. наук В.Ф. Еремин, канд. биол. наук Е.Л. Гасич, канд. биол. наук Г.П. Дубойская, Н.В. Блашкевич

Рецензенты: д-р мед. наук Т.В. Амвросьева, д-р мед. наук, проф. Н.Н. Полещук

Методические рекомендации рассчитаны на врачей-вирусологов, врачей-инфекционистов, сотрудников научно-исследовательских лабораторий, диагностических лабораторий практического здравоохранения, занимающихся проблемой ВИЧ-инфекции.

Методические рекомендации утверждены Министерством здравоохранения Республики Беларусь в качестве официального документа

Оглавление

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
МЕТОДИКА ПЦР	8
I. Работа с ДНК	8
II. Работа с РНК	27
Постановка РТ-ПЦР и учет результатов реакции	33

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ

ИФА — иммуноферментный анализ

ПЦР — полимеразная цепная реакция

ВИЧ — вирус иммунного дефицита человека

ФСБ — фосфатно-солевой буфер

РТ-ПЦР — ПЦР с обратной транскрипцией

Всю работу с ДНК или РНК необходимо проводить в специально отведенных помещениях с обязательным использованием спецодежды и резиновых перчаток.

ВВЕДЕНИЕ

Множество субтипов ВИЧ, отличающихся примерно на 30% по нуклеотидным последовательностям наружного оболочечного гликопротеида, вовлечены в пандемию ВИЧ-инфекции. Десять субтипов, образующих большую М-группу ВИЧ-1, обозначены латинскими буквами от А до J. Другую группу ВИЧ-1 — О (oulier) образуют вирусы, отличающиеся от вирусов группы М на 45–50% по V3 району gp120. ВИЧ-2 разделен на 5 субтипов: А — Е. ВИЧ-2 в основном распространены в Западной Африке и Индии.

Пандемия ВИЧ-инфекции в мире связана в основном с субтипами А — Е. Эти субтипы распространены в разной степени в разных странах мира. Субтип В преобладает в США и Западной Европе, субтипы Е и С вызвали вспышки ВИЧ-инфекции в Азии, а все остальные субтипы ВИЧ-1 выявлены в странах Центральной Африки — возможном источнике эпидемии ВИЧ-инфекции. Однако распределение субтипов ВИЧ в мире непостоянно. Например, в Германии в настоящее время примерно $\frac{1}{3}$ всех новых случаев ВИЧ-инфекции связано с субтипами Е, С, А и др. Сходные процессы наблюдались в других странах Западной Европы: Швеции, Бельгии, Испании, Франции и США.

Большие различия между субтипами вызывают и сложности при производстве диагностических тестов, проведении антиретровирусной терапии и при приготовлении вакцины. Так, выявление ВИЧ-1 субтипа О вызвало значительные проблемы при диагностике инфекции, поскольку коммерческие тест-системы слабо выявляли эти типы вируса. Только включение специфических антигенов субтипа О в тест-системы позволило решить проблему.

Известно, что ВИЧ разных субтипов неодинаково чувствительны к антиретровирусным препаратам. Так вирусы субтипа О не ингибируются нуклеозидными ингибиторами обратной транскриптазы, субтипы G обладают пониженной чувствительностью к ингибиторам вирусной протеазы. Вирусная нагрузка — основной метод оценки эффективности антиретровирусной терапии и проверки новых препаратов, который оптимизирован для выявления ВИЧ субтипа В. Чувствительность таких наборов по отношению к другим субтипам ВИЧ-1 зависит от используемых коммерческих наборов. К тому же выработка резистентности к препаратам специфической терапии может быть разной у ВИЧ различных субтипов. Даже наличие изменений в одинаковых аминокислотных последовательностях может вызывать неодинаковый уровень резистентности у разных генетических типов ВИЧ.

В Беларуси, как и в других странах СНГ, развитие ВИЧ-инфекции с момента начала изучения проблемы в 1986 г. по 1996 г. характеризовалось как относительно благополучное. Ежегодно в стране выявлялось 10–12 новых случаев ВИЧ-инфекции, связанных в основном с заносами извне (иностранцы граждане — студенты из стран Африки), на которые приходилось 70% от 113 всех диагностированных ВИЧ-инфицированных.

Однако ситуация в Беларуси резко изменилась летом 1996 г. Только за три месяца (август – октябрь) в республике было выявлено более 600 новых случаев ВИЧ-инфекции, а к концу этого года заболевание было диагностировано у 1004 пациентов. К началу 2000 г. в Беларуси выявлено 2864 ВИЧ-инфицированных и больных СПИД, из которых более 70% приходится на молодых людей обоих полов в возрасте от 15 до 30 лет. При этом 80,8% всех случаев ВИЧ-инфицирования связано с внутривенным введением наркотиков.

Множественное, независимое проникновение ВИЧ в Беларусь до вспышки 1996 г. было связано с ВИЧ-1 субтипами А, В (B_{MN} ; B_{SF-2} ; B_{OYI}), С, G, передача которых происходила гетеросексуальным путем, в отличие от гомосексуального пути инфицирования, ассоциированного исключительно с субтипом В. Вспышка ВИЧ-1 инфекции в Беларуси в 1996 г. и последующие связаны с субтипом А, родственным таковому из очага в г. Одесса (Украина). Вместе с тем, на территории республики продолжается циркуляция ранее занесенных субтипов ВИЧ-1 и происходит занос новых вирусов с сопредельных территорий.

Используемые в настоящее время коммерческие тест-системы для ПЦР-диагностики ВИЧ-1 (Roche Diagnostic Systems, Abbott, Organon Teknika) основаны на применении пар праймеров, приготовленных на основании данных секвенирования субтипа В ВИЧ-1. Такой подход, как показал наш опыт и исходя из данных литературы, ведет к тому, что часть заведомо положительных проб пропускаются из-за того, что ВИЧ-1 в исследуемых пробах относился к другим субтипам или другому варианту субтипа В.

Рост заболеваемости ВИЧ-инфекцией в республике и соседних странах позволяет прогнозировать дальнейшее распространение инфекции в регионе, вовлечение в эпидпроцесс новых пациентов из разных групп риска, дальнейший занос в страну разных субтипов ВИЧ-1.

В связи с этим представляется актуальным внедрение в Республике Беларусь новых подходов для ПЦР-диагностики ВИЧ-инфекции. В настоящих методических рекомендациях описаны методические подходы, позволяющие выявлять фрагменты ДНК или РНК разных субтипов ВИЧ-1.

МЕТОДИКА ПЦР

I. Работа с ДНК

Выделение лимфоцитов периферической крови (ЛПК):

- 5–10 мл крови с ЭДТА (этилендиаминтетраацетат) или с гепарином (в течение 24 ч после взятия из вены, хранение крови при комнатной температуре);
- приготовить центрифужную пробирку с 10–20 мл Ficoll-Paque или с 60% верографинном, разведенным 2:5 в ФСБ;
- развести кровь в 10–20 мл ФСБ (1:3);
- разведенную кровь наслоить на фиколл или верографин;
- центрифугировать пробу в течение 30 мин при 1800 об./мин при комнатной температуре;
- собрать кольцо лимфоцитов с помощью пипетки;
- разделить клетки на 2 центрифужные пробирки (для двух независимых выделений ДНК!);
- промыть клетки дважды ФСБ, перенести их в пробирки типа «Эппендорф» (1,5 мл), центрифугировать в течение 10 мин при 3–5 тыс. об./мин при комнатной температуре, осторожно удалить супернатант;
- заморозить клетки при -20°C или приступить к клеточному лизису (если крови меньше, использовать пробирки на 12 мл с 4–5 мл фиколла);
- ФСБ (без CaCl_2 и MgCl_2): 8,0 г NaCl , 0,2 г KCl , 1,15 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,2 г KH_2PO_4 .
- растворить соли в бидистиллированной воде, довести рН до 7,2, довести объем до 1000 мл, автоклавировать.

Выделение ДНК из ЛПК

Лизис клеток:

- ресуспендировать клетки в 200 мкл буфера с протеиназой К, добавить 12 мкл 20% SDS (или 22 мкл 10%), добавить 12 мкл протеиназы К, 10 мг/мл;
- хорошо перемешать и инкубировать 2 ч при 60° С или 12–16 ч при 37° С.

Фенол/хлороформная экстракция:

- добавить 110 мкл фенола (очищенного в ТЕ рН 8,0) и 110 мкл смеси хлороформ/изоамиловый спирт (24:1) к клеточному лизату или 220 мкл смеси фенол/хлороформ (1:1), перемешать и интенсивно встряхивать каждую пробу по крайней мере в течение 5 мин (происходит денатурация и агрегация белков);
- центрифугировать при 8–12 тыс.об./мин в течение 10 мин в микроцентрифуге;
- отобрать верхнюю водную фазу (ДНК находится в водной фазе, избегать забора материала из интерфазы), перенести в чистую пробирку;
- добавить 220 мкл смеси хлороформ/изоамиловый спирт, интенсивно перемешать в течение 3–5 мин (для удаления остатка фенола);
- центрифугировать в течение 10 мин в микроцентрифуге при 8–12 тыс. об./мин;
- отобрать верхнюю водную фазу и перенести в чистую пробирку.

Спиртовая преципитация ДНК:

- к пробе добавить 20 мкл 3 моль ацетата натрия (CH_3COONa) рН 5,3 (1/10 объема) и 440 мкл 96% спирта (2 объема), хорошо перемешать и преципитировать в течение 10 мин на ледяной бане (или в течение ночи при –20° С.);
- центрифугировать в течение 30 мин при 8–12 тыс. об./мин;
- супернатант удалить;

- осадок промыть в 1 мл 70% этанола (для удаления копреципитированной соли), перевернуть пробирку несколько раз, центрифугировать снова в течение 10 мин при 8–12 тыс. об./мин;
- супернатант удалить;
- быстро высушить ДНК под вытяжкой;
- ДНК растворить в 100 мкл ТЕ-буфера, по крайней мере в течение 2 ч при 4° С (или оставить на ночь в холодильнике, для растворения высоко молекулярной ДНК требуется некоторое время), интенсивно перемешать ДНК, чтобы разрезать ее (для эффективной денатурации и отжига праймера ДНК должна быть разрезана).

Определение концентрации ДНК измерением OD при 260 нм:

- приготовить разведения от 1:20 до 1:50 в ТЕ-буфере, использовать наименьшее количество ДНК, насколько это возможно, в зависимости от вашего спектрофотометрического оборудования (60 мкл для микрокувет, Pharmacia photometer).

Учитывать результаты при 260 нм и 280 нм, чистые пробы ДНК дают соотношение ОП 260/ ОП 280 равное 1,8–2,0. Если пробы контаминированы белками, ОП 260 / ОП 280 будет значительно ниже;

- рассчитать концентрацию ДНК: 1 ОП 260 нм = 50 мкг (дц) ДНК/мл (дц = двухцепочечная ДНК).

В основном 15–100 мкг ДНК получаются из 5 мл лимфоцитов (100 мкг от здоровых пациентов, меньшие количества от пациентов на поздних стадиях ВИЧ-инфекции).

Буфера и растворы

- Протеиназа К (Serva или Sigma): приготовить 10 мг/мл основного раствора в стерильной бидистиллированной воде.
- ДСН (додecilсульфат натрия): приготовить 20% раствор в стерильной бидистиллированной воде.
- Буфер протеиназы К: 10 ммоль Трис-НСl рН 7,4; 30 ммоль NaCl; 20 ммоль ЭДТА рН 7,5.
- Приготовить 1,0 моль Трис-НСl рН 4,4 основного раствора: растворить 12,1 г основного триса в 80 мл бидистиллированной воды, добавить 7 мл концентрированной HCl, установить конечную рН (когда раствор охладится до комнатной температуры) и довести объем до 100 мл. Автоклавировать.
- Приготовить 5 моль NaCl основного раствора: растворить 29,2 г NaCl в 80 мл бидистиллированной воды. Довести объем до 100 мл бидистиллированной водой. Автоклавировать.
- Приготовить 0,25 моль основного раствора ЭДТА: к 50 мл бидистиллированной воды добавить 9,3 г этилендиаминтетраацетата $\times 2\text{H}_2\text{O}$, хорошо перемешать на магнитной мешалке. Довести рН до 7,5 с помощью 5 N NaOH. Довести объем до 100 мл бидистиллированной водой, автоклавировать.
- Для 100 мл буфера протеиназы К: 1 мл 1 моль Трис-НСl рН 7,4; 600 мкл 5 моль NaCl; 4 мл 0,5 моль ЭДТА (8 мл 0,25 моль ЭДТА); довести объем до 100 мл стерильной бидистиллированной водой (или автоклавировать), заморозить в аликвотах при -20°C .
- Фенол: для работы использовать бидистиллированный фенол (окисленные продукты фенола вызывают разрушение фосфодиэфирных связей и перекрестное взаимодействие ДНК и РНК, вследствие чего ДНК не может амплифицироваться Taq-полимеразой).

Примечание: фенол является очень едким и может вызывать сильные ожоги. При работе с ним необходимо одевать перчатки и защитную одежду. Все манипуляции должны проводиться в химическом боксе. При попадании фенола на кожу ее необходимо промыть большим количеством воды или вымыть с мылом и водой. Не использовать этанол!

– *Приготовление фенола для экстракции ДНК:* Фенол имеет кислую рН и должен доводиться до $\text{pH} > 7,8$, потому, что ДНК будет переходить в органическую фазу при кислой рН (в отличие от РНК).

Бидистиллированный фенол храниться при -20°C . Перед приготовлением фенол выдержать при комнатной температуре и расплавить при 68°C . Добавить гидроксихинолин (можно и без него) в конечной концентрации 0,1%. Гидроксихинолин является антиоксидантом, при окислении он окрашивается в красный цвет; его характерный цвет легче узнаваем и отличается от светло-розового цвета окисленного фенола. Кроме того, его желтый цвет способствует лучшему обнаружению органической фазы.

Добавить 1/4 объема 0,5 моль Трис основного к расплавленному фенолу (80% фенол). Хорошо перемешать и приготовить аликвоты частично очищенного фенола в фенолрезистентных пробирках и хранить при -20°C до последующего использования.

При необходимости достать аликвоту 80% фенола из морозильника, дать ему нагреться до комнатной температуры (80% фенол при комнатной температуре жидкий), добавить ТЕ-буфер (2–3 мл к 8 мл фенола, хорошо перемешать). После разделения 2 фаз удалить насколько возможно водную (верхнюю) фазу. Проверить рН водной фазы (с помощью рН бумажки), рН должна быть около 8,0. Раствор фенола может храниться в таком виде при 4°C до 1 мес. (беречь от света). Для использования в ПЦР рекомендуется приготовить аликвоты очищенного фенола в 1,5 мл эппендорфах и хранить их при -20°C .

Лучше закупить готовую для использования смесь фенол/хлороформ рН 8,0 для выделения ДНК.

– *Хлороформ / изоамиловый спирт*: Хлороформ денатурирует белки так же, как и фенол, и способствует разделению фаз; изоамиловый спирт уменьшает вспенивание и определяет размер интерфазы во время экстракции.

Перемешать 24 части по объему хлороформа с одной частью изоамилового спирта (24:1). Приготовить аликвоты в небольших плотно закрытых бутылках и хранить при 4° С или при –20° С.

При частых фенол/хлороформных экстракциях лучше приготовить смесь фенола и хлороформ/изоамилового спирта в соотношении 1:1 (25:24:1) и хранить ее при 4° С не более 1 мес.

– *Ацетат натрия (CH₃COONa)* : 3 моль рН 5,3

Растворить 24,6 г ацетата натрия примерно в 80 мл бидистиллированной воды, установить рН 5,3 уксусной кислотой и довести объем до 100 мл бидистиллированной водой. Автоклавировать и приготовить аликвоты в эппендорфах. Хранить при –20° С.

– *70% этанол*: 73 мл 96% этанола (абс.); 27 мл стерильной бидистиллированной воды хранить в аликвотах при –20° С;

– *TE-буфер*: 10 ммоль Трис-НСl рН 8,0; 1 ммоль ЭДТА.

Приготовить 1 моль Трис-НСl — основной раствор с рН 8,0, растворить 12,1 г Трис в 60 мл бидистиллированной воды, довести рН до 8,0 с помощью НСl, довести объем до 100 мл бидистиллированной водой и автоклавировать.

ПЦР-диагностика инфекции, вызванной разными субтипами вируса иммунного дефицита человека

Приготовить основной раствор ЭДТА pH 8,0: добавить 18,6 г динатрий этилендиаминтетраацетата $\times 2\text{H}_2\text{O}$ к 80 мл бидистиллированной воды, хорошо перемешать на магнитной мешалке. Довести pH до 8,0 NaOH (около 2 г пластинок NaOH), установить окончательную pH раствором NaOH. Довести объем до 100 мл бидистиллированной водой, автоклавировать.

Для 100 мл ТЕ-буфера: 1 мл 1 моль Трис-HCl pH 8,0; 200 мкл 0,5 моль ЭДТА pH 8,0; довести объем до 100 мл стерильной бидистиллированной водой, приготовить аликвоты и хранить при -20°C .

Примечание:

Основные растворы и буфера должны готовиться и распределяться на аликвоты в помещениях, где не ведется работа с ВИЧ. Необходимо использовать одноразовые пластиковые материалы, где это возможно, и пипетки для клеточного лизиса и экстракции ДНК.

Постановка ПЦР

Стандартный анализ: 50 мкл конечная концентрация

H ₂ O	29,75 мкл	
10 × ПЦР-буфер	5,00 мкл	1×
2,5 ммоль dNTP-Mix	4,00 мкл	0,2 ммоль
праймер 1 25 мкмоль (s)	0,50 мкл	0,25 мкмоль
праймер 2 25 мкмоль(as)	0,50 мкл	0,25 мкмоль
MgCl ₂ 25 ммоль	5,00 мкл	2,5 ммоль
Taq-полимераза	0,25 мкл	2,5 у
ДНК ¹ + H ₂ O	5,00 мкл	0,5 мкг

¹ Диагностическая проба 0,5 мкг ДНК или негативный контроль, различные количества позитивного контроля, обычно 100 и 10 копий клонированной ДНК-ВИЧ, разведенной в негативной ДНК из перевиваемых культур лимфобластоидных клеток.

MgCl₂ добавлять только перед внесением Taq-полимеразы.

Согласно литературным данным и исходя из нашего опыта по оптимизации условий ПЦР (концентрации трифосфатов, MgCl₂, праймеров, температура отжига), мы используем следующие условия для амплификации ДНК с различными парами праймеров:

Последовательности различных ВИЧ-1/-2 праймеров и положение генетических сегментов, которые амплифицируются, указаны в Приложении 1.

SK 38 / SK 39:
(ВИЧ-1 gag) 5,0 ммоль $MgCl_2$
200 мкмоль dNTPs
0,5 мкмоль праймеров (каждого)
температура отжига 55° C

SK 145 / SK 431:
(ВИЧ-1/-2 gag) 1,0 ммоль $MgCl_2$
200 мкмоль dNTPs
0,25 мкмоль праймеров
55° C

SK 100 / SK 104:
(ВИЧ-1/-2 gag) 2,0 ммоль $MgCl_2$
200 мкмоль dNTPs
0,25 мкмоль праймеров
52° C

SK 68i /SK 69i:
(ВИЧ-1 env) 2,5 ммоль $MgCl_2$
200 мкмоль dNTPs
0,25 мкМ праймеров
55° C

pol 3 / pol 4:
(ВИЧ-1 pol) 2,0 ммоль $MgCl_2$
200 мкМ dNTPs
0,25 мкмоль праймеров
55° C

ПЦР-диагностика инфекции, вызванной разными субтипами вируса иммунного дефицита человека

SK 89 /SK 90:
(ВИЧ-2 LTR)

2,0 ммоль $MgCl_2$
200 мкмоль dNTPs
0,25 мкмоль праймеров
60° C

JA4/JA7
(ВИЧ-1 gag наружные)

7 ммоль $MgCl_2$
200 мкмоль dNTPs
0,1 мкмоль праймеров
47° C

JA5/JA6
(ВИЧ-1 gag внутренние)

3 ммоль $MgCl_2$
200 мкмоль dNTPs
0,1 мкмоль праймеров
41° C

β -глобин
GH20/PC04

2,0 ммоль $MgCl_2$
200 мкмоль dNTPs
0,5 мкмоль праймеров
55° C

Программа ПЦР:

3 мин, 93° C
1 мин, 94° C
1 мин, температура отжига 35 цик-
лов
1 мин, 72° C
4° C

ПЦР-диагностика инфекции, вызванной разными субтипами вируса иммунного дефицита человека

Для всех праймеров кроме β -глобина 35 циклов, с β -глобином — 30 циклов. Приведенный выше протокол позволяет обнаружить ≤ 10 копий ДНК ВИЧ.

Проведение ПЦР:

– приготовить протокол для мастер-микста в зависимости от количества используемых проб и праймеров

Например: должны быть проанализированы 4 пробы. Приготовить 5× мастер-микст:

		конечная концентрация
ПЦР-буфер 10×	25,00 мкл	1×
MgCl ₂ 25 ммоль	25,00 мкл	2,5 ммоль
дНТФ 2,5ммоль Mix	20,00 мкл	200 мкмоль
праймер 1	2,50 мкл	0,25 мкмоль
праймер 2	2,5 мкл	0,25 мкмоль
Taq-полимераза 5у/мкл	1,25 мкл	

- довести объем водой до 50 мкл (учитывая объем ДНК), включить в эксперимент несколько отрицательных контролей (отрицательный контроль ДНК и мастер-микст контроль) и положительные контроли;
- вначале внести воду;
- приготовить мастер-микст и добавить его в нужное для исследования количество пробирок в необходимом объеме;
- добавить исследуемые и контрольные ДНК;
- добавить 1 каплю светлого минерального масла к каждой пробе;
- реагенты:

<u>10 × ПЦР- буфер:</u>	100 ммоль Трис-НСl рН 8,3 при 25° С 500 ммоль КСl (0,01% желатин) использовать только особо чистые реактивы;
<u>25 ммоль MgCl₂: дНТФ:</u>	использовать только особо чистую соль; 100 ммоль основного раствора от Pharmacia или 10 ммоль основного раствора от Perkin Elmer Cetus (сверхчистые по качеству);
<u>Тaq-полимераза:</u>	Ампли-Тaq, рекомбинантная Тaq-полимераза, Perkin Elmer Cetus.

Примечания:

- хранить ПЦР-буфер и MgCl₂ основной раствор при 4° С, готовить мастер-микст на льду, добавлять MgCl₂ в конце перед внесением Тaq-полимеразы;
- использовать пипетки, работать в лаборатории, в которой не производится как выделение ДНК, так и анализ продуктов ПЦР. Следует использовать ламинар или бокс с перчатками, предназначенные только для этой цели (оснащенные УФ короткой длины волны);
- приготовить аликвоты из различных реагентов в свободном от ВИЧ помещении и хранить их при –20° С, использовать каждую аликвоту только один раз;
- хорошо перемешать все растаявшие реагенты и Тaq-полимеразу (избегайте образования пузырьков воздуха);
- положительные контроли готовить в последнюю очередь;

ПЦР-диагностика инфекции, вызванной разными субтипами вируса иммунного дефицита человека

- рекомендуется хранить пробы на льду после добавления ДНК вплоть до начала амплификации, т.к. Taq-полимераза работает (медленно) при комнатной температуре. Это может привести к образованию неспецифических продуктов;
- после ПЦР хранить пробы при 4° или при –20° С.

Анализ результатов ПЦР

Пробу следует рассматривать как ПЦР-положительную только если каждая из трех различных пар специфичных для разных участков генома ВИЧ праймеров даст положительный результат с двумя независимо выделенными ДНК (табл. 1).

Таблица 1

Пары праймеров			Интерпретация
gag SK/38/39	env SK/68/69	pol pol 3/4	
+/+	+/+	+/+	положительный
+/+	+/+	+/-	
+/+	+/-	+/+	
+/-	+/+	+/+	
+/+	+/+	-/-	
+/+	-/-	+/+	
+/+	+/-	+/-	повторить; если результат повторяется, то считать его положительным
+/-	+/+	+/-	
+/-	+/-	+/+	
+/+	-/-	-/-	
-/-	+/+	-/-	
-/-	-/-	+/+	
+/-	+/-	+/-	повторить; если результат повторяется; то считать его неопределенным
+/-	+/-	-/-	
+/-	-/-	+/-	
-/-	+/-	+/-	
+/-	-/-	-/-	
-/-	+/-	-/-	
-/-	-/-	+/-	
-/-	-/-	-/-	отрицательный

Анализ продуктов ПЦР

Электрофорез в агарозном геле (горизонтальный):

- приготовить 4% агарозу (NuSieve 3:1, FMC BioProducts) в 1×TAE буфере (25 мл, GIBCO BRL minigel apparatus), добавить EtBr в конечной концентрации 0,5 мкг/мл;
- залить расплавленную агарозу в форму для заливки геля. Разместить гребенку(и) (толщина зубцов 1 мм). Оставить гель на 20 мин для затвердевания агарозы;
- залить гель TAE-буфером, содержащим 0,5 мкг/мл EtBr;
- осторожно удалить перегородки и гребенку. Убедиться, что гнезда в агарозе не повреждены;
- за время застывания агарозы подготовить пробы для анализа.

Перенести по 16 мкл из каждого образца ПЦР в чистую пробирку (нет необходимости выделять минеральное масло хлороформом, остатки масла будут плавать сверху). Добавить 3 мкл буфера с бромфеноловым синим, перемешать и внести 17 мкл каждой пробы (для других гребенок и гелей довести общий объем в соответствии размеру гнезда). В основном 1/5–1/10 части продукта ПЦР достаточно для анализа.

Молекулярная масса ДНК-стандарта: 123 пары нуклеотидов, 1 мкг на лунку;

- проводить электрофорез в геле в течение 1 ч при 65 В (5 В/см). ДНК заряжена отрицательно, она будет двигаться к аноду (+). Во время электрофореза молекулы ДНК разделяются согласно молекулярной массе;
- определить месторасположение ДНК в геле на транслюминаторе (УФ 302 нм) и сфотографировать (УФ-фильтр). Бромид этидия (EtBr) включается в двухцепочечную ДНК и в УФ-свете полосы ДНК флюоресцируют (из-за EtBr). Молекулярная масса продуктов ПЦР (или длина молекул ДНК в п.н.) может быть определена согласно молекулярной массе стандарта;

– буфера:

50 × ТАЕ: 242 г основного Триса,
57,2 мл уксусной кислоты (CH₃COOH),
100,0 мл ЭДТА 0,5 моль рН 8,0.

Растворить в 800 мл бидистиллированной воды, довести до 1 л водой. Для использования в гелевом электрофорезе развести 1:50 до 1×ТАЕ (40 ммоль Трис-ацетата, 1ммоль ЭДТА) и добавить EtBr в конечной концентрации 0,5 мкг/мл;

– загрузочный буфер:

10 × фиколл: 0,25% бромфенолового голубого (БФГ),
25% фиколл, (тип 400, Pharmacia),
20 ммоль ЭДТА в бидистиллированной воде.

Вместо фиколла 400 может быть использован 50% глицерин или сахароза. Загрузочный буфер увеличивает плотность пробы, способствуя ее погружению. Краситель(и) служит маркером подвижности; в 4% агаровом геле БФГ движется приблизительно с такой же скоростью как и 30 п.н.(пар нуклеотидов) молекулы; при нейтральном и щелочном рН БФГ;

–*EtBr (бромид этидия)*:

EtBr сильный мутаген, поэтому необходимо работать в перчатках! После использования раствора, содержащие EtBr, следует очистить, приготовить 10 мг/мл основной раствор в воде и хранить его в защищенном от света месте. Для стабильности ДНК EtBr используется в концентрации 0,5 мкг/мл (5 мкл/100 мл буфера);

– 4% агароза:

Добавить 4 г агарозы к 100 мл 1×ТАЕ буфера и растопить агарозу или кипячением или в микроволновой печи. Убедиться, что агароза полностью расплавилась. Можно приготовить большее количество агарозы. Разделить ее на части, необходимые для 1 геля (например, 25 мл в 50 мл флаконах) и расплавлять ее, когда будет необходимо.

Для повышения чувствительности метода ПЦР можно далее провести исследование пробы гибридизацией по Саузерну.

Щелочной перенос ДНК с агарозного геля на нейлоновую мембрану:

- приготовить подставку для капиллярного переноса . В качестве буфера для переноса используется 0,4 N NaOH (щелочной перенос). Намочить фильтр ватман 3 мм (или любую другую подходящую фильтровальную бумагу), которая используется в качестве моста в 0,4 N NaOH;
- отрезать нейлоновую мембрану Hybond N+ (Amersham, #RPN 3038) в соответствии с размером геля (надеть перчатки). Приготовить 2 листа ватмана 3 мм и бумажные полотенца того же размера;
- нейлоновую мембрану намочить в воде;
- гель расположить вверх дном на подставке;
- нейлоновую мембрану поместить на гель (удалить все образовавшиеся пузырьки воздуха, они будут нарушать перенос). Отметить на мембране лево/право, верх/низ в конце эксперимента;
- положить листы сухого ватмана 3 мм на нейлоновую мембрану, а затем сухие бумажные полотенца. Убедиться, что жидкость может впитываться только в гель и нейлоновую мембрану (использовать парафильм);
- расположить сверху стеклянную пластинку, а затем груз (например, флакон, наполненный водой), для 4% геля используйте 750 г веса;

ПЦР-диагностика инфекции, вызванной разными субтипами вируса иммунного дефицита человека

- капиллярный перенос следует проводить по крайней мере 4 ч или в течение ночи (небольшие фрагменты переносятся намного быстрее, фрагменты ДНК большие чем в 1000 п.н. должны переноситься более 12 ч). При необходимости сменить бумажные полотенца;
- хорошо промыть мембрану в 5×SSC (не более 1 мин), высушить мембрану на воздухе (на этом этапе мембрана может храниться при 4° С или непосредственно использоваться для гибридизации).

– реагенты:

20 × SSC: 3 моль NaCl 175,3 г

0,3 моль цитрат натрия × H₂O 88,3 г

Растворить соли в 800 мл бидистиллированной воды, установить рН 7,0 с помощью NaOH, довести объем до 1 л водой.

Чтобы получить 5 × SSC, разбавить водой в соотношении 1:4.

0,4N NaOH: растворить 16 г NaOH в бидистиллированной воде, довести объем до 1 л.

Гибридизация с ВИЧ-специфическими пробами

ECL-система (Amersham)

Протокол детально описывается в методике, приложенной к набору.

Приготовление ВИЧ-1 специфических проб ПЦР:

- в качестве матрицы для ПЦР используется плаزمида pGem3-BRU или ДНК из инфицированных ВИЧ клеток;

- провести реакцию ПЦР, используя 0,5 мкл 10 нг/мкл раствора pGem3-BRU (приготовление по W. Weigelt, 1988), использовать те же условия, что и для специфических пар праймеров отдельного гена, но провести 30 циклов. Использовать dUTP, гибридизация dU-ДНК работает также эффективно как и dT-ДНК;
- продукт проверить электрофорезом в геле;
- провести вторую ПЦР используя 0,5 мкл или меньше продукта первой ПЦР (первоначальная матрица достаточно разбавлена, это не будет мешать мечению пробы и гибридизации). Провести 8 анализов, для ПЦР опять использовать 30 циклов. Хранить продукт от первой ПЦР замороженным, он может быть использован снова для приготовления проб;
- продукт проверить электрофорезом в геле;
- удалить минеральное масло с помощью хлороформа (добавить 1 объем хлороформа, перемешать на вортексе и центрифугировать при 8–12 тыс.об./мин в течение 5 мин, верхняя фаза водная, повторить процедуру еще раз);
- собрать водные фазы.

Очистка продукта ПЦР

Перед мечением продукта ПЦР остатки праймеров и дНТФ должны быть удалены. Существует несколько методов.

Мы используем JetSorb (Genomed) или Qiagen-KITs для очистки ДНК (протокол прилагается к набору). Для метки с помощью EKL-KIT ДНК должна быть разбавлена до концентрации 10 мкг/мл водой.

Sephadex G-50 spin colum

Sephadex G-50 используется как молекулярный фильтр с пропускной границей <72 п.н. Добавить Sephadex G-50 к дистиллированной стерильной воде (1 г сухого порошка дает 16 мл соединения). Промыть набухшую смолу (по крайней мере в течение 1 ч или на протяжении ночи) дистиллированной водой несколько раз, чтобы удалить растворимый декстран. Наконец, уравновесить Sephadex в TE- или TES-буфере (TES=TE с 100 ммоль NaCl), автоклавировать (10lb/sq.in. в течение 15 мин). Храните при -4° C. Перед использованием позволить суспензии Sephadex нагреться до комнатной температуры.

Приготовление колонки в 1 мл шприце:

- приготовить «основу» с силиконовой стекловатой, поместить шприц в подходящую пробирку (например, 12 мл пластиковую пробирку), наполнить суспензией Sephadex, продолжать наполнение Sephadex до тех пор пока колонка (при $1\times g$) не заполнит шприц;
- центрифугировать колонку при 1800 об./мин ($550\times g$) в течение 2 мин при комнатной температуре; после центрифугирования колонка имеет сухой внешний вид, упакованная колонка должна иметь объем между 0,8 и 1,0 мл;
- поместить шприц в чистую пробирку;
- внести пробу (около 100 мкл) прямо на Sephadex (в середину колонки, не на края);
- центрифугировать снова в течение 4 мин при 1800 об./мин;
- перенести элюат из пробирки, объем элюата должен быть таким же, как и пробы;
- определить концентрацию ДНК и разбавить ее до 10 мкг/мл.

II. Работа с РНК:

Всю лабораторную посуду, предназначенную для работы с РНК (пипетки, цилиндры, флаконы, чашки, пробирки и т.п.), следует прожечь при 180° C в течение 8 ч для предотвращения контаминации РНК-азами.

По возможности необходимо стерилизовать пластиковую посуду. Неоднократно используемую пластиковую посуду следует залить 0,1% раствором DEPC в воде, инкубировать в течение 2 ч, промыть несколько раз стерильной водой и прогреть при 100° С в течение 15 мин. Необходимо использовать чистые коробки стерильных наконечников, если они готовятся в лаборатории, и одевать перчатки (см. ниже).

Рекомендуется помещать отдельно любую стеклянную и пластиковую посуду, которая должна быть использована в эксперименте с РНК (отмечать их отдельно).

Основной потенциальный источник контаминации РНК-азой — руки исследователя. Следует одевать и часто менять перчатки.

Все растворы должны быть приготовлены с использованием чистой стеклянной посуды (без РНК-азы), стерильной воды и химических реактивов, которые предназначены для работы с РНК (работать с обжигаемым шпателем или не использовать его вообще). Где возможно воду и растворы необходимо выдержать с 0,1% DEPC (Диэтилпиракарбонат, Sigma) в течение 1–2 ч при комнатной температуре (хорошо перемешать на магнитной мешалке) а затем автоклавировать (разрушение DEPC). Буфера, содержащие Tris не должны использоваться с DEPC !

DEPC вызывает рак и работать с ним следует особенно осторожно (химический вытяжной шкаф, перчатки).

Выделение РНК из сыворотки и плазмы:

– центрифугировать до 5 мл плазмы или сыворотки, не содержащей клеток, в SW 50,1 роторе при 45000 об./мин в течение 50 мин при 4° С в ультрацентрифуге Beckman (работать в ламинарном боксе), 45000 об./мин, 55 мин (замороженные пробы также могут быть использованы, но пробы должны быть заморожены (–70° С) настолько быстро, насколько это возможно после отбора и удаления клеток и клеточных обломков);

- вируссодержащий осадок растворить в 400 мкл денатурирующего раствора и перенести в пробирку типа «Эппендорф» на 1,5 мл. Поскольку вы можете получить очень небольшое количество РНК, необходимо добавить наполнитель РНК (например, тРНК E.coli, Boehringer). Инфекционный вирус на этой стадии инактивируется;
- добавить 40 мкл 2 моль ацетата натрия рН 4,7, хорошо перемешать;
- добавить 440 мкл смеси фенол/ CHCl_3 /изоамиловый спирт. Под влиянием этой смеси ДНК переходит в интерфазу/органическую фазу, в то время как РНК остается в водной фазе;
- перемешать на вортексе в течение 30 с и охладить на льду в течение 20 мин;
- центрифугировать на микроцентрифуге при >12000 об./мин в течение 10 мин при 4°C ;
- собрать водную фазу, перенести ее в чистую пробирку и провести экстракцию хлороформ/изоамиловым спиртом (1 объем), перемешать на вортексе и снова центрифугировать в течение 10 мин при >12000 об./мин при 4°C ;
- провести преципитацию изопропанолом (добавить 1 объем изо-пропанола) в течение 1 ч при -20°C ;
- центрифугировать пробы в течение 45 мин при >12000 об./мин при 4°C ;
- осадок промыть 75% этанолом и высушить под вакуумом (добавить 0,7 мл 75% этанола, хорошо перемешать на вортексе и снова центрифугировать);
- осадок ресуспендировать в бидистиллированной воде (выдержанной с DEPC), переносчик тРНК следует использовать в концентрации 1 мкг/10мл, осадок из диагностируемой пробы (5 мл плазмы) ресуспендируется в 50 мкл H_2O ;
- хранить РНК при -70°C .

РНК может быть приготовлена из проб без ультрацентрифугирования (смешивание с 6 моль GuSCN, см. приготовление цитоплазматической РНК) или из меньшего объема пробы (для ультрацентрифугирования пробы необходимый объем следует довести PBS-буфером).

Реактивы и буфера

Денатурирующий раствор: 4,0 моль.....(GuSCN -гуанидин тиоционат н-р GIBCO-BRL #540-5535UA),
25 ммоль цитрат натрия pH 7,0,
0,5% N-лаурилсаркозин (Sigma),
0,1 моль 2-меркаптоэтанол.

Для 100 мл раствора: 47,2 г GuSCN, растворите примерно в 30 мл бидистиллированной воды; 2,5 мл 1 моль цитрата натрия pH 7,0; 5,0 мл 10% N-.....; довести объем до 100 мл бидистиллированной водой, раствор стабилен в течение 3 мес. при комнатной температуре, этот раствор не следует выдерживать с DEPC, необходимо использовать прожженную стеклянную посуду.

Непосредственно перед использованием добавить к 10 мл раствора 72 мкл 2-меркаптоэтанола (0,1 моль);

С GuSCN следует работать осторожно: яд! (вытяжной шкаф, перчатки)

Фенол (водоочищенный):

Для выделения РНК следует использовать водоочищенный фенол (кислая pH), так как РНК гидролизуется при щелочной pH и остается в интерфазе во время экстракции.

Нагреть фенол до комнатной температуры. Расплавить его при 68° С, добавить 1 объем бидистиллированной воды и гидроксихинолина в конечной концентрации 0,1%, перемешать. После разделения фаз удалить насколько возможно водную фазу. Очищенный фенол разделить на аликвоты и заморозить;

Хлороформ/изоамиловый спирт: как обычно в соотношении 24 : 1.

Выделение РНК из цитоплазмы инфицированных клеток (моноклеарные или культуральные клетки):

- промыть клетки 2 раза в охлажденном ФСБ (центрифугировать при 8 тыс.об./мин в течение 5 мин при 4° С, перед второй отмывкой перенести клетки в пробирки типа «Эппендорф» на 1,5 мл);
- ресуспендировать клетки (1×10 клеток максимально) в 200 мкл лизирующего буфера (на этой стадии инфекционный вирус инактивируется из-за NP 40, плазматические мембраны лизируются, но не мембрана ядра). Если вы используете меньше/больше клеток, то необходимо уменьшить/увеличить все объемы;
- инкубировать на льду в течение 5 мин;
- центрифугировать в течение 5 мин при 1 тыс.об./мин в микроцентрифуге при 4° С (ядра осаждаются);
- осторожно удалить супернатант (цитоплазма), избегать забора ядерного осадка, перенести супернатант в пробирку типа «Эппендорф»;
- добавить 400 мкл денатурирующего раствора В и перемешать;
- добавить 60 мкл NaOAc 2 моль рН 4,7 (1/10 объема), перемешать;
- добавить 1 объем кислой смеси фенол/хлороформ/изоамиловый спирт (фенол/хлороформ 5:1), перемешать и выдержать в течение 20 мин на льду. ДНК главным образом останется в органической фазе, тогда как РНК в водной фазе;
- центрифугируйте при 12 тыс.об./мин в течение 10 мин при 4° С;
- перенести водную (верхнюю) фазу в чистую пробирку (избегать забора материала из интерфазы);

- провести еще одну экстракцию с 1 объемом смеси хлороформ/изоамиловый спирт (24:1);
- провести преципитацию супернатанта с 1 объемом 2-пропанола в течение 1 ч при -20°C ;
- центрифугировать при 12 тыс.об./мин при 4°C (в предварительно охлажденном роторе) в течение 30 мин;
- промыть осадок дважды охлажденным на льду 75% спиртом и быстро высушить под вакуумом;
- осадок РНК ресуспендировать в 100 мкл бидистиллированной воды (выдержанной с DEPC);
- проверить адсорбцию при 260 нм ($40\text{ мкг/мл} = 1\text{ ОП}$), 1:100 dil в H_2O
- хранить РНК при -70°C .

Реагенты

ФСБ: как указано выше.

Лизирующий буфер: 10 ммоль Трис-НСl рН 7,4;
10 ммоль NaCl;
3 ммоль MgCl_2 ;
0,5% NP40 (V/V) (Sigma, детергент).

Для 100 мл лизирующего буфера: 1 мл 1моль Трис-НСl рН 7,4; 200 мкл 5моль NaCl; 300 мкл 1моль MgCl_2 ; 0,5 мл NP40.

Довести объем до 100 мл и хорошо перемешать, чтобы гомогенизировать NP40.

Денатурирующий 6 моль GuSCN (гуанидин тиоционат);
раствор В: 37,5 ммоль цитрата натрия pH 7,0;
0,75% N-лаурилсаркозин;
0,15М 2-меркаптоэтанол.

Для 100 мл раствора: 70,8 г GuSCN (яд) растворить приблизительно в 30 мл бидистиллированной воды; 3,75 мл 1моль цитрата Na pH 7,0; 7,5 мл 10% N-лаурилсаркозин.

Довести объем до 100 мл бидистиллированной водой, раствор стабилен в течение 3 мес. при комнатной температуре (не выдерживать с DEPC). Непосредственно перед использованием добавить 2-меркаптоэтанол (для 10 мл используйте 108 мкл).

Постановка РТ-ПЦР и учет результатов реакции

Обработка ДНК-азой I

Чтобы убедиться, что выделенная РНК не содержит ДНК, необходимо испытывать +/- РТ пробы параллельно или инкубировать аликвоту, которая должна анализироваться, с ДНК-азой I без РНК-азы (Promega) непосредственно перед проведением обратной транскрипции;

Инактивировать ДНК-азу I нагреванием в течение 10 мин при 93° С:

- 5 мкл РНК (от 1/3 до 1/5 выделенной из плазмы РНК); или 0,25–0,5мкг цитоплазматической РНК, или определенные количества концентрированных стандартов;
- 5 мкл смесь ДНК-азы I; 10 ммоль Трис-НСl pH 7,5; 3 ммоль MgCl₂; 1ммоль DTT; 0,25 мкл РНК-азы (10 ЕД); 10 ЕД ДНК-азы I без РНК-азы (Boehringer);
- добавить 1 каплю минерального масла;
- инкубировать в течение 10 мин при 37° С, инактивировать ДНК-азу при 93° С в течение 7 мин и охладить до 4° С;

– специфичность субстрата РТ-ПЦР может быть оценена при выдерживании РНК с 10 ЕД РНК-азы (Boehringer, без ДНК-азы) в течение 5 мин при 37° С перед обратной транскрипцией.

Пояснение: для образцов плазмы включить инкубацию с ДНК-азой.

Обратная транскрипция

Стандартный объем обратной транскрипции: 20 мкл

10 мкл РНК (+/- ДНК-аза I)

+10 мкл RT-mix (+/-RT)

20 мкл

Как обратная транскрипция, так и ПЦР может проводиться с dUTP вместо dTTP для того чтобы избежать образования продуктов ПЦР содержащих dT.

Затравка может осуществляться случайными олиго-dT вместо специфических праймеров; объем и количество РНК может быть увеличено, а ДНК разрезана для ПЦР с различными специфическими парами праймеров. Как оказалось, малые количества РНК определяются лучше с помощью специфической затравки:

	+ДНК-аза I	-ДНК-аза I	конечная
концентрация			
DTT 100 ммоль	0,9 мкл	1,0мкл	5ммоль
10×ПЦР-буфер	2,0 мкл	2,0мкл	1×
MgCl ₂ 25 ммоль	1,2 мкл	2,5 мкл	3 ммоль
дНТФ 2,5 ммоль	1,6 мкл	1,6 мкл	200 мкмоль
антисмысловой праймер	1,0 мкл	1,0 мкл	10pMol/20мкл
10 мкмоль			

ПЦР-диагностика инфекции, вызванной разными субтипами вируса иммунного дефицита человека

(например, SK 39)			0,5 мкмоль
RNasin 40 у/мкл	0,5 мкл	0,5 мкл	20 у/20мкл
(ингибитор РНК-азы, Promega)			
Superscript (BRL)	0,25 мкл	0,25 мкл	50 у/20мкл
200 у/мкл			
РНК	10,00 мкл	10,00 мкл	
H ₂ O (DEPC)	2,55 мкл	1,15 мкл	

- добавить RT-mix к РНК обработанной РНК-азой или разделить РНК и воду (наслаиванием 1 капли минерального масла);
- денатурировать РНК, которая не обрабатывалась РНК-азой, в течение 10 мин при 65° С, охладить до 4° С;
- работать с обычной предосторожностью для ПЦР! Приготовить мастер-микст для обработки ДНК-азой I и обратной транскрипции;
- включить положительный и отрицательный контроли;
- добавить мастер-микст для ОТ к денатурированной РНК;
- инкубировать пробы в течение 30 мин при 40° С (для случайной затравки: 37° С);
- инактивировать ОТ в течение 5 мин при 93° С;
- охладить на льду.

ПЦР:

- к 20 мкл продукта обратной транскрипции добавить 80 мкл следующей смеси для ПЦР:

конечная концентрация в 100 мкл

10 × ПЦР-буфер	8,0 мкл	1 ×
MgCl ₂ 25ммоль	17,6 мкл	5,0 ммоль
dNTP mix 2,5ммоль	6,4 мкл	200мкмоль
антисмысловой праймер 25мкмоль (н-р SK 39)	1,6мкл	0,5мкмоль
смысловой праймер 25мкмоль	2,0 мкл	0,5 мкмоль
H ₂ O	43,9 мкл	
Taq-полимераза 5u/мкл	0,5мкл	2,5 u

- приготовить мастер-микст как обычно (использовать концентрацию необходимую для отдельной пары праймеров, можно использовать разбавление ДНК, пробы по 50 мкл работают также хорошо);
- ввести соответствующую программу в термоциклер;
- продукты амплификации анализировать как обычно.

Приложение

Пары праймеров, положение в геноме, размеры продуктов амплификации и последовательности

№ п/п	Праймеры	+/- це пи	Специфичность	ген	Положение	Размер продукта ПЦР	Последовательность 5' — 3'
1.	SK38 SK39	+ -	ВИЧ-1	gag	1541–1578 1665–1638	114 п.н.*	5' ATAATCCACSTATCCCAGTAGGA-GAAAT 3' 5' TTTGGTCTTGTCTTATGTCCAGAAATGC 3'
2.	SK145 SK431	+ -	ВИЧ-1 ВИЧ-2 ВИЧ-1 ВИЧ-2	gag	1366–1395 1121–1150 1507–1480 1259–1232	141 п.н. ВИЧ-1 138 п.н. ВИЧ-2	5' AGTGGGGGGACATCAAGCAGCCCAATGCAAAT 3' 5' TGCTATGTCAGTTCSCCTTGGTTC TCT 3'
3.	SK100 SK104	+ -	ВИЧ-1 ВИЧ-2 ВИЧ-1 ВИЧ-2	gag	916–934 1132–1150 1206–1185 1422–1401	290 п.н; ВИЧ-1/ВИЧ-2	5' ATCAAGGAGCCATGCAAAT 3' 5' CCTTTGGTCTTGTCTTATGTC 3'

Окончание таблицы

№ п/п	Праймеры	+/- цепи	Специфичность	ген	Положение	Размер продукта ПЦР	Последовательность 5' — 3'
4.	SK68 SK69	+ -	ВИЧ-1	env	7342–7361 7483–7464	141 п.н.	5' AGCAGCAGGAAGCACTATGG 3' 5' CCAGACTGTGAGTTGCAACAG 3'
5.	pol3 pol4	+ -	ВИЧ-1	pol	2357–2381 2664–2639	307 п.н.	5' TGGGAAGTTCAATTAG- GAATACC 3' 5' CCTACATACAAATCATC- CATGTATTG 3'
6.	SK89 SK90 SK91	+ - +	ВИЧ-2	LTR	9432–9449 9596–9577 9524–9561	164 п.н.	5' AGGAGCTGGTGGGGAACG 3' 5' GCACTGGTGAGAGTCTAGCA 3' 5' TTGAGCCCTGGGAGTTCTCTCCA GCACTAGCA GGTAG 3'
7.	JA4** JA5 JA6 JA7	+ + - -	ВИЧ-1	gag	1319–1338 1446–1465 1577–1558 1615–1596	130 п.н.	5' GAAGGCTTTCAGCCCAGAAG 3' 5' ACCATCAATGAGGAAGCTGC 3' 5' TATTTGTTCTGAAGGGTAG 3' 5' TCTCCTACTGGGATAGGTGG 3'