

# 新型HIV-1核酸定量内标构建及验证

李庆<sup>1</sup> 刘芳<sup>1</sup> 岳秀娟<sup>1</sup> 李冰<sup>2</sup> 陈德喜<sup>1</sup>

**【摘要】目的** 构建一种稳定的以病毒颗粒为基础的HIV核酸定量检测内标。**方法** 在实验室原有新型表型耐药载体pcDNA6.2-LTR gagpol的基础上, 利用PCR扩增法在不改变p24保守区基础上突变核苷酸, 经Gateway重组得到含突变碱基的pNL43-ΔENV-LUC-ATTR表达载体, 该载体与水疱性口膜炎病毒(VSV)质粒共转染293细胞48 h后收集上清中HIV-1内标假病毒颗粒, 检测p24抗原含量, 定量假病毒滴度, 以倍比稀释内标质粒、内标质粒与阳性标本混合品、内标假病毒颗粒与阳性标本混合品为模板进行实时定量PCR法, 观察内标质粒、内标假病毒颗粒内的核酸与内标引物探针的匹配情况, 以及是否受样本探针引物的干扰。**结果** 定点突变表型耐药载体pcDNA6.2-LTR gagpol内的p24保守区片段; 获得仅具有1次感染性的HIV-1假病毒颗粒( $3.61 \times 10^9$  IU/ml); p24抗原检测含量为283.2 pg/ml; 实时定量PCR法确定内标质粒、内标假病毒颗粒内的核酸与内标引物探针匹配良好, 内标引物探针对于阳性标本探针无干扰。**结论** 成功建立了一种以假病毒颗粒为基础的HIV-1核酸定量检测内标。

**【关键词】** 获得性人类免疫缺陷病毒1型; 核酸定量; 病毒颗粒; 内标

**Construction and verification of a novel HIV-1 nucleic acid quantitative internal standard** Li Qing<sup>1</sup>, Liu Fang<sup>1</sup>, Yue Xiujuan<sup>1</sup>, Li Bing<sup>2</sup>, Chen Dexi<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Beijing Institute of Hepatology, <sup>2</sup>Office of Reform and Performance, Beijing You'an Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Corresponding author: Chen Dexi, Email: dexichen@ccmu.edu.cn

**【Abstract】Objective** To construct a stable HIV-1 nucleic acid quantitative detection of internal standard based on virus particles. **Methods** p24 region was mutated without changing p24 conservative district and inserted into phenotype resistant vector pcDNA6.2-LTR gagpol by PCR amplification method, following by the construction of pNL43-ΔENV-LUC expression vector containing the specific mutation base by Gateway recombinant technology. This vector and VSV plasmid were cotransfected into 293T cell lines and HIV-1 pseudotyped virus was collected from the supernatant 48 hours later. The loads of HIV-1 were quantified by detection of p24 antigen titers. The multiproportion diluted liquids of the internal standard plasmid, the mixture of the internal standard plasmid and positive samples and the mixture of the internal standard pseudotyped viral particles and positive samples were used as the template for the real-time quantitative PCR to verify whether the nucleic acids levels matched the probes of internal standard plasmid, and whether they could be interfered by the sample probe and primers. **Results** The fragment of specific site mutation in p24 conservative region was inserted into the phenotype resistant vector pcDNA6.2-LTR gagpol. The detective p24 antigen was 283.2 pg/ml, while HIV-1 pseudotyped virus was  $3.61 \times 10^9$  IU/ml. Internal standard plasmid and internal standard pseudotyped viral particles matched the probes of internal standard plasmid, which were confirmed using real-time quantitative PCR and not interfered by the sample probe and primers. **Conclusion** The novel internal standard constructed with pseudotyped virus could be used to detect plasma HIV-1 level.

**【Key words】** Human immunodeficiency virus type 1; Nucleic acid quantitative; Pseudotyped virus; Internal standard

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2017.01.005

基金项目: 首都卫生发展科研专项项目(No. 首发2014-1-1151); 北京市卫生系统高层次卫生技术人才培养计划(No. 2013-3-072)

作者单位: 100069 北京, 首都医科大学附属北京佑安医院北京市肝病研究所<sup>1</sup>、改革与绩效办公室<sup>2</sup>

通信作者: 陈德喜, Email: dexichen@ccmu.edu.cn

人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)是获得性免疫缺陷综合征(acquired immunity deficiency syndrome, AIDS)的病原体,其主要传染途径为血液途径、性途径以及母婴传播。据联合国艾滋病规划署(The Joint United Nations Programme on HIV/AIDS, UNAIDS)和世界卫生组织报道,截至2013年底,全球AIDS新发感染约210万人,相关死亡150万人。虽然,过去15年里全球对AIDS诊疗取得了较大进展,但不同地区AIDS的流行趋势并不相同,某些地区AIDS流行趋势仍然严峻。我国自1985年6月发现首例HIV感染者以来,在抗击AIDS方面取得了可喜成绩。但仍是世界上感染HIV人数最多的15个国家之一,截至2015年10月底,全国报告存活HIV感染者和AIDS患者共计57.5万例,死亡17.7万人,2015年1月至10月新报告9.7万病例<sup>[1]</sup>。因此,通过实验室检测技术,尽早发现HIV感染者并控制其传播非常重要。

目前HIV的实验室诊断技术包括:HIV培养、抗-HIV检测、p24抗原检测以及HIV-1 RNA测定等,其中HIV-1 RNA测定最为灵敏,已广泛用于HIV-1窗口期诊断、垂直传播的早期诊断以及抗病毒治疗患者的临床效果监测。目前市面上成熟的核酸定量检测试剂盒包括:罗氏RT-PCR(Amplicor HIV-1 Monitor Test)、雅培RT-PCR(Amplicor HIV-1 test)、梅里埃NASBA(Neuclisens HIV-1 QT)、西门子bDNA(Versant HIV-1 RNA 3.0 Assay)<sup>[2-3]</sup>。但进口试剂成本非常高,我国实际应用中试剂价格昂贵,严重限制了在我国的推广和应用<sup>[4-6]</sup>。而国产试剂的稳定性和灵敏性却不佳,在临床上仍未得到广泛应用。该检测的关键点在于引物探针与目标序列的匹配。因此,本课题组根据多年的检测经验及HIV序列的特异性和保守性设计了该载体,致力于开发检测灵敏性和特异性均较好的国产HIV-1检测载体,现报道如下。

## 材料与方法

### 一、材料

1. 仪器: Thermo Scientific 细胞培养箱购自美国Thermo公司; Vii7定量PCR仪购自美国ABI公司; Xmark酶标仪购自美国Bio-rad公司; PCR仪购自美国bio-rad公司; Tannon 1600R凝胶成像系统分

析仪购自上海天能公司。

2. 试剂: 改良Eagle培养基(DMEM)、胎牛血清(FBS)、L-谷氨酰胺、青链霉素、购自美国GIBCO公司; 293细胞为夏海滨教授惠赠; pcDNA6.2-LTR gagpol、pNL43-ΔENV-LUC-AATR表达载体由本实验室构建保存; Eugene 6转染试剂购自美国罗氏公司; 无内毒素大提质粒试剂盒、小提质粒试剂盒购自北京博迈德生物科技有限公司; 逆转录试剂盒购自TaKaRa公司; 病毒RNA提取试剂盒购自QIAGEN公司; 水泡性口膜炎病毒的外壳糖蛋白的质粒(VSV-G清华大学史宣玲老师惠赠); HIV定量诊断试剂盒(购自美国罗氏公司); p24抗原检测试剂盒(购自北京科跃中楷生物技术有限公司); 大肠埃希菌TOP10、大肠埃希菌Stbl3(本实验室保存); 报告基因分析所用试剂(萤光素酶Luciferase, D-萤光素D-Luciferin, 瑞士罗氏公司; Gly, ATP, 美国Sigma公司); Gateway试剂盒购自美国英峻公司; PCR引物由北京生工技术有限公司合成; 测序由北京博迈德生物有限公司完成。

### 二、方法

1. 定点突变p24区: 从NCBI网站下载所有已知HIV序列, 采用BioEdit软件进行比对得到p24保守区域序列。再利用软件Primer 5设计突变片段HIV-control、内标引物和探针, 直接合成突变片段HIVc1(200 bp), 以pcDN6.2-LTR gagpol为模板分别用引物S1、AS1和S2、AS2扩增突变序列的上下游片段(HIVc2、HIVc3), 以HIVc1、HIVc2和HIVc3混合PCR产物为模板, 引物S1、AS2扩增含有BamH I和Nhe I酶切位点的目的片段HIVc4, PCR产物纯化回收后与pMD 18-T连接、转化、挑选克隆后, 测序验证突变探针序列。用BamH I和Nhe I分别双酶切HIVc4 TA克隆阳性质粒和pcDN6.2-LTR gagpol载体, 酶切产物经琼脂糖凝胶电泳后纯化回收进行连接反应。连接方法参照TaKaRa T4 DNA Ligase说明书。将上述连接产物pcDN6.2-LTR gagpol-p24t转化至大肠埃希菌TOP10细胞内, 壮观霉素抗性筛选克隆并提取质粒, BamH I和Nhe I双酶切及测序验证, 具体步骤参照分子生物学方法进行<sup>[7]</sup>。

2. 内标质粒与探针特异性验证: 以内标质粒为模板, 1:2倍比稀释模板, 探针如下: 5'-VIC-GAGATATTAACGAAGAGGCCGCGGAGTGGGAC-

TAMRA-3'。PCR反应体系按照*TaqMan*探针法试剂盒推荐反应体系进行, 总体系8  $\mu$ l, 反应条件: 95  $^{\circ}$ C、1 min预变性; 95  $^{\circ}$ C、15 s, 60  $^{\circ}$ C、1 min; 45个循环。取稀释最低浓度的内标质粒与HIV病毒混合, 在进行实时定量PCR扩增, 方法如上。

3. 制备HIV-1病毒样颗粒: 将突变载体与pNL43- $\Delta$ ENV-LUC-ATTR表达载体经Gateway重组<sup>[8-9]</sup>, 利用氨苄抗性和氯霉素抗性筛选得到只能在氨苄抗性下生长的阳性克隆, 提取质粒并测序验证得到假病毒骨架质粒(重组方法参照说明书), 后者与VSV-G质粒利用转染脂质体FuGENE6转染293细胞。细胞于5% CO<sub>2</sub>、37  $^{\circ}$ C培养6 h, 换新培养基, 分别于24 h、48 h收上清, 检测p24抗原含量, 利用罗氏HIV定量试剂盒定量上清内病毒颗粒含量, 方法参照p24抗原检测试剂盒和罗氏HIV定量试剂盒说明进行。

4. 实时定量PCR检测内标引物探针是否工作: 分别取200  $\mu$ l病毒颗粒上清和HIV阳性标本上清, 阴性参照标本为健康人的血清, 按照QIAGEN病毒提取试剂盒操作步骤提取病毒RNA, 按照TaKaRa逆转录试剂盒逆转录成为cDNA。在384孔板中建立8  $\mu$ l PCR反应体系按照*TaqMan*探针法试剂盒推荐反应体系进行, 总体系为8  $\mu$ l。PCR反应条件: 95  $^{\circ}$ C、1 min预变

性; 95  $^{\circ}$ C、15 s, 60  $^{\circ}$ C、1 min; 45个循环。根据Ct值与标准模板初始拷贝的对数值作图, 得到该样品的标准曲线。在此反应系统中, 荧光强度的增加与模板量的增加呈正比, 荧光强度的变化可反映模板产物量的变化。

## 结 果

一、p24突变序列的上下游片段(HIVc2和HIVc3)的扩增

pcDN6.2-LTR gagpol为模板分别用引物S1、AS1和S2、AS2扩增突变序列的上下游片段(HIVc2和HIVc3), 扩增产物经琼脂糖电泳鉴定, 出现片段大小符合预期的条带, 1.5%琼脂糖电泳结果见图1。

二、PCR法扩增整段p24突变序列HIVc4

以HIVc1、HIVc2和HIVc3混合PCR产物为模板, 引物S1、AS2扩增含有*Bam*H I和*Nhe* I酶切位点的目的片段HIVc4, PCR产物TA克隆后经*Bam*H I和*Nhe* I酶切和测序验证, 与预期结果相符, 详见图2~3。

三、p24保守区突变的载体pcDNA6.2-LTR gagpol-p24t的验证

HIVc4 TA酶切片段和pcDN6.2-LTR gagpol酶切

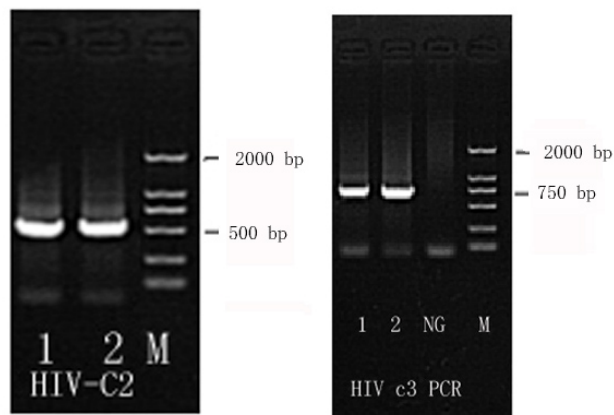
表1 内标扩增引物序列

名称	序列 (5'→3')
S1	AGTGGATCCA TGGGTGCGAG AG
AS1	AGCATGGTAT TTAAATCTTG TGGG
S2	CAGGAACAAATAGGATGGATGACA
AS2	TCTGAGGGAA GCTAGCGGAT ACA
检测引物上游	AATACCCATGTTTTAGCATTATC
检测引物下游	AGATTCTCTCC TACTGGGATA GG
内标引物上游	CGGCGGTCACCAGGCTGCGATGCAGAT
内标引物下游	GCTTGTGTGA CCAGCAATAT CGCTAC
内标序列	CCAGAAGTAATACCCATGTTTTAGCATTATCAGAAGGAGCCACCCACAAGATTTAAACACCATGCTAAACAC AGTGGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAATGTAAAAGAGACTATTAACGAAGAGGCCGCGGAGTGGACAGAT TGCATCCAGTGCATGCAGGGCCAGTTGCACCAGGCCAGATGAAGAACCAAGGGGAAGTGACATAGCAGGAATAC TAGTACTCTTCAGGAGCAAATAGGAT GGATGACAAA TAATCCACCTATCCCAGTAG GAGAAATCTA

表2 PCR 扩增程序(分步拼接和扩增内标序列)

扩增程序名称	步骤	片段大小 (bp)
HIVc2 PCR	95 $^{\circ}$ C、5 min; 95 $^{\circ}$ C、30 s, 55 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、1 min, 33个循环; 72 $^{\circ}$ C、5 min, 4 $^{\circ}$ C、10 min	530
HIVc3 PCR	95 $^{\circ}$ C、5 min; 95 $^{\circ}$ C、30 s, 55 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、1 min, 33个循环; 72 $^{\circ}$ C、5 min, 4 $^{\circ}$ C、10 min	741
HIVc4 PCR	95 $^{\circ}$ C、5 min; 95 $^{\circ}$ C、30 s, 55 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、1 min, 33个循环; 72 $^{\circ}$ C、5 min, 4 $^{\circ}$ C、10 min	1 480





注：1、2：样本，NG：阴性对照，M：Marker

图1 HIVc2和HIVc3片段PCR扩增结果

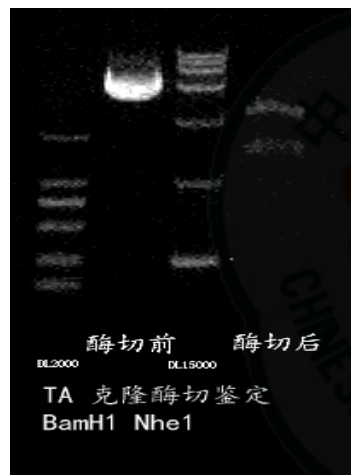


图2 HIVc4克隆后酶切结果

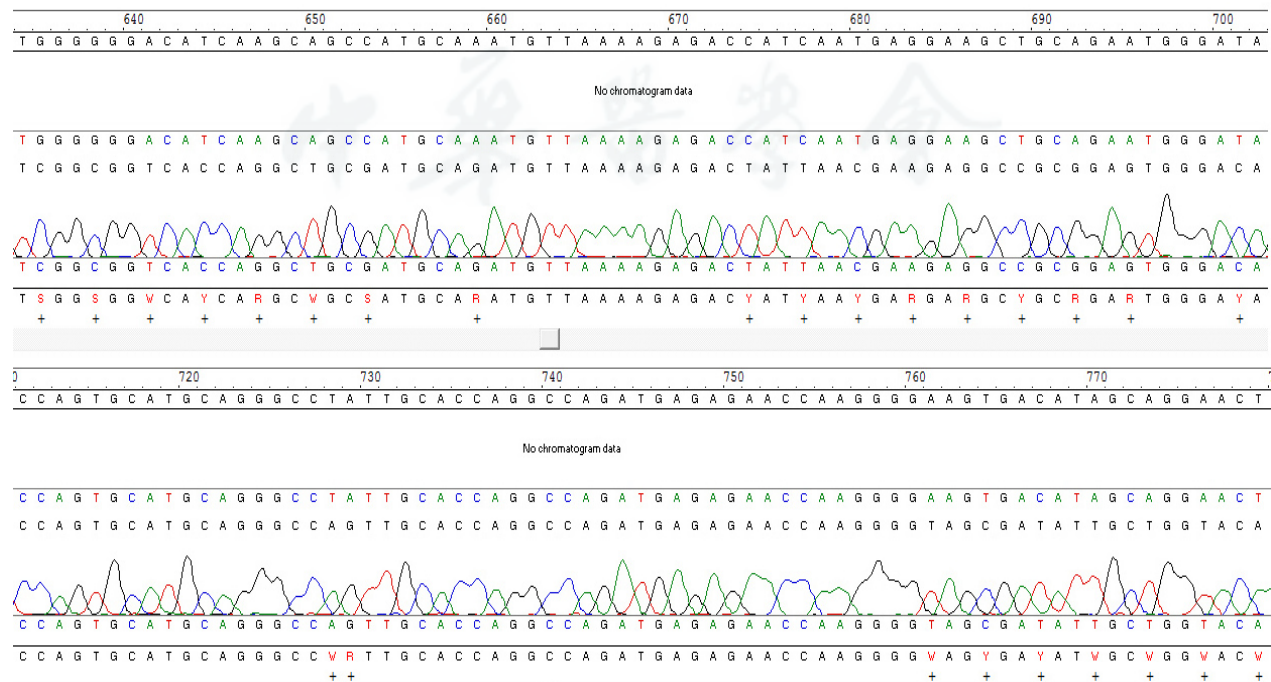


图3 HIVc4克隆后酶切测序验证结果

片段连接后克隆经测序验证，结果比对与预期突变片段HIVc4序列一致，提示pcDNA6.2-LTR gagpol-p24t重组质粒构建成功，详见图4~5。

四、内标质粒与引物探针特异性验证

以内标质粒倍比稀释后为模板，内标引物和探针进行实时定量PCR验证，结果发现两者匹配，扩增效果显著，见图6，以倍比稀释后最低内标质粒浓度混入阳性HIV血清中进行实时定量PCR验证，共分批于20例HIV-1阳性血清标本发现内标探针与检测引物探针无干扰，扩增效果良好，详见图7。

五、内标质粒包装假病毒和滴度验证

内标质粒与pNL43-ΔENV-LUC-ATTR表达载体经Gateway重组，经抗性筛选和测序得到突变后的假病毒骨架质粒pNL43-ΔENV-LUC-p24t，转染293细胞获得假病毒，去掉转染质粒后，检测p24抗原含量为283.2 pg/ml， $R^2$ 值0.9925，定量假病毒含量值为 $3.61 \times 10^9$  IU/ml（见图8和表3）。

六、验证内标质粒包装得到的假病毒与引物探针匹配情况

假病毒稀释后与4例HIV阳性血清混合后，阴性参照为健康人血清，提取RNA、逆转录为cDNA作为模板，用内标引物和探针进行实时定量PCR验证，结果发现两者匹配，探针之间无相互干扰，扩增效果显著，见图9。

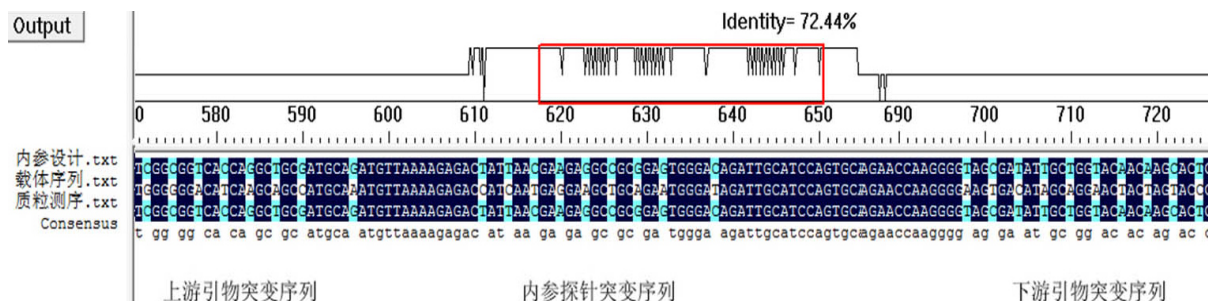


图4 p24保守区突变测序比对结果

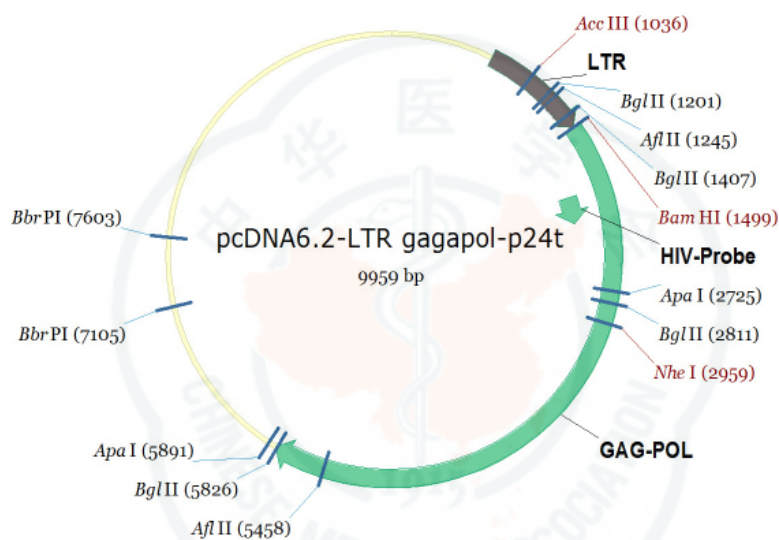
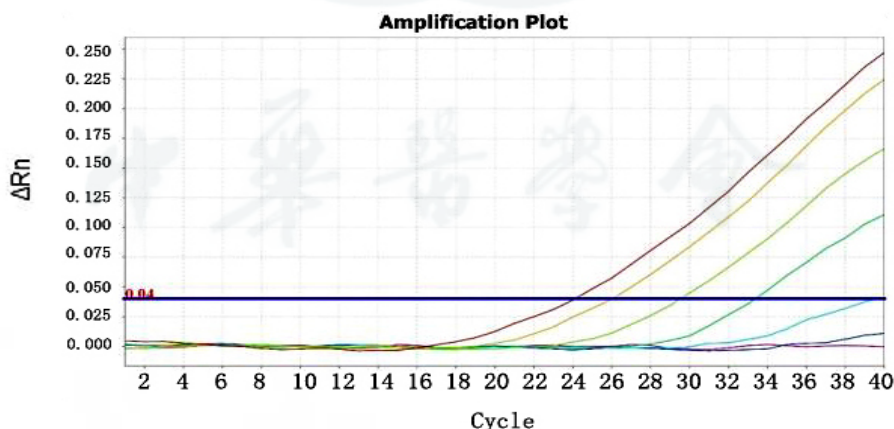


图5 pcDNA6.2-LTR gagpol-p24t载体结构图



注: Amplification Plot: 扩增图; Cycle: 扩增循环数;  $\Delta Rn$ : 荧光强度

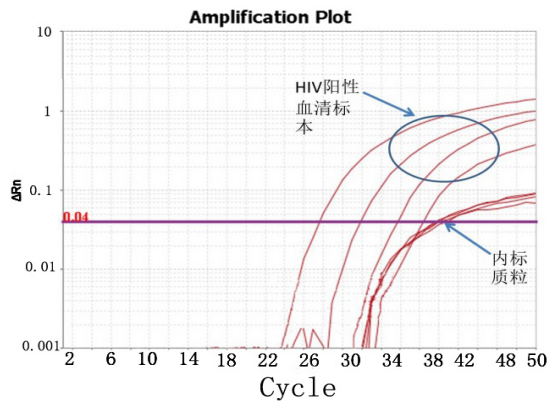
图6 内标质粒倍比稀释后定量PCR结果

## 讨 论

HIV核酸定量检测又称为病毒载量检测, 患者血浆中HIV含量与病情进展直接相关, 其常用于评估疾病病程、监测抗病毒疗效及选择抗病毒治疗方

案。

随着分子生物学的发展, HIV核酸定量检测方法也越来越多, 包括实时荧光定量PCR技术、分支DNA信号扩大系统(bDNA)和核酸序列依赖的扩增系统(nucleic acid sequence-based amplification,



注: Amplification Plot: 扩增图, Cycle: 扩增循环数;  $\Delta Rn$ : 荧光强度

图7 内标质粒与HIV阳性血清混合后定量PCR结果

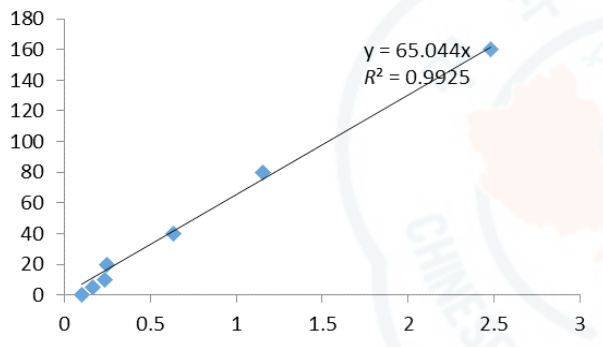
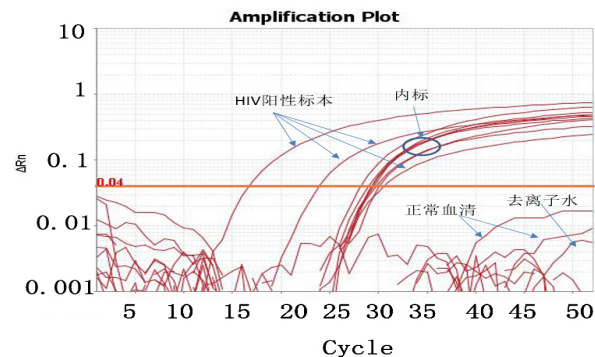


图8 p24抗原检测标准曲线

表3 p24 抗原和病毒含量检测结果

样本	p24 平均吸光度值	p24 浓度 (pg/ml)	病毒载量 (IU/ml)
pNL43-LTR gagpol-p24t	1.4715	283.2	$3.61 \times 10^9$
VSV-G	0.122	—	—
培养基	0.104	—	—

注: “—”表示阴性



注: Amplification Plot: 扩增图, Cycle: 扩增循环数;  $\Delta Rn$ : 荧光强度  
图9 内标质粒包装的假病毒掺入HIV病毒血清内定量PCR结果

NASBA)、环介导等温扩增技术等<sup>[10-11]</sup>, 实时荧光定量PCR技术可对特定核苷酸片段行指数级的扩增, 通过荧光强度变化监测产物量的变化, 从而得到一条荧光扩增曲线图, 根据Ct值与起始模板的线性关系, 利用标准曲线对样品进行定量, 该方法特异性和灵敏度都很好, 操作简单, 技术成熟, 已经广泛应用于病毒定量检测及癌症等机制研究中<sup>[12-15]</sup>, 因此, 本研究此次内标构建选择以实时荧光定量PCR技术为检测基础。

然而HIV核酸定量检测过程较繁琐, 影响因素较多, 病毒准确定量测定最好的方式是在样本中加入内标<sup>[16-17]</sup>, 据已知内标物的拷贝数直接定量检测, 常用的内标有病毒样颗粒、cDNA质粒和裸露的RNA等。由于原病毒颗粒具有多次传染性危险, cDNA质粒未在病毒颗粒内, 无法模拟临床标本中病毒核酸的提取过程, 裸露的RNA极易被降解, 这些因素均限制了试剂盒的广泛应用。

本研究选用的病毒样颗粒为敲除掉包膜基因的HIV-1骨架质粒和水泡性口膜炎病毒 (vesicular stomatitis virus, VSV) 共转染包被颗粒, 由于HIV-1骨架质粒单独转染后无法感染宿主细胞<sup>[18]</sup>, 而水泡性口膜炎病毒受体广泛存在于多种细胞内<sup>[19]</sup>, 将两者共转染后包装出来的病毒样颗粒只能感染1次宿主细胞, 故安全性很好, 该病毒颗粒能够反映HIV-1复制水平, 且本实验室具有成熟的包装该病毒颗粒的技术<sup>[20]</sup>。

本研究对病毒样颗粒内的核酸序列进行定点突变, 改变HIV-1检测序列中探针结合位点的序列, 将内标质控的序列与目的片段区分开, 构建相应的内标质控品, 结果证实, 本研究所构建的内标质粒与探针引物可较好地匹配, 且与参照的HIV血清中病毒的引物探针不相互干扰, 内标质粒包装成功的假病毒也就是病毒样颗粒内标质控品亦可以与内标引物探针匹配工作, 且与参照的HIV血清中病毒的引物探针无相互干扰, 健康人血清无扩增。病毒样颗粒的内控品与其他内标相比, 具有安全性高、稳定性强和耐受性好得特点, 无复制能力, 无传染性, 45℃可保存3d, 应用前景广阔。

### 参 考 文 献

- [1] 戴色莺, 沈张伟, 范引光, 等. 我国艾滋病预防控制中流行病学研究进展[J]. 中华疾病控制杂志, 2015, 20(12): 1282-1285.
- [2] 张岭, 蒋岩, 潘品良. HIV-1病毒载量检测常用技术及研究进展[J]. 传染病信息, 2015, 28(6): 352-356.



- [3] 刘敏, 陈秀英, 梅少林, 等. 不同核酸提取方法检测HIV病毒载量和耐药基因的研究[J]. 中国现代医生, 2016, 54(20): 111-114.
- [4] John B, Lupiwa T, Toliman P, et al. Validation of the Roche AMPLICOR HIV DNA test version 1.5 for early infant diagnosis of HIV in Papua New Guinea[J]. PNG Med J, 2012, 55(1-4): 16-23.
- [5] 付龙亨, 顾士民. HIV-1核酸扩增(PCR)-荧光定量检测试剂盒的临床应用评价[C]. 第二届全国现代免疫诊断技术学术研讨会论文集汇编, 2005: 551-554.
- [6] 朱碧姝. HIV抗原抗体诊断试剂在献血者筛查中的应用[J]. 中国输血杂志, 2006, 19(4): 304-305.
- [7] Mayer MP. A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript[J]. Gene, 1995, 163(1): 41-46.
- [8] 李华琴, 林陈水, 张文倩, 等. 不依赖连接反应的高通量克隆方法[J]. 氨基酸和生物资源, 2013, 35(4): 43-46.
- [9] 张阳璞, 杨淑慎. 几种新型植物基因表达载体的构建方法[J]. 生物工程学报, 2015, 31(3): 311-327.
- [10] 罗官生. HIV病毒分子生物学检测技术最新进展[J]. 中国保健营养(中旬刊), 2013, 24(12): 688-689.
- [11] 郭宏雄, 还锡萍, 周莹, 等. 环介导等温扩增技术检测HIV-1 DNA[J]. 江苏大学学报(医学版), 2015, 25(6): 528-531.
- [12] 宋震, 周常勇, 刘科宏, 等. 柑橘碎叶病毒巢式RT-PCR检测方法建立及应用[J]. 果树学报, 2011, 28(3): 458-462.
- [13] 孔丰, 袁远华, 肖成谋, 等. 新型鸭呼肠孤病毒RT-PCR检测方法建立与初步应用[J]. 广东畜牧兽医科技, 2014, 39(1): 24-27.
- [14] Piras-Straub K, Khairzada K, Kocabayoglu P, et al. A -1573T > C SNP within the human TRAIL promoter determines TRAIL expression and HCC tumor progression[J]. Cancer Med, 2016, 5(10): 2942-2952.
- [15] Di Domenico M, Di Giuseppe M, Rodriguez JD, et al. Validation of a fast real-time PCR method to detect fraud and mislabeling in milk and dairy products[J]. J Dairy Sci, 2017, 100(1): 106-112.
- [16] Muller J, Eis-Hubinger AM, Daumer M, et al. A novel internally controlled real-time reverse transcription-PCR assay for HIV-1 RNA targeting the pol integrase genomic region[J]. J Virol Methods, 2007, 142(1-2): 127-135.
- [17] Dreier J, Stormer M, Kleesiek K. Use of bacteriophage MS2 as an internal control in viral reverse transcription-PCR assays[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(9): 4551-4557.
- [18] Polonis VR, Brown BK, Rosa Borges A, et al. Recent advances in the characterization of HIV-1 neutralization assays for standardized evaluation of the antibody response to infection and vaccination[J]. Virology, 2008, 375(2): 315-320.
- [19] DePolo NJ, Reed JD, Sheridan PL, et al. VSV-G pseudotyped lentiviral vector particles produced in human cells are inactivated by human serum[J]. Mol Ther, 2000, 2(3): 218-222.
- [20] 徐树莹, 乔录新, 史宣玲, 等. HIV-1假病毒包装方法的探讨[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2014, 8(1): 10-13.

(收稿日期: 2016-10-11)

(本文编辑: 孙荣华)

李庆, 刘芳, 岳秀娟, 等. 新型HIV-1核酸定量内标构建及验证[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2017, 11(1): 20-26.