



RT-PCR punto final en dos pasos para la detección del virus de la hepatitis C (HCV).

Creado: Aug 28, 2008; Última modificación: Mar 23, 2021, Versión: 2.0

El virus de la hepatitis C (HCV) es un pircornavirus pequeño entre 30 a 38 nm de tamaño con envoltura y una sola cadena de RNA de sentido positivo. Pertenecce a la familia Flaviviridae y se replica principalmente en los hepatocitos causando la hepatitis C. Existe controversia sobre su capacidad para infectar a linfocitos o monocitos. Existen cinco genotipos distintos con variaciones geográficas. En Norte América predomina el genotipo 1a, seguido de 1b, 2a, 2b y 3a. En Europa predomina el genotipo 1b seguido de 2a, 2b, 2c y 3a. Los genotipos 4 y 5 se dan casi exclusivamente en África. El genotipo tiene importancia clínica ya que determina la respuesta potencial de la terapia basada en el interferón y la duración que va a requerir la misma. Los genotipos 1 y 4 responden menos a dicho tratamiento que los otros (genotipos 2, 3, 5 y 6).³ La duración de la terapia estándar basada en el interferón para los genotipos 1 y 4 es de 48 semanas, mientras que para los genotipos 2 y 3 es solo de 24 semanas. El HCV tiene una alta tasa de replicación produciendo aproximadamente un billón de nuevos virus al día en un individuo infectado. La carga viral plasmática de portadores asintomáticos con elevación de alanina transaminasa oscila entre 100/mL y 50'000,000/mL.

Oligonucleótidos

Nombre	Target	Secuencia	bp	%gC	Tm ^b	Posición	Amplicón	Ref
HCVrt-F	HCV	5'-gTC-TAg-CCA-Tgg-CgT-TAg-TAT-gAg-3'	24	50	56.9	77-100	226	1
HCVrt-R	HCV	5'-ACC-CTA-TCA-ggC-AgT-ACC-ACA-Ag-3'	23	52.2	58.4	280-302		

Síntesis de cDNA

Componentes	Cf	1 rx (µl)	Programa
dH ₂ O	---	4.85	RT-1
10 mM dNTP's	250 µM	0.5	
10 µM oligos HCVrt	1.125 µM	2.25	
RNA	---	10	

Buffer 10x	1x	2	RT-2
Enzima RT		0.4	
	Vf	20	

Tiempo: 5 min

RT-1	Temperatura	95°	4°
	Tiempo	2 min	2 min

Tiempo: 1:10 hrs

RT-2	Temperatura	42°	95°	4°
	Tiempo	60 min	5 min	5 min





Componentes	Cf	1 rx (µl)
dH ₂ O	---	6.2
2x iTaq SYBR green	1x	7.5
10 µM oligos HCVrt	200 nM	0.3
cDNA (dilución 1/10)	---	1
	Vf	15

Tiempo: 2:10 hrs		Desnaturalización		Hibridización	Curva de disociación			
ABI 7700	Temperatura	95°	94°	62°	95°	60°	Set Ram time	95°
	Tiempo	3 min	30 seg	30 seg	15 seg	20 min	19:59 min	15 seg
	Colección de datos			✓			✓	
		x45 ciclos						

Notas

1. Limpíese el área de trabajo con NaOCl 0.1% y Etanol al 70% antes y después de preparar las PCR y preparan las PCRs en charola de hielo o haciendo uso de los portatubos refrigerados.
2. Mezcle en vortex todos los reactivos excepto el DNA antes de preparar la mezcla madre (master mix) y nuevamente al terminar de preparar el master mix. Haga uso de la micropipeta más apropiada para cada rango de volumen a dispensar ¡Emplear las Rainin!
3. La preparación de la síntesis de cDNA debe realizarse en el cuarto de RNA. Cuando termina la síntesis de cDNA los tubos deben guardarse a -80° C hasta preparar la PCR tiempo real.
4. Es importante respetar la segregación de espacios para la preparación de la PCR tiempo real. La preparación de la mezcla madre debe realizarse en el gabinete de seguridad biológica ubicado en el cuarto de cultivo, las muestras se deben agregar en la mesa de PCR's y finalmente tanto los controles positivos como los estándares se deben añadir en el laboratorio 1 con el aire acondicionado apagado.
5. Para la PCR tiempo real distribuya 14 µl de la mezcla madre a cada tubo y agregue 1 µl de cDNA diluido 1/10. Para la dilución 1/10 del cDNA se deben agregar 180 µl de dH₂O al tubo de PCR que contiene los 20 µl del producto de la síntesis de cDNA.
6. Después de agregar los dNTP's, oligonucleótidos y RNA durante la síntesis de cDNA estos deben ser sometidos al programa de RT-1 para una desnaturalización del RNA y posteriormente agregar el buffer y la enzima RT.
7. La colección de datos durante la PCR tiempo real se realiza durante el paso de hibridación y durante el "set ram time". Para observar la curva de disociación es necesario exportar los datos





llamados “multicomponent” y abrirlos con el programa “ABI 7700 dissociation curve”.

8. Mientras el termociclar ABI 7700 este funcionando debe estar encendido el aire acondicionado del laboratorio 1.

Referencias

1. Gibellini, D. et al., Simultaneous detection of HCV and HIV-1 by SYBR green real time multiplex RT-PCR technique in plasma samples. *Mol Cell Probes* 20 (3-4), 223 (2006).

Revision history

- 1.0 Original document.
- 2.0 Changes to document format only.

