



Human immunodeficiency virus (HIV) RNA detection through end-point RT-PCR.

Created: Jan 29, 2009; Last modified: Mar 23, 2021, Version: 2.0

Este protocolo describe los componentes y condiciones optimizados para la detección del RNA del Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (HIV-1) por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa empleando transcripción inversa (RT-PCR). Esta técnica utiliza una reacción de RT independiente que es seguida de una primera PCR que a su vez se sigue con una PCR anidada. Las PCR's anidadas son más sensible que la PCR de un solo paso por lo que deberán prepararse bajo condiciones estrictas de disciplina molecular.

Oligonucleótidos

Nombre	PCR	Secuencia	Bases	%GC	Tm ^b	Posición	Amplicón	Ref
HIV-FO	1	5'-TAC-AGG-AGC-AGA-TGA-TAC-AG-3'	20	45	50	141-161	294	1
HIV-RO		5'-CCT-GGC-TTT-AAT-TTT-ACT-GG-3'	20	40	48	418-438		
HIV-FI	2	5'-GGA-AAC-CAA-AAA-TGA-TAG-GG-3'	20	40	48	221-241	130	
HIV-RI		5'-ATT-ATG-TTG-ACA-GGT-GTA-GG-3'	20	40	48	331-351		

NOTA: Las secuencias de los oligos reversa son el complemento-reverso de la secuencia de DNA mostrada en los alineamientos.

Componentes de RT

Síntesis de Primer Cadena (RT)		1 rx (µl)
dH ₂ O	<i>Cf</i>	4.85
2x Oligos 10 mM	1.125 mM	2.25
4x dNTPs 10 mM	0.25 mM	0.50
RNA	-	10.00



Correr RT-1



*Buffer	1X	2.00
*Enzima RT	100 U	0.40
	Vf	20



Correr RT-2



Componentes de PCR

Primera PCR		1 rx (µl)
dH ₂ O	Cf	5.15
10x Buffer PCR	1X	1.25
MgCl ₂ 50 mM	3.0 mM	0.75
4x dNTPs 10 mM	200 µM	0.25
2x Oligos 10 µM	800 nM	1.00
Taq 5 UI/µL	0.02 UI/µL	0.10
cDNA	-	4.00
	Vf	12.5

↓
Correr PCR HIV-1

Segunda PCR		1 rx (µl)
dH ₂ O	Cf	8.40
10x Buffer	1X	1.25
MgCl ₂ 50 mM	2.0mM	0.50
4x dNTPs 10 mM	200 µM	0.25
2x Oligos 10 µM	800 nM	1.00
Taq 5 UI/µL	0.02 UI/µL	0.10
Producto 1ra PCR 1:1	-	1.00
	Vf	12.5

↓
Correr PCR HIV-2

Condiciones de RT

Tiempo: 9 min

RT-1 HIV	Temperatura	65°	4°
	Tiempo	7 min	2 min
x1 ciclo			

Tiempo: 1:15 hrs

RT-2 HIV	Temperatura	38°	70°	4°
	Tiempo	60 min	10 min	5 min
x1 ciclo				

Condiciones de PCR

Tiempo: 1:32 hrs

		Desnaturalización		Hibridización		Extensión	
HIV 1	Temperatura	94°	94°	55°	72°	72°	4°
	Tiempo	2 min	15 seg	15 seg	15 seg	2 min	5 min
x30 ciclos							

Tiempo: 1:32 hrs

		Desnaturalización		Hibridización		Extensión	
HIV 2	Temperatura	94°	94°	50°	72°	72°	4°
	Tiempo	2 min	15 seg	15 seg	15 seg	2 min	5 min
x30 ciclos							



Notas

1. Limpiese el área de trabajo con NaOCl 0.1% y Etanol al 70% antes y después de preparar las PCR.
2. Preparanse las PCR en charola de hielo o haciendo uso de los portatubos refrigerados.
3. 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.
4. Haga uso de la micropipeta más apropiada para cada rango de volumen a dispensar ¡Emplear las Rainin!
5. Para la primera PCR distribuya 8.5 μ L de la mezcla madre a cada tubo y agregue 4 μ L de cDNA (\pm 100 ng/ μ L); para la segunda PCR distribuya 11.5 μ L de la mezcla madre y agregue 1 μ L del producto de la primera PCR diluído 1:1 con agua destilada.

Referencias

1. Albert, J. Simple, sensitive, and specific detection of Human Immunodeficiency Virus type 1 in clinical specimens by polymerase chain reaction with nested primers. *Journal of Clinical Microbiology* **28**, 1560 - 1564 (1990).

Revision history

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

