



PCR para la caracterización genómica del virus de influenza A pre-pandémico (H1N1) y (H3N2).

Created: Aug 16, 2010; Last modified: Aug 16, 2010, Version: 1.0

El presente protocolo describe los componentes y condiciones optimizados para la amplificación de los 8 segmentos genómicos del virus de influenza A mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Estas técnicas utilizan una PCR anidada en la cual el producto de la primera amplificación es utilizado como base para realizar una segunda amplificación con oligonucleótidos que se ubican dentro de la primera secuencia amplificada. Este tipo de PCR es más sensible que la PCR de un solo paso.

Oligonucleótidos

Nombre	Spec	PCR	Sequence	bp	%GC	Tm	Position	Size	Ref
UniFlu-RT	All	1	5'-Agg-AAA-AgC-Agg-3'	12	50	38.1	-	-	1
PB2-F	PB2	1	5'-TAT-Tgg-TCT-CAg-ggA-gCg-AAA-gCAG-gTC-3'	28	53.6	63.3	10	24	2342
PB2-R	PB2		5'-ATA-Tgg-TCT-CgT-ATT-AgT-AgA-AAC-AAg-gTC-gTT-T-3'	34	35.3	58.7	2358	2376	
SwPB2-F	PB2	2	5'-ATg-gAg-AgA-ATA-AAA-gAA-C-3'	19	31.6	44.1	38	56	833
PB2-R1	PB2		5'-gCT-AgT-ggA-TCT-gCY-g-3'	16	59.4	50.8	855	871	
PB2-F2	PB2	2	5'-RAT-gTA-CAC-TCC-Agg-T-3'	16	46.9	46.7	764	779	942
PB2-R2	PB2		5'-RAT-TTC-TgA-TgA-TCC-A-3'	16	34.4	41.3	1692	1706	
PB2-F3	PB2	2	5'-ggA-RgT-MAg-TgA-AAC-AC-3'	17	47.1	47.2	1585	1602	791
PB2-R	PB2		5'-ATA-Tgg-TCT-CgT-ATT-AgT-AgA-AAC-AAg-gTC-gTT-T-3'	34	35.3	58.7	2358	2376	
PB1-F	PB1	1	5'-TAT-TCg-TCT-CAg-ggA-gCg-AAA-gCA-ggC-A-3'	28	53.6	64.7	8	21	2342
PB1-R	PB1		5'-ATA-TCg-TCT-CgT-ATT-AgT-AgA-AAC-AAg-gCA-TTT-3'	33	33.3	57.6	2332	2350	
SwPB1-F1	PB1	2	5'-ATg-gAT-gTC-AAT-CCg-ACT-C-3'	19	47.4	51.8	32	50	833
PB1-R1	PB1		5'-CAT-TAY-CYC-CAA-CYg-3'	15	50	44.2	847	865	
PB1-F2	PB1	2	5'-CAC-RAT-gAC-CAA-AgA-Y-3'	16	43.8	45.1	706	723	849
PB1-R2	PB1		5'-CTC-CAT-gCT-RAA-ATT-Rg-3'	14	41.2	44.7	1540	1555	
PB1-F3	PB1	2	5'-gAg-CAA-AAA-gAA-gTC-Y-3'	16	40.6	43.7	1463	1477	887
PB1-R	PB1		5'-ATA-TCg-TCT-CgT-ATT-AgT-AgA-AAC-AAg-gCA-TTT-3'	33	33.3	57.6	2332	2350	
PA-F	PA	1	5'-TAT-TCg-TCT-CAg-ggA-gCg-AAA-gCA-ggT-AC-3'	29	51.7	62.7	5	19	2233
PA-R	PA		5'-ATA-TCg-TCT-CgT-ATT-AgT-AgA-AAC-AAg-gTA-CTT-3'	33	33.3	56.8	2222	2238	
SwPA-F1	PA	2	5'-ggA-AgA-CTT-TgT-gCg-AC-3'	17	52.9	50.9	29	47	856
PA-R1	PA		5'-CCA-TCA-gSA-ggA-ATT-TKg-3'	18	47.2	49.5	868	885	
PA-F2	PA	2	5'-gCT-RCA-TTg-Agg-gCA-Ag-3'	17	55.9	52.5	747	763	897
PA-R2	PA		5'-TCC-CAT-TTR-TgT-ggY-TC-3'	17	47.1	49.2	1626	1644	
PA-F3	PA	2	5'-AAg-Agg-gAA-ggM-gAA-A-3'	16	46.9	48.1	1497	1514	741
PA-R	PA		5'-ATA-TCg-TCT-CgT-ATT-AgT-AgA-AAC-AAg-gTA-CTT-3'	33	33.3	56.8	2222	2238	





HA-F	HA	1	5'-TAT-TCg-TCT-CAg-ggA-gCA-AAA-gCA-ggg-g-3'	28	53.6	63.6	8	22	1782	1
NS-R	HA/NS		5'-ATA-TCg-TCT-CgT-ATT-AgT-AgA-AAC-AAg-ggT-gTT-TT-3'	35	34.3	58.9	1783	1790		1
HA-F	HA	2	5'-TAT-TCg-TCT-CAg-ggA-gCA-AAA-gCA-ggg-g-3'	28	53.6	63.6	19	32	862	1
HA1-R1	HA1		5'-AAg-CCT-CTA-CTC-ART-gCg-3'	18	52.8	53.1	864	881		2
HA1-F2	HA1	2	5'-CCR-ggg-ATA-CWA-TAA-TA-3'	17	38.2	42.2	804	820	986	2
NS-R	HA		5'-ATA-TCg-TCT-CgT-ATT-AgT-AgA-AAC-AAg-ggT-gTT-TT-3'	35	34.3	58.9	1783	1790		1
HA-F	HA	2	5'-TAT-TCg-TCT-CAg-ggA-gCA-AAA-gCA-ggg-g-3'	28	53.6	63.6	8	22	881	1
HA3-R1	HA3		5'-ATT-ATT-gAg-CTT-TTC-CC-3'	17	35.3	43.6	872	889		2
HA3-F2	HA3	2	5'-AAC-AgC-ACA-ggg-AAT-C-3'	16	50	48.9	817	832	952	2
NS-R	HA		5'-ATA-TCg-TCT-CgT-ATT-AgT-AgA-AAC-AAg-ggT-gTT-TT-3'	35	34.3	58.9	1750	1769		1
NP-F	NP	1	5'-TAT-TCg-TCT-CAg-ggA-gCA-AAA-gCA-ggg-TA-3'	29	48.3	62.5	9	23	1566	1
NP-R	NP		5'-ATA-TCg-TCT-CgT-ATT-AgT-AgA-AAC-AAg-ggT-ATT-TTT-3'	36	30.6	57.5	1555	1575		1
SwNP-F	NP	2	5'-ATg-gCg-TCT-CAA-gg-3'	14	57.1	47.7	54	67	816	3
NP-R1	NP		5'-TgA-gCA-ACT-gAT-CCT-CTC-3'	18	50	51.1	853	870		2
NP-F2	NP	2	5'-ggA-YCA-AgT-gAg-AgA-AAg -3'	18	47.2	48.3	705	722	870	2
NP-R	NP		5'-ATA-TCg-TCT-CgT-ATT-AgT-AgA-AAC-AAg-ggT-ATT-TTT-3'	36	30.6	57.5	1555	1575		1
NA-F	NA	1	5'-TAT-Tgg-TCC-Agg-gAg-CAA-AAg-CAg-gAg-T-3'	28	50	63.3	9	23	1486	1
NA-R	NA		5'-ATA-Tgg-TCT-CgT-ATT-AgT-AgA-AAC-AAg-gAg-TTT-TTT-3'	36	30.6	57.8	1475	1495		1
NA-F	NA	2	5'-TAT-Tgg-TCC-Agg-gAg-CAA-AAg-CAg-gAg-T-3'	28	50	63.3	9	23	821	1
NA-R1	NA		5'-AYY-TTY-CCC-TYY-TCR-AT-3'	17	41.2	47.3	812	828		2
NA-F2	NA	2	5'-ACM-CAR-gAg-TCW-gAA-T-3'	16	43.8	46.3	715	732	780	2
NA-R	NA		5'-ATA-Tgg-TCT-CgT-ATT-AgT-AgA-AAC-AAg-gAg-TTT-TTT-3'	36	30.6	57.8	1475	1495		1
M-F	M	1	5'-TATTCgTCTCAgggAgCAAAAgCaggTAg-3'	29	48.3	61.3	7	21	1126	1
M-R	M		5'-ATA-TCg-TCT-CgT-ATT-AgT-AgA-AAC-AAg-gTA-gTT-TTT-3'	36	30.6	57.4	1117	1133		1
NS-F	NS	1	5'-TAT-TCg-TCT-CAg-ggA-gCA-AAA-gCg-ggT-g-3'	28	53.6	63.7	4	19	965	1
NS-R	NS		5'-ATA-TCg-TCT-CgT-ATT-AgT-AgA-AAC-AAg-ggT-gTT-TT-3'	35	34.3	58.9	949	969		1

Nota 1: Las secuencias de los cebadores oligonucleótidos reversa brindados en esta tabla corresponden al complemento-reversa de la secuencia tal cual aparece en alineamientos. Corresponden a la manera correcta para ordenar su síntesis. Las ΔQ 's de los hairpin (Hair), homodimeros (HomD) y heterodimeros (HetD) se dan en kcal/mol.

Componentes

Primera PCR		1 rx (μl)	Segunda PCR		1 rx (μl)
dH ₂ O	Cf	6.525	dH ₂ O	Cf	8.525
10x Buffer PCR	1X	1.25	10x Buffer	1X	1.25
MgCl ₂ 50 mM	1.5 mM	0.375	MgCl ₂ 50 mM	1.5 mM	0.375
4x dNTPs 10 mM	200 μM	0.25	4x dNTPs 10 mM	200 μM	0.25
Oligos Ext. 10 μM	1600 nM	2.0	Oligos Int 10 μM	800 nM	1.0
Taq 5 UI/μL	0.04 UI	0.1	Taq 5 UI/μL	0.04 UI	0.1
cDNA	-	2.0	Producto 1ra PCR 1:8	-	1.0





Vf	12.5
----	------

Vf	12.5
----	------

Condiciones (Tiempo Total 6.75 hrs)

Tiempo: 4:15 hrs		Desnaturalización		Hibridización	Extensión		
HBV & HIV	Temperatura	95°	95°	58°	72°	72°	4°
	Tiempo	5 min	20 seg	30 seg	3 min	5 min	5 min
				x40 ciclos			

Tiempo: 2:30 hrs		Desnaturalización		Hibridización	Extensión		
HBV & HIV	Temperatura	95°	95°	54°	72°	72°	4°
	Tiempo	5 min	30 seg	30 seg	90 seg	5 min	5 min
				x40ciclos			

Notas

1. Limpíese 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. El cDNA se sintetiza de acuerdo a las especificaciones hechas en el protocolo de subtipificación molecular del virus de influenza A.
4. Mezcle en vortex todos los reactivos excepto el cDNA antes de preparar la mezcla madre (master mix) y nuevamente al terminar de preparar el master mix.
5. Haga uso de la micropipeta más apropiada para cada rango de volumen a dispensar ¡Emplear las Rainin!
6. Para la primera PCR distribuya 10 µL de la mezcla madre a cada tubo y agregue 2 µL de cDNA; para la segunda PCR distribuya 11.5 µL de la mezcla madre y agregue 1 µL del producto de la primera PCR diluido (1:8).
7. Cuando termina la primera PCR, los tubos deben guardarse a -80° C por 15 minutos, para evitar formar aerosoles.
8. Antes de realizar la segunda PCR, se realizan la dilución (1:8) colocando 8 µL de agua y 1 µL del producto de la primera PCR en un tubo de 200 µL, todo este paso se debe realizar en hielo.





Referencias

1. Hoffmann, E., Stech, J., Guan, Y., Webster, R. G., and Perez, D. R. (2001). Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch Virol* **146**(12), 2275-89.
2. Contreras-Trevino, H. I. (2010). *Laboratorio de Genómica Viral y Humana*.
3. García-Sepúlveda, C.A. (2009). *Laboratorio de Genómica Viral y Humana*.

Historial de cambios

- 1.0 Documento original.
- 2.0 Cambios al formato del documento únicamente.
- 3.0 Traducido al inglés.

