



Subtipificación del virus de la Influenza A (H1N1), (H3N2) y (H5N1).

Created: May 27, 2009; Last modified: May 27, 2009, Version: 1.0

Este protocolo describe los componentes y condiciones optimizados para la subtipificación de influenza virus tipo A humanos a través de una reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) multiplex. La técnica amplifica fragmentos de tamaños diferentes para cada uno de los tres subtipos de hemaglutinina (HA) y para los dos subtipos de neuroaminidasa (NA) implicados en infecciones humanas. Los fragmentos se resuelven fácilmente por electroforesis en gel de agarosa al 3%. La síntesis de primer cadena (RT) se realiza en presencia del oligonucleótido UniFlu-RT el cual **SI** es capaz de hibridarse con secuencias de influenza virus no humanas (p. Ej., la variante rearrreglante de la influenza pandémica de origen porcino). No obstante, la fase de PCR de esta técnica no posee la capacidad para detectar/subtipificar a la variante rearrreglante del virus de la influenza A(H1N1) pandémica.

Oligonucleótidos

Nombre	Tipo	Secuencia	bp	%GC	Tm ^b	Posición §	Amplificón	Referencia
UniFlu-RT	Generico	5'-AGC-AAA-AGC-AGG-3'	12	50	39.9°	19	Genómico	1
HA1-F	HA1	5'-GAA-ATT-TGC-TAT-GGC-TGA-CGG-GR-3'	23	50	58.2°	541	171 bp	3
HA1-R		5'-GAC-ACT-ACA-GAG-ACA-TAA-GCA-TTT-TC-3'	26	38.5	53.8°	712		2
HA3-F	HA3	5'-CAG-CAA-AGC-CTA-CAG-CAA-MTG-TT-3'	23	45.7	57.4°	347	236 bp	3
HA3-R		5'-GGC-ATA-GTC-ACG-TTC-AAT-GCT-G-3'	22	50	56.5°	583		2
HA5-F	HA5	5'-AAA-CTC-CAA-TRG-GGG-CGA-TAA-AC-3'	23	45.7	56.5°	914	344 bp	3
HA5-R1		5'-CAA-CGG-CCT-CAA-ACT-GAG-TGT-3'	21	52.4	57.8°	1258		2
HA5-R2		5'-CCA-ACA-GCC-TCA-AAC-TGA-GTG-T-3'	22	50	57.6°			3
NA1Nw-F	NA1	5'-ACT-CAR-GAG-TCT-GAA-TGT-G-3'	18	44.7	50.2°	704	409 bp	3
NA1Nw-R1		5'-GTC-CTT-CCT-ATC-CAA-ACA-CC-3'	20	50	52.8°	1113		
NA1Nw-R2		5'-GTT-CTC-CCG-AGC-CAG-ATA-CC-3'	20	60	57.2°			
NA2-F1	NA2	5'-GGA-AAA-TCG-TTC-ATA-CTA-GCA-MAT-TG-3'	26	36.5	53.7°	798	176 bp	3
NA2-F2		5'-GGG-AAA-ATC-GTT-CAT-ATT-AGC-ACA-TTG-3'	27	37	54.9°			2
N2-R1		5'-AGC-ACA-CAT-AWC-TGG-AAA-CAA-TGC-3'	24	41.7	56.2°			974

NOTA: Los oligonucleótidos reversa (R) son el complemento reversa de la secuencia presente en los alineamientos.

§ - En base a los alineamientos provistos en: NCBI Influenza Virus Resource (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU>)





Componentes

Síntesis de Primer Cadena (RT)		1 rx (µl)
dH ₂ O	<i>Cf</i>	8.1
2x Oligos 10 mM	1.125 mM	4.5
4x dNTPs 10 mM	0.25 mM	1.0
RNA	-	4.0



Correr RT-1



*Buffer	1X	2.00
*Enzima RT	100 U	0.40
	<i>Vf</i>	20



Correr RT-2



Primera PCR		1 rx (µl)
dH ₂ O	<i>Cf</i>	2.2
10x Buffer PCR	1X	1.25
MgCl ₂ 50 mM	3.0 mM	0.75
4x dNTPs 10 mM	200 µM	0.5
Oligos HA1 10 µM	400 nM	0.5
Oligos HA3 10 µM	400 nM	0.5
Oligos HA5 10 µM	200 nM	0.25
Oligos NA1 10 µM	800 nM	1
Oligos NA2 10 µM	400 nM	0.5
Taq 5 UI/µL	0.02 UI/µL	0.05
cDNA	-	5.00
	<i>Vf</i>	12.5



Correr FLU-ST

Condiciones

Tiempo: 12 minutos		Hibridización	Incubación
RT1	Temperatura	65° C	4°
	Tiempo	7 min	2 min





Tiempo: 1 hora 2 minutos		Síntesis 1er Cadena	Inactivación
RT2	Temperatura	38° C	70°
	Tiempo	60 min	10 min

Tiempo: 3 horas 40 minutos		Desnaturalización		Hibridización	Extensión		
Flu ST	Temperatura	95°	95°	58°	72°	72°	4°
	Tiempo	5 min	30 seg	30 seg	2 min	5 min	∞
				x40 ciclos			

Notas

1. El producto de RT (cDNA) y el RNA deberán almacenarse a -80 °C.
2. Utilice la micropipeta apropiada para cada rango de volumen a dispensar ¡**Emplear las Rainin!**

Referencias

1. A Hoffmann E, Stech J, Guan Y, Webster RG, Perez DR. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. Arch Virol. 2001. Dec;146(12):2275-89.
2. Poddar SK. Influenza virus types and subtypes detection by single step single tube multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and agarose gel electrophoresis. J Virol Methods. 2002 Jan;99(1-2):63-70.
3. Garcia-Sepulveda CA, Contreras-Treviño HI, Laboratorio de Biología Molecular.

