



## RT-PCR genómica para la amplificación genómica de influenza A(H1N1) pandémica.

Created on: May 18, 2009; Last modified by: Aug 16, 2010, Version: 1.0

El presente protocolo describe los componentes y condiciones optimizados para la caracterización genómica del virus de influenza A(H1N1) pandémico, por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Esta técnica utiliza 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

Blanco	Nombre	PCR	Secuencia	bp	Posición	%GC	T <sub>m</sub> (°C)	Amplicon	Ref
8(NS)	SwNS-F	1	ATGGACTCCAACACC	15	1-15	53.3	47.7	890	1
	SwNS-R	1	TTAAATAAGCTGAAACGAG	19	820-838	31.6	45		
	NS-CDC-F1	2	TGTA AAAACGACGGCCAGTAGCAA AAGCAGGGTGACAAA GACA	42	24-66	47.6	68.1	492	2
	NS-CDC-R1	2	CAGGAAACAGCTATGACCTCGGTGAAAGCCCTTA	34	482-516	50	64.9		
	NS-CDC-F2	2	TGTA AAAACGACGGCCAGTTGAGGCWYTTAAAATGACCA	38	250-288	43.4	65.3		
NS-CDC-R2	2	CAGGAAACAGCTATGACCAGTAGAAA CAAGGGTGTTTTTAT	42	890-932	38.1	63	682		
7(M)	SwMP-F	1	TAACCGAGGTCGAAA	15	11-26	46.7	52.6	970	
	SwMP-R	1	TACTCTAGCTCTATGTTGA	19	963-981	36.8	53.7		
6(NA)	SwNA-F	1	ATGAATCCAAACCAAAG	18	1-18	33.3	45.1	1409	1
	SwNA-R	1	TTACTTGTCAATGGTAAATG	20	1391-1410	30	45.5		
5(NP)	SwNP-F	1	ATGGCGTCTCAAGG	14	1-14	57.1	47.7	1496	
	SwNP-R	1	TCAACTGTCATACTCCTC	18	1480-1497	44.4	47.8		
	NP-CDC-F1	2	TGTA AAAACGACGGCCAGTCAGGGTAGATAATCACTCAC	38	1-39	47.4	64.9	592	2
	NP-CDC-R1	2	CAGGAAACAGCTATGACCAGAGCACATYCTGGGATCCAT	39	553-592	50	66.7		
	NP-CDC-F2	2	TGTA AAAACGACGGCCAGTTGGCATTCHAATTTAATGAT	39	513-552	38	63.7		
	NP-CDC-R3	2	CAGGAAACAGCTATGACCCTGRCTCTTGTGTGCDGG	36	1042-1078	55.1	67.3	566	
	NP-CDC-F5	2	TGTA AAAACGACGGCCAGTTCTGAGRGRTCAGTTGCTC	39	872-911	51.3	67.5		
NP-CDC-R5	2	CAGGAAACAGCTATGACCAGTAGAAA CAAGGGTATTTTTTC	40	1565-1605	40	62.1	732		
4(HA)	SwHA-F	1	ATGAAGGCAATACTAGTAG	19	1-19	36.8	53.1	1694	1
	SwHA-R	1	CATATTCTACACTGTAGAGAC	21	1674-1694	38.1	54.4		
	SwHA-F1	2	CCGCAAATGCAGACACAT	18	62-79	50	53.8	510	
	SwHA-R1	2	TTAATGTAGGATTTGTCTGA	19	554-572	31.6	45.9		
	SwHA-F2	2	GGCCCAATCATGACTCGA	18	440-457	55.6	54.7	501	
	SwHA-R2	2	AGGCTGGTGTATATAGCACC	20	922-941	50	54.8		
	SwHA-F3	2	CCGAGATATGCATTTCGC	17	823-839	52.9	50.6	636	3
	SwHA-R3	2	CGTTCCAATTTCTTGGC	19	1441-1459	47.4	52.4		
	SwHA-F4	2	TTGATGATGGTTTCCT	16	1304-1319	37.5	44	387	
SwHA-R4	2	TTAGAGCACATCCAGAAA	18	1674-1691	38.9	47.8			
3(PA)	SwPA-F	1	ATGGAAGACTTTGTGC	16	74-90	43.8	46.3	2151	1
	SwPA-R	1	CTACTTCAGTGCATGTG	17	2208-2225	47.1	47.3		
	SwPA-F1	2	GGAAGACTTTGTGCGAC	17	76-93	52.9	50.9	703	
	SwPA-R1	2	TCCATCTACATAGGCTCTAAA	21	758-779	38.1	49.9		
	SwPA-F2	2	CAGTAGGAGTCTATGGGAT	19	622-641	47.4	49.8	607	
	SwPA-R2	2	TTTGCAGTCATCAAAGTCTA	20	1209-1229	35	49.2		
	SwPA-F3	2	TTGGAAGCAGGTGCT	15	1084-1099	53.3	50.7	700	3
	SwPA-R3	2	GGTCCATTGGTTCTCAC	18	1766-1784	50	50.7		
SwPA-F4	2	TGATGTGGTGAACCTTGTAAG	21	1618-1639	38.1	50.6	600		
SwPA-R4	2	AGTGCATGTGTGAGGA	16	2202-2218	50	50.3			





Blanco	Nombre	PCR	Secuencia	bp	Posición	%GC	Tm (°C)	Amplicon	Ref
2(PB1)	SwPB1-F	1	ATGGATGTCAATCCGA	16	127-143	43.8	46.8	2273	1
	SwPB1-R	1	TATTTTGGCCGTCTGAG	17	2383-2400	41.2	46.6		
	SwPB1-F1	2	ATGGATGTCAATCCGACTC	19	127-146	47.4	51.8	616	3
	SwPB1-R1	2	CTATTGTTCTTTGCGTGACC	20	723-743	45	51.7		
	SwPB1-F2	2	AGGAAGGCTAATAGATTCTTA	22	606-628	31.8	48.4	639	
	SwPB1-R2	2	AGCATTTCTGCTGGTAT	17	1228-1245	41.2	48.1		
	SwPB1-F3	2	GAGTGGTTCAGAAACATC	18	1117-1135	44.4	47.7	738	
	SwPB1-R3	2	TAAC TCAAATGATCTTCTCGT	21	1834-1855	33.3	48.8		
SwPB1-F4	2	CAGATGGCTCTTCAATTGT	19	1759-1778	42.1	50.1	639		
SwPB1-R4	2	TTTTTGGCCGTCTGAGTTC	18	2380-2398	44.4	50.5			
1(PB2)	SwPB2-F	1	ATGGAGAGAATAAAAAGAAC	19	51-70	31.6	44.1	2279	1
	SwPB2-R	1	TAATTGATGGCCATCC	16	2314-2330	43.8	45.5		
	SwPB2-F1	2	AAAGAACTGAGAGATCTA	18	64-82	33.3	43.6	504	3
	SwPB2-R1	2	CCACTTCATTTGGGAA	16	552-568	43.8	45.9		
	SwPB2-F2	2	AGGTTGAAACATGGTACC	18	420-438	44.4	49.4	740	
	SwPB2-R2	2	GCTCTTCTCCCAACCA	16	1144-1160	56.3	51.2		
	SwPB2-F3	2	GCTAACGGGCAACCT	15	1082-1097	60	52.1	889	
	SwPB2-R3	2	CACATTCACAGTCAATGAGG	20	1951-1971	45	51.2		
SwPB2-F4	2	CCTAAGGCAACCAGAAGC	18	1803-1821	55.6	53.3	491		
SwPB2-R4	2	TGGCTGTCAGTAAGTATGCTAG	22	2272-2294	45.5	53.9			

## Componentes

Primera PCR			Segunda PCR		
Componentes	C final	1 rx	Componentes	C final	1 rx
dH <sub>2</sub> O	---	6.525 µl	dH <sub>2</sub> O	---	---
10x Buffer A PCR	1 X	1.25 µl	10x Buffer A PCR	1 X	1.25 µl
MgCl <sub>2</sub> (50nM)	1.5 mM	0.375 µl	MgCl <sub>2</sub> (50nM)	----	---
dNTP's (10mM)	200 nM	0.25 µ	dNTP's (10mM)	200 nM	0.25 µ
Oligonucleótidos (10µM)	1600 nM	2 µl	Oligonucleótidos (10µM)	1600 nM	2 µl
Taq: pFu	0.5 U	0.1 µl	Taq: pFu	0.5 U	0.1 µl
V total mix	---	10.5 µl	V total mix	---	11.5 µl
cDNA	---	2 µl	Dilución	---	1 µl
<b>V total</b>		<b>12.5 µl</b>	<b>V total</b>		<b>12.5 µl</b>

Condiciones (Tiempo Total 6 hrs).

Programa de PCR para la primera y segunda PCR							
Tiempo: 2:48 hrs		Desnaturalización		Hibridización		Extensión	
SOIV GEN	Temperatura	95°	95°	Tm	72°	72°	4°
	Tiempo	5 min	30 seg	30 seg	90 seg	5 min	5 min
x35 ciclos							





## Notas

1. La caracterización genómica de los segmentos 6(NA) y 7(M) se lleva a cabo con la primera PCR.
2. La  $T_m$  de la primera PCR para los segmentos 2(PB1), 4(HA), 5(NP), 6(NA), 7(M), 8(NS) es de  $56^\circ\text{C}$ ; la  $T_m$  para el segmento 1(PB2) es de  $58^\circ\text{C}$ ; y la  $T_m$  para el segmento 3(PA) es de  $59^\circ\text{C}$ .
3. La dilución para los fragmentos del segmento 4(HA) es de 1:16, para el fragmento 2 del segmento 3(PA) es de 1:5 y para los fragmentos del resto de los segmentos es 1:10. El fragmento 4 del segmento 3(PA) utiliza 1 $\mu\text{L}$  del producto de la primera PCR sin diluir.
4. La concentración de  $\text{MgCl}_2$  para la segunda PCR de los fragmentos del segmento 2(PB1) es de 1.0mM; para los 4 fragmentos de los segmentos 3(PA), 4(HA) y el fragmento 3 de 5(NP) es de 1.5mM; para los fragmentos 2, 3 y 4 de 1(PB2), el fragmento 1 de 5(NP) y el fragmento 1 de 8(NS) es de 2.0mM; para el fragmento 1 del segmento 1(PB2) es de 2.5mM; y para el fragmento 2 del segmento 5(NP) y el fragmento 2 del segmento 8(NS) es de 3.0mM.
5. Limpiese el área de trabajo con  $\text{NaOCl}$  0.1% y Etanol al 70% antes y después de preparar las PCR.
6. Preparanse las PCR en charola de hielo o haciendo uso de los portatubos refrigerados.
7. 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.
8. Haga uso de la micropipeta más apropiada para cada rango de volumen a dispensar ¡Emplear las Rainin!
9. Para la primera PCR distribuya 17  $\mu\text{L}$  de la mezcla madre a cada tubo y agregue 12  $\mu\text{L}$  de DNA ( $\pm 100 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ); para la segunda PCR distribuya 23  $\mu\text{L}$  de la mezcla madre y agregue 2  $\mu\text{L}$  del producto de la primera PCR sin diluir.
10. Cuando termina la primera PCR, los tubos deben guardarse a  $-80^\circ \text{C}$  por 15 minutos, para evitar formar aerosoles.
11. Antes de realizar la segunda PCR, se agregan 125  $\mu\text{L}$  de agua al producto de la primera PCR para hacer la dilución 1:5, todo este paso se debe realizar en hielo.

## Referencias

1. CA García, Laboratorio de genómica viral y humana, Facultad de Medicina UASLP México,





2009.

2. Centers of Disease Control and Prevention. Sequencing primers and protocol. CDC EEUU, 12 mayo 2009.
3. EE Godoy, Laboratorio de genómica viral y humana, Facultad de Medicina UASLP México, 2009.

