



## Influenza virus A & B typing by end-point RT-PCR

Created: Jun 2, 2009; Last modified: Jun 2, 2009, Version: 1.0

Este protocolo describe los componentes y condiciones optimizados para la detección y tipificación de influenza virus humanos del tipo A y B a través de la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) multiplex. La técnica amplifica fragmentos de tamaños diferentes para cada uno de los dos tipos virales teniendo como blanco al fragmento genómico 8 codificante para la proteína NS. Los fragmentos se resuelven fácilmente por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. La síntesis de primer cadena (RT) se realiza en presencia del oligonucleótido UniFlu-RT.

### Oligonucleótidos

Nombre	Especificidad	Secuencia	Bases	%GC	Tm <sup>b</sup>	Posición §	Amplicón	Referencia
UniFlu-RT	Generico	5'-AGC-AAA-AGC-AGG-3'	12	50	39.7°		Genómico	1
FluA-F	Flu A	5'-CTA-AGG-GCT-TTC-ACC-GAA-GA-3'	20	50	54.4°	465	194 bp	2
FluA-R		5'-CCC-ATT-CTC-ATT-ACT-GCT-TC-3'	20	45	50.8°	656		
FluB-F	Flu B	5'-ATG-GCC-ATC-GGA-TCC-TCA-AC-3'	20	55	57.3°	746	241 bp	
FluB-R		5'-TGT-CAG-CTA-TTA-TGG-AGC-TG-3'	20	45	51.7°	986		

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

§ - Basada en las posiciones indicadas en la publicación original (2).





## Componentes de PCR

<b>Síntesis de Primer Cadena (RT)</b>		1 rx ( $\mu$ l)
dH <sub>2</sub> 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
	Vf	20

↓  
Correr RT-2

<b>Primera PCR</b>		1 rx ( $\mu$ l)
dH <sub>2</sub> O	<i>Cf</i>	5.575
10x Buffer PCR	1X	1.25
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	3.0 mM	0.375
4x dNTPs 10 mM	200 $\mu$ M	0.25
Oligos FluA 10 $\mu$ M	400 nM	1
Oligos FluB 10 $\mu$ M	400 nM	1
Taq 5 UI/ $\mu$ L	0.02 UI/ $\mu$ L	0.05
cDNA	-	3.00
	Vf	12.5

↓  
Correr FLU-ST



## Condiciones de PCR

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	45 min	10 min

Tiempo: 3 horas 30 minutos		Desnaturalización		Hibridización	Extensión		
Flu AB	Temperatura	95°	95°	58°	72°	72°	4°
	Tiempo	5 min	30 seg	30 seg	30 seg	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. Erdman DD, Weinberg GA, Edwards KM, Walker FJ, Anderson BC, Winter J, González M, Anderson LJ. GeneScan reverse transcription-PCR assay for detection of six common respiratory viruses in young children hospitalized with acute respiratory illness. J Clin Microbiol. 2003 Sep;41(9):4298-303.