



Detección por RT-PCR del virus de la influenza pandémica A(H1N1) 2009

Created: May 28, 2009; Last modified: May 28, 2009, Version: 1.0

Este protocolo describe los componentes y condiciones optimizados para la detección del virus de la influenza tipo A H1N1 de origen porcino a través de una reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) anidada. La técnica amplifica al fragmento genómico ocho correspondiente a la proteína no estructural (NS). El fragmento se resuelven por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. La síntesis de primer cadena (RT) se realiza en presencia del oligonucleótido UniFlu-RT el cual también es capaz de hibridizarse con secuencias de influenzavirus humanos.

Oligonucleótidos

Nombre	Especificidad	Secuencia	Bases	%GC	Tm ^b	Posición §	Amplicón	Referencia
UniFlu-RT	Genérico	5'-AGC-AAA-AGC-AGG-3'	12	50	39.7	1	Full genomic	1
Sw NS F	Específico	5'-ATG-GAC-TCC-AAC-ACC-3'	15	53.3	47.7	27	837 bp	2
Sw NS R	Específico	5'-TTA-AAT-AAG-CTG-AAA-CGA-G-3'	19	31.6	45.0	864		
Sw1 F	Específico	5'-CTT-GAA-AGA-GGA-ATC-GAG-CG 3'	20	50	52.5	230	429 bp	
Sw1 R	Específico	5'-GTC-TCC-CAT-TCT-CAT-CAC-AGT 3'	21	47.6	47.1	659		

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

§ - En base a los alineamientos locales generados a partir de las secuencias GISAIDS (A/California/04/2009, A/California/06/2009, A/California/07/2009, A/California/08/2009, A/Mexico/4603/2009, A/Mexico/4604/2009 y A/Texas/05/2009).

Componentes primera parte RT

	1	8	16	24	32	72	80	88	96
dH ₂ O	8.1	72.9	137.7	210.6	275.4	607.5	672.3	737.1	810
UniFlu-RT	4.5	40.5	76.5	117	153	337.5	373.5	409.5	450
dNTPs 10 mM	1	9	17	26	34	75	83	91	100
RNA	4	4	4	4	4	4	4	4	4

Condiciones primera parte RT

Tiempo: 12 minutos		Hibridización	Incubación
RT1	Temperatura	65° C	4°
	Tiempo	10 min	2 min





Componentes segunda parte RT

	1	8	16	24	32	72	80	88	96
10x Buffer	2	18	34	52	68	150	166	182	200
Enzima RT	0.4	3.6	6.8	10.4	13.6	30	33.2	36.4	40

Condiciones segunda parte RT

Tiempo: 1 hora 2 minutos		Síntesis 1er Cadena	Inactivación
RT2	Temperatura	38° C	70°
	Tiempo	45 min	10 min

Componentes primera PCR

		1	8	16	24	32	72	80	88	96
dH ₂ O	C _f	4.85	43.6	87.3	126.1	164.9	363.75	402.55	441.35	480.15
10x Buffer	1X	1	9	18	26	34	75	83	91	99
MgCl ₂	1.5 mM	0.3	2.7	5.4	7.8	10.2	22.5	24.9	27.3	29.7
dNTPs	200 μM	0.2	1.8	3.6	5.2	6.8	15	16.6	18.2	19.8
Oligo Sw NS 10 μM	1.6 μM	1.6	14.4	28.8	41.6	54.4	120	132.8	145.6	158.4
Taq 5 UI/μL	0.02 UI/μL	0.05	0.45	0.9	1.3	1.7	3.75	4.15	4.55	4.95
Volumen de master mix		8	72	144	208	272	600	664	728	792
Volumen por dispensar a tira de 8		-	-	-	26	34	75	83	91	99
Volumen por dispensar a c/tubo										
cDNA										
V _f (μL)										

Condiciones primera PCR

Tiempo: 1 hora 15 minutos		Desnaturalización		Hibridización		Extensión	
SOIV NS	Temperatura	95°	95°	54°	72°	72°	4°
	Tiempo	5 min	20 seg	30 seg	1.5 min	2 min	5 min
x15 ciclos							



Componentes segunda PCR

		1	8	16	24	32	72	80	88	96
dH ₂ O	<i>C_f</i>	8.7	78.3	156.6	226.2	295.8	652.5	722.1	791.7	861.3
10x Buffer	1X	1.25	11.25	22.5	32.5	42.5	93.75	103.75	113.75	123.75
MgCl ₂ 50 mM	1.0 mM	0.25	2.25	4.5	6.5	8.5	18.75	20.75	22.75	24.75
dNTPs 10 mM	200 μM	0.25	2.25	4.5	6.5	8.5	18.75	20.75	22.75	24.75
Oligo Sw1 10 μM	800 nM	1	9	18	26	34	75	83	91	99
Taq 5 UI/μL	0.02 UI/μL	0.05	0.45	0.9	1.3	1.7	3.75	4.15	4.55	4.95
Volumen de master mix		11.5	103.5	207	299	391	862.5	954.5	1046.5	1138.5
Volumen por dispensar a tira de 8		-	-	-	37.38	48.88	107.81	119.31	130.81	142.31
Volumen por dispensar a c/tubo										
Producto PCR 1:1										
V _f (μL)										

Condiciones segunda PCR

Tiempo: 2 horas 37 minutos		Desnaturalización		Hibridización		Extensión	
Flu A/B	Temperatura	95°	95°	56°	72°	72°	4°
	Tiempo	5 min	30 seg	30 seg	30 seg	5 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. Garcia-Sepulveda CA, Contreras-Treviño HI, Laboratorio de Biología Molecular.