

PROTOCOLO Y SECUENCIA DE PRIMERS

28 de abril de 2009

El Centro Colaborador de la OMS para Influenza en los CDC de Atlanta, Estados Unidos ha puesto a disposición la secuencia de primers (tabla adjunta) y el protocolo como sigue:

1. Extracción de RNA realizada en 100 ul de material viral (célula o huevo) y eluir en volumen 100 ul
2. Sólo necesita preparar 10-15 ul reacciones de PCR utilizando 1 ul de RNA
3. Los ciclos utilizando el RT-PCR Promega Access Quick son las siguientes:

Ciclo 1: 48C for 45'

Ciclo 2: 94C for 2'

Ciclo 3: 94C for 20s

Ciclo 4: 50C for 30s

Ciclo 5: 72C for 1'

Ciclo 6: Ir al ciclo 3 29X

Ciclo 7: 72C for 7'

Ciclo 8: 4C **hold**

4. El tamaño del producto verificado en gel agarosa
5. Prepare cada amplicon a ser secuenciado con cada M-13-forward y M-13-reverse y realice las reacciones de secuencia y limpie de acuerdo al protocolo de sus instrumentos.

Swine Genome Primer Set

PB2		forward	5'	3'	reverse	5'	3'
fragment 1	1	tgt	aaa acg acg gcc agt agc aaa agc agc att		538	cag gaa aca gct atg acc ctt cca tra tta cat cyt ggc	
fragment 2	328	tgt	aaa acg acg gcc agt gtr aca tgg tgg aay aga a		816	cag gaa aca gct atg acc gct ttg rtc aay abc rtc at	
fragment 3	487	tgt	aaa acg acg gcc agt cct ggt cay gaa gac ctc ag		1019	cag gaa aca gct atg acc cca aar ctg aay gay gar ctt at	
fragment 4	713	tgt	aaa acg acg gcc agt caa gaa gtr ttt aca tgg aag t		1288	cag gaa aca gct atg acc cct cta act gct ttt ayc atg caa t	
fragment 5	946	tgt	aaa acg acg gcc agt ccr acw gaa gaa caa gct gt		1509	cag gaa aca gct atg acc gga gta ttc atc yac acc cat	
fragment 6	1169	tgt	aaa acg acg gcc agt aag caa ccm gaa gat tgr ttc a		1740	cag gaa aca gct atg acc ctg aga cca ytg aat ttt rrc a	
fragment 7	1447	tgt	aaa acg acg gcc agt cca aag acc gam gat tca atg aga		2186	cag gaa aca gct atg acc ttr ctc art tca ttt atg ct	
fragment 8	1683	tgt	aaa acg acg gcc agt caa tac cta yca rtg gat cat cay aa		2341	cag gaa aca gct atg acc tag tag aaa caa ggt cgt t	
PB1		forward			reverse		
fragment 1	22	tgt	aaa acg acg gcc agt agc aaa agc agc tca att		477	cag gaa aca gct atg acc ctr aaw act tct atr gtg tt	
fragment 2	233	tgt	aaa acg acg gcc agt caa ctc aac ccr att gat ggr cca ct		843	cag gaa aca gct atg acc gtt caa gct ttt crc awa tg	
fragment 3	389	tgt	aaa acg acg gcc agt aca agr gtg gac aaa tra c		1041	cag gaa aca gct atg acc ctg aac cay tca ggy tga ttt	
fragment 4	711	tgt	aaa acg acg gcc agt tga aca cra tga cca ary a		1278	cag gaa aca gct atg acc ttg aac atg ccc atc atc aty cca gg	
fragment 5	974	tgt	aaa acg acg gcc agt aat caa aay cct mga atg tt		1566	cag gaa aca gct atg acc agc tcc atg ctr aat ttr gc	
fragment 6	1139	tgt	aaa acg acg gcc agt caa ata ccy gaa gar atg cta gc		1659	cag gaa aca gct atg acc cca agr tca ttg ttt atc at	
fragment 7	1489	tgt	aaa acg acg gcc agt atg aay aaa aag aag tcy ta		1954	cag gaa aca gct atg acc tca aty tcy tta tgg gtg ac	
fragment 8	1532	tgt	aaa acg acg gcc agt gcy aat tly agc atg gag ct		2321	cag gaa aca gct atg acc agt aga aac aag gca ttt	
PA		forward			reverse		
fragment 1	0	tgt	aaa acg acg gcc agt agc aaa agc agc tac tga t		493	cag gaa aca gct atg acc tar tck gcc ttt gtg gcc att tc	
fragment 2	235	tgt	aaa acg acg gcc agt cca aat gca ctg tta aar cac aga tt		766	cag gaa aca gct atg acc tga gaa agc ttg ccc tca atg	
fragment 3	361	tgt	aaa acg acg gcc agt tat ggy tac aar gag aa		989	cag gaa aca gct atg acc ggt tct ttc cat cca aag aat gtt	
fragment 4	702	tgt	aaa acg acg gcc agt tgc mlt gar aat ttt agr acc ta		1292	cag gaa aca gct atg acc tcr cak gcc ttg tgy aac tta tt	
fragment 5	894	tgt	aaa acg acg gcc agt aaa ttr agc att gar gay cca		1662	cag gaa aca gct atg acc taw agt ctg ggg tca gtg ag	
fragment 6	1204	tgt	aaa acg acg gcc agt taa ggy att tra agc aat atg a		2037	cag gaa aca gct atg acc aay ccy tcy aat tgt gww gat g	
fragment 7	1444	tgt	aaa acg acg gcc agt aat gaa tcc tgt gca gaa atg ga		2057	cag gaa aca gct atg acc ttg tcc cta aga gcc tga aca a	
fragment 8	1787	tgt	aaa acg acg gcc agt atg aar tgg gga atg gag atg ag		2233	cag gaa aca gct atg acc agt aga aac aag gta cct ttt	
HA		forward			reverse		
fragment 1	1	tgt	aaa acg acg gcc agt ata cga cta gaa aaa gaa ggy g		461	cag gaa aca gct atg acc tca tga ttg ggc cay ga	
fragment 2	351	tgt	aaa acg acg gcc agt acr tgt tac caw gyr gat ttc a		943	cag gaa aca gct atg acc gaa akgy gga gtc tgy ttr tta	
fragment 3	379	tgt	aaa acg acg gcc agt aat gar aar ttr aag aac a		1204	cag gaa aca gct atg acc caa tgg crt lty tgy tgr tc	
fragment 4	736	tgt	aaa acg acg gcc agt agr atg rac tat tac tgg ac		1340	cag gaa aca gct atg acc ttc txc att rta wgt cca aa	
fragment 5	1124	tgt	aaa acg acg gcc agt tgg atg gta ygg tta yca yca		1541	cag gaa aca gct atg acc tca taa gty cca ttt ytr a	
fragment 6	1204	tgt	aaa acg acg gcc agt aag atg aay aar car ttc aca g		1778	cag gaa aca gct atg acc gtg tca gta gaa aca agg gtg ttt	
NP		forward			reverse		
fragment 1	1	tgt	aaa acg acg gcc agt cay ggt aga taa tca ctc ac		553	cag gaa aca gct atg acc aga gaa cat yct ggy atc cat	
fragment 2	296	tgt	aaa acg acg gcc agt atg gtr ctg tct gct ttt gat ga		757	cag gaa aca gct atg acc ttt gtr cag ctg ttt gaa att lyc ctt t	
fragment 3	513	tgt	aaa acg acg gcc agt tgg cat tch aat ttr aat gat		1042	cag gaa aca gct atg acc ctg rct ctt gtr tgc dgg	
fragment 4	619	tgt	aaa acg acg gcc agt gct gca gtc aar gga yt		1177	cag gaa aca gct atg acc aag cra ttt gta cyc ctc tag t	
fragment 5	925	tgt	aaa acg acg gcc agt cct gcy tgt ygy taw gga c		1565	cag gaa aca gct atg acc agt aga aac aag ggt att ttt c	
NA		forward			reverse		
fragment 1	0	tgt	aaa acg acg gcc agt agc aaa agc agc agt		600	cag gaa aca gct atg acc ctg gac cryg aaa ttc c	
fragment 2	318	tgt	aaa acg acg gcc agt tac aca aaa gac aay agc		740	cag gaa aca gct atg acc ggr cca tcy gtc att atg	
fragment 3	536	tgt	aaa acg acg gcc agt ggt cay caa ggc cat gyc atg a		1063	cag gaa aca gct atg acc cat aty tgt atg aaa acc	
fragment 4	726	tgt	aaa acg acg gcc agt aat gyr car gcc tcr tac aa		1346	cag gaa aca gct atg acc gct gct ycc rct agt cca gat	
fragment 5	941	tgt	aaa acg acg gcc agt tag gat aca tct gca gtr g		1452	cag gaa aca gct atg acc agt aga aac aag gag	
M		forward			reverse		
fragment 1	0	tgt	aaa acg acg gcc agt agc aaa agc agc tag		473	cag gaa aca gct atg acc gca atc tgy tca cak gt	
fragment 2	223	tgt	aaa acg acg gcc agt caa cgt gcc cay tga ggc		750	cag gaa aca gct atg acc tca ytt gaa ycg ytg cat	
fragment 3	383	tgt	aaa acg acg gcc agt tct gct gyy gca ctt gcc agt tg		1027	cag gaa aca gct atg acc agt agm aac aag gta gt	
NS		forward			reverse		
fragment 1	24	tgt	aaa acg acg gcc agt agc aaa agc agc gtg aca aag aca		482	cag gaa aca gct atg acc tcy gtg aaa gcc ctt a	
fragment 2	250	tgt	aaa acg acg gcc agt tga ggc wyt taa aat gat ca		890	cag gaa aca gct atg acc agt aga aac aag ggt gtc ttt tat	
fragment 3	418	tgt	aaa acg acg gcc agt aaa gcd aay ttc agt gtrg		742	cag gaa aca gct atg acc ttc aat hag cca tct ta	
m13 forward		m13 forward					
m13 reverse		m13 reverse					