

Protocolo de RT-PCR en tiempo real (TaqMan™) - Virus de la fiebre amarilla (YFV)

1. Mezcla

Componente	Volumen por reacción	Volumen para 10 reacciones	Volumen para 50 reacciones
agua (libre de ARNasa/ADNasa)	6.4 µl *	64 µl *	320 µl *
tampón de reacción (2x)	12.5 µl *	125 µl *	625 µl *
cebador 1 (100 µM)	0.25 µl	2.5 µl	12.5 µl
cebador 2 (100 µM)	0.25 µl	2.5 µl	12.5 µl
sonda (25 µM)	0.15 µl	1.5 µl	7.5 µl
enzima	0.5 µl *	5 µl *	25 µl *
Total por reacción		20 µl	

2. ARN

Añadir **5 µl** de ARN a los 20 µl de mezcla.

Incluir **controles** positivos y negativos para evaluar la validez de la corrida.

3. Ciclaje

1 ciclo de:

50°C por 30 min * (transcripción inversa)

95°C por 2 min * (activación de la ADN polimerasa, "hot start")

45 ciclos de PCR de:

95°C por 15 segundos

60°C por 1 min

4. Interpretación

positividad: valor de Cq (Ct) ≤ 38

validez de la prueba: los controles positivos y negativos deben tener el resultado esperado

5. Cebadores y sondas

Se recomienda el uso de uno de los conjuntos de cebadores y sondas TaqMan™ descritos a continuación:

Domingo *et al.*, *J Clin Microbiol* **50**, 4054-60 (2012)

YFallF (YF15-38F)

5'-GCTAATTGAGGTGYATTGGTCTGC

YFallP (YF41-64FAM)

5'-FAM-ATCGAGTTGCTAGGCAATAAACAC-BHQ1

YFallR (YF83-103R)

5'-CTGCTAATCGCTCAAMGAACG

o

Johnson *et al.*, CDC (no publicado)

YF14-34F

5'-TGCTAATTGAGGTGCATTGG

YF34-57FAM

5'-FAM-TCTGCAAATCGAGTTGCTAGGCA-BHQ1

YF115C

5'-CTGGTCAGTTCTCTGCTAATCG

* Los volúmenes y tiempos indicados son para uso del estuche SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen, número de catálogo: 11732-020 o 11732-088) y deben ajustarse cuando se utilizan otras enzimas.