

CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA FITOSANITARIA  
 LABORATORIO DE VIROLOGÍA

Fecha \_\_\_\_\_

Folio \_\_\_\_\_

No. De Dictamen \_\_\_\_\_

Patogeno	Iniciador	pb
RpRSV	RpRSV_F1	385
	RpRSV_F2	

Nombre del Programa: \_\_\_\_\_

 Termociclador utilizado:
 

1	2	3	4	5
---	---	---	---	---

A	B
---	---

**Técnica de RT-PCR (Dos pasos)**

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración final	Volumen (µL) 1 reacción	Volumen (µL)
RNA	50-100 ng/ uL	--	2	
Agua ° PCR			1.5	
Buffer de 5x	5 X	1 X	2	
Inhibidor de RNA	40 U/µL	20 U/ rnx	0.5	
Oligo µM (Reverse)	10 µM	2 µM	2	
<b>Volumen subtotal</b>			<b>8</b>	

No. De Reacciones \_\_\_\_\_

Temperatura	Tiempo	Ciclo
70 °C	10 '	1

DTT	100 mM	10 mM	1	
Inhibidor de RNA	40 U/µL	20 U/rnx	0.25	
dNTP's	10 mM	0.5 mM	0.5	
Reverso Transcrip	200 U/µL	50 U/rnx	0.25	
<b>Volumen subtotal</b>			<b>2</b>	
<b>Volumen final RT</b>			<b>10</b>	

Temperatura	Tiempo	Ciclo
42 °C	60 '	1

Buffer de PCR	10 X	1X	2	
MgCl2	50 mM	1.5mM	0.6	
dNTP's	10 mM	0.2 mM	0.4	
Oligo µM	10 µM	0.5 µM	1	
Oligo µM	10 µM	0.5 µM	1	
Taq polimerasa	5 U/µL	0.5 U/rnx	0.1	
cDNA			2	
Agua ° PCR			12.9	
<b>Volumen final</b>			<b>20</b>	

Temperatura	Tiempo	Ciclo
94 °C	3 '	1
94 °C	30 s	35
61 °C	30 s	
72 °C	30 s	
72 °C	5 '	1

**Anotaciones:**
**Secuencias de oligos**

RpRSV F1 TGT GTC TGG CTT TTG ATG CT

RpRSV F2 GAG TGC GAT AGG GGC TGT T

**Referencia**

Ochoa-Corona, F. M, Lebas, B. S. M., Tang, J., Bootten, T. J., Stewart, F. J., Elliott, D. R. and Alexander, B. J. R. 2005. Diagnosis and strain typing of Pepino mosaic virus and Raspberry ringspot virus by RT-PCR and SSCP. The 15th biennial Australasian plant pathology society conference handbook; p 259.

**Observaciones**

Rubrica del técnico \_\_\_\_\_