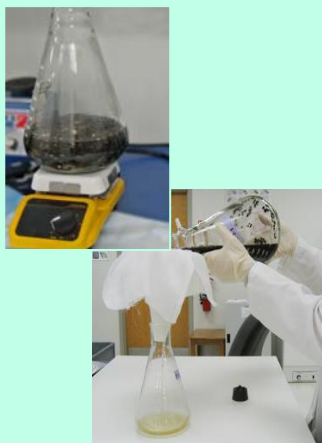


Aspectos sobresalientes

- Alternativa rápida al método de germinación ("grow out")
- Captura inmunomagnética de alta sensibilidad
- Altamente específico para *Acidovorax avenae subsp. Citrulli* (Aac)

Contenido del Kit

- Micro-esferas magnéticas tratadas con anticuerpos estabilizados
- Ver "Precauciones y Notas" para una lista de materiales y equipo necesarios para preparar muestras



Remoje las semillas en tampón PBS, filtrar

No de Catálogo AB 048 BS

Propósito del Kit

El kit QuickBead para el Bacterial Fruit Blotch (BFB) permite detectar con alta sensibilidad, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac), el agente causal del BFB en cucurbitáceas. La combinación de las micro-esferas inmunomagnética (MEI) con PCR, facilitan el diagnóstico de Aac a concentraciones de hasta $10^3 - 10^2$ cfu/mL.

Como Funciona el Diagnóstico

Este prueba ha sido diseñada para analizar lotes de semilla sospechosos de estar contaminados con BFB. Las MEI proporcionadas en el kit están cubiertas con un anticuerpo monoclonal muy específico al Aac. Se ha demostrado que el anticuerpo detecta las variantes conocidas del Aac y no reacciona con otras *Acidovorax* spp, *Pseudomonads*, o patógenos de cucurbitáceas tales como *Acidovorax facilis*, *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*, *Acidovorax konjaci*, *Acidovorax cattleyeae*, *Comamonas testosteroni*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas acidovorans* y *Pseudomonas lachrymans*. Las MEI, por lo tanto permiten capturar el Aac presente en extractos de semillas con alta sensibilidad y especificidad, así acelerando el análisis posterior de la bacteria mediante PCR convencional, o PCR de tiempo real.

El uso de las MEI para la detección del BFB mediante separación inmunomagnética y posterior PCR ha sido caracterizado y documentado por el Dr. Ron Walcott, Profesor Asociado de Fitopatología en la Universidad de Georgia. Los métodos aquí descritos están basados (a) en sus informes (Walcott, R.R., *et al.* (2006), *Seed Sci. & Technol.*, **34**, 101-116 y Walcott, R.R., *et al.* (2000), *Plant Disease*, **84**, 470-474) y (b) informes independientes de las compañías de la semilla.

Preparación de las Muestras

Ver "Precauciones y Notas" para las instrucciones en la preparación de la solución de PBS

Preparación del lavado de semilla:

1. Coloque una muestra de 5000 semillas en un Erlenmeyer estéril de 1 L de capacidad (o recipiente similar). Añada 500 ml de 1X PBS, pH 7.4. Cierre el recipiente y deje remojar la muestra por 1 hora sobre un agitador orbital a 150 rpm.

Nota: El peso de una muestra de 5000 semillas varía dependiendo del tamaño de la semilla. Para calcular la cantidad de PBS a añadir, multiplique el peso de la muestra (gramos) por 2 y use ese número, en mililitros para determinar el volumen de PBS a añadir. Por ejemplo, 5000 semillas que pesan 250 gramos, requerirán 500 ml de PBS.

2. Recolecte el extracto y filtre a través de 4 paños de gaza estéril. Utilice un embudo y Erlenmeyer estériles.
3. Centrifugue el filtrado del extracto de semillas por 10 minutos a 2500 rpm.
4. Decante el sobrenadante en otro Erlenmeyer esterilizado de 1 litro de capacidad y agregue pectinasa. La concentración final de extracto de semilla/pectinasa debe ser del 5% (5 ml de pectinasa en 95 ml de extracto de semilla). Incube por



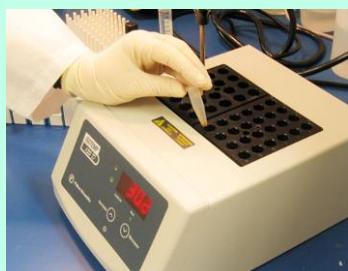
Resuspenda las micro-esferas



Agregue 0.25 mL de las QuickBeads al 6 mL de muestra concentrada



Recupere las micro-esferas utilizando un concentrador de partículas magnéticas (MPC)



Caliente las QuickBeads en un bloque a 100°C durante 10 minutos para liberar el ADN

una hora a temperatura ambiente en un agitador a 100 rpm. Nota: La pectinasa funcionara mejor en condiciones de pH ácido (los extractos de semilla por lo general estarán dentro de un rango ácido).

5. Filtre el extracto de semilla tratado con pectinasa a través de un papel filtro Whatman #1. Utilice otro Erlenmeyer estéril para recolectar el filtrado. Si el proceso de filtración toma mas de una hora, remplace el filtro para acelerarlo.

Concentración del extracto de semilla.

6. Centrifugue el extracto filtrado a 8000 rpm por 15 minutos. El precipitado se formara un lado de la botella.
7. Elimine el sobrenadante y resuspenda el precipitado en 6 ml de 1X PBS. Transfíralo a un tubo de vidrio esterilizado con tapa rosca (No. 9825 Pyrex, USA). Utilice esta suspensión para la separación inmunomagnética.

Separación Inmunomagnética

Ver "Precauciones y Notas" para las instrucciones en la preparación de soluciones del PBS-Tween y del Tris-Tween

1. Agite varias veces el tubo que contiene las QuickBeads, hasta que éstas queden suspendidas.
2. Agregue 0.25 ml de las micro-esferas suspendidas, a los 6 ml de concentrado de semilla preparado anteriormente. Incube la muestra durante una (1) hora a una temperatura entre 4°-8°C, agitándola de forma continua y ligera, en un agitador a 15-30 rpm.
3. Recupere las micro-esferas utilizando un concentrador de partículas magnéticas (MPC; e.g. Dynal MPC-L fabricada por Invitrogen). Lave las micro-esferas 4 veces; tres veces con 8 ml de 1X PBS-Tween 20 y una vez con 8 ml de 10mM Tris-Tween. Use el concentrador de partículas magnéticas para separar las micro-esferas del líquido de lavado. Evite agitar demasiado las QuickBeads en este paso.

Para máxima concentración: Después del último lavado, añada un volumen pequeño de 10mM Tris-Tween al tubo de vidrio para llevar las esferas al fondo. Usando una pipeta, transfiera las micro-esferas a un tubo de microcentrifugación plástico de 1.5 ml. Remueva el exceso de Tris-Tween del microtubo utilizando el MPC. Finalmente, resuspenda las QuickBeads en 20-50 µl de 10mM Tris-Tween.

4. Para lograr la ruptura de las células bacterianas y así liberar el ADN, caliente el tubo cerrado en un bloque a 100°C durante 10 minutos. Centrifugue las muestras a 13000 rpm por 60 segundos para coleccionar las QuickBeads y otros residuos en el fondo del tubo. Coloque los tubos de vuelta en el MPC para facilitar la toma de la muestra sin microesferas para el PCR. El sobrenadante que resulta puede utilizarse directamente en las reacciones PCR. Coloque los microtubos tubos en hielo o en el refrigerador si no se van a utilizar inmediatamente.

Almacenaje del Kit

Este Kit debe almacenarse bajo refrigeración. La vida útil del Kit esta indicada en la etiqueta de la caja.

Precauciones y Notas

- Este prueba ha sido optimizada para ser utilizado con el protocolo proporcionado con el kit, el cual se basa en la técnica del IMS desarrollada por Ron Walcott *et al.* Cambios a este protocolo puede invalidar los resultados del ensayo.

- Si su intención es analizar el producto de la inmunoseparación magnética con medios de cultivo, quite el azide de sodio de las QuickBeads aclarando tres veces en un volumen equivalente de 1X PBS antes de uso..
- Se recomienda usar un extracto de semilla positivo (artificial o natural) como control para asegurarse que el procedimiento se ha seguido correctamente.
- Siga las buenas prácticas de laboratorio de evitar la contaminación cruzada de muestras.
- Preparación de los tampones 1X PBS, 1X PBS-Tween, y 10mM Tris-Tween:
 - Concentrado 10X PBS (1L en agua destilada)
 - 80g NaCl
 - 2g KCl
 - 11.5g Na₂HPO₄ (anhydrous)
 - 2g KH₂PO₄
 - Para 1X PBS, diluya 100 mL del concentrado en 900 mL de agua (pH 7.4 finalmente). Esteriolize en autoclave..
 - Para 1X PBS-Tween, agregue Tween 20 a un índice de 0.02% (200 µL Tween 20 por cada litro de 1X PBS, después de la esterilización).
 - Para 10mM Tris-Tween: 10mM Tris- 0.02% Tween pH 8.3
 - o $\left\{ \begin{array}{ll} \text{Tris-Base} & 1.21 \text{ g} \\ \text{diH}_2\text{O} & 1 \text{ L} \end{array} \right.$
Ajuste el pH a 8.3, entonces agregue Tween 20, 200 µl
 - o $\left\{ \begin{array}{ll} \text{Tris-Base} & 0.740 \text{ g} \\ \text{Tris-HCl} & 0.614 \text{ g} \\ \text{diH}_2\text{O} & 1 \text{ L} \end{array} \right.$
Verifique el pH (debe estar a 8.3 at 25°C), entonces agregue Tween 20, 200 µl
- Materiales y equipo necesarios para preparar el extracto de semilla:
 - PBS10X
 - Agitador orbital
 - Erlemyers de 1 L o recipientes similares
 - Gaza
 - Embudo
 - Centrifuga de alta velocidad (8000 rpm) y recipientes con capacidad de 200 ml
 - Pectinasa, Sigma # P2736 o su equivalente
 - Papel filtro Whatman #1
 - Tubos de vidrio con tapa (Pyrex N0 9825 o equivalente).
- Materiales y el equipo necesarios para la separación inmunomagnética:
 - Pipeta y puntas de pipetas con capacidad de dispensar 1-10 ml y 20-250 µl
 - Soluciones tampones: Tween, Tris-Base, diH₂O, Tris-Ácido clorhídrico
 - Agitador orbital, rotativo o rotiscero
 - Concentrador de partículas magnéticas Dynal MPCL o equivalente
 - Micro centrifugadora de alta velocidad 13000 rpm
 - Tubos para microcentrifuga
 - TermoBloque

**Para Soporte Técnico
Contáctenos en:**

EnviroLogix
500 Riverside Industrial
Parkway
Portland, Maine
04103-1486 USA

Tel: (207) 797-0300
Fax: (207) 797-7533

e-mail:
***horticulture@
envirologix.com***

Página web:
www.envirologix.com

**GARANTIA LIMITADA**

EnviroLogix Inc. (“EnviroLogix”) garantiza los productos vendidos conjuntamente con este instructivo (“los Productos”) contra defectos en los materiales y en cuanto a la calidad de mano de obra cuando estén utilizados antes de la fecha de vencimiento indicada en su empaque y de acuerdo a las instrucciones aplicables. En el caso de que los Productos no estén conformes a esta Garantía Limitada y el cliente notifica EnviroLogix por escrito de dichos defectos durante el plazo de la garantía, incluyendo una oferta por el cliente de devolver los Productos a EnviroLogix para su evaluación, EnviroLogix a su opción reparará o reemplazará cualquier producto o parte del mismo que demuestra tener defectos en los materiales o en la calidad de mano de obra dentro del plazo de la garantía.

ENVIROLOGIX OTORGA NINGUNA OTRA GARANTIA, SEA EXPLICITA O IMPLICITA, INCLUYENDO SIN LIMITACION CUALESQUIERA GARANTIAS IMPLICITAS DE INDOLE COMERCIAL O DE USO.

La garantía otorgada mediante este instrumento y los datos, especificaciones y descripciones de los productos de EnviroLogix que aparecen publicados en sus catálogos y demás literatura oficial son las únicas representaciones realizadas con respecto a los Productos y la Garantía. Con la salvedad de declaraciones escritas firmadas por un funcionario debidamente autorizado por EnviroLogix Inc., ningunas otras declaraciones o representaciones, escritas u orales, realizadas por empleados, agentes o representantes de EnviroLogix son válidas, no constituyen parte de la garantía otorgada mediante este instrumento, no constituyen una parte del convenio de compra-venta y no deben considerarse fiables.

EnviroLogix no garantiza contra daños o defectos causados por el mal manejo, transporte, accidentes o el uso indebido o anormal de los Productos, contra defectos en productos o componentes no fabricados por EnviroLogix, ni contra daños causados por dichos componentes no fabricados por EnviroLogix. EnviroLogix le cede al cliente la garantía recibida (si existe) del fabricante de dichos productos o componentes. Esta garantía tampoco aplica a los Productos que hayan sufrido cambios o modificaciones realizadas o intentadas por personas que no estuviesen expresamente autorizadas por EnviroLogix.

ESTA GARANTIA ES EXCLUSIVA. La única y exclusiva obligación de EnviroLogix será de reparar o reemplazar los productos defectivos en la manera y el plazo antes mencionado. Con respecto a los Productos o cualquier parte de los mismos EnviroLogix no asume ni asumirá ninguna otra obligación, independientemente de que sea derivada del mismo convenio de compra-venta, agravio (“tort”), responsabilidad estricta (“strict liability”) o cualquier otra base.

Bajo ninguna circunstancia EnviroLogix se responsabilizará por daños consecuentes, especiales o incidentales independientemente de que sean basados en esta Garantía Limitada o no.

Esta Garantía Limitada expresa la totalidad de la obligación de EnviroLogix con respecto a los Productos. Si se determina que cualquier parte de esta Garantía Limitada es inaplicable o ilegal, el resto de la misma permanecerá en plena vigencia.

Licencia

EnviroLogix ha desarrollado este kit utilizando reactivos propios.

EnviroLogix, el logo de EnviroLogix y QuickBeads™ son marcas registradas de EnviroLogix Inc.

© EnviroLogix 2009