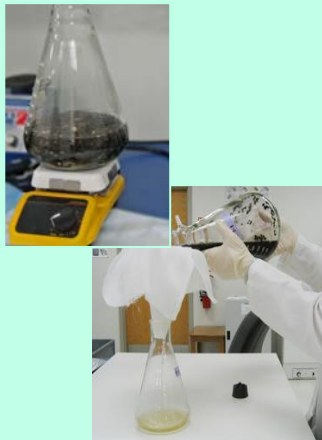


## Aspectos sobresalientes

- 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 inmunomagnéticas (MEI) con PCR, facilitan la detección de Aac en soluciones de tampón, 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, *Pseudomonas*, o patógenos de cucurbitáceas tales como *Acidovorax facilis*, *Acidovorax avenae subsp. avenae*, *Acidovorax konjaci*, *Acidovorax cattleyae*, *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 fíltrelo 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



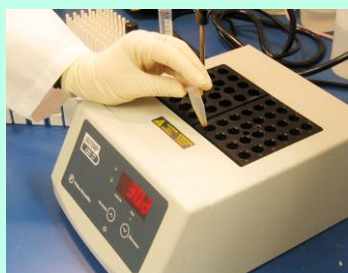
Resuspenda las micro-esferas



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

debe ser del 5% (5 ml de pectinasa en 95 ml de extracto de semilla). Incube por 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, reemplace 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. Invierta repetidamente uno de los tubos QuickBeads hasta suspender las micro esferas inmunomagnéticas (MEI).
2. Transfiera el volumen de MEI a usar ( $250\mu\text{l}$  x el numero de tubos/submuestras a procesar) a un tubo estéril. Inserte el tubo en el separador magnético (MPC); e.g. Dynal MPC-L fabricado por Invitrogen. Remueva la solución tampón de almacenamiento y reemplácela con la misma cantidad de IMS 1X PBS. Remueva el tubo del MPC y resuspenda las MEI.
3. Transfiera 0.25 ml de las MEI resuspendidas a los 6.0 ml del extracto de semilla concentrado, preparado en el paso 7 de la sección "Preparación de muestra". Incube la muestra a temperatura de Laboratorio ( $21-25^{\circ}\text{C}$ ) por una hora, usando un agitador rotativo. Se puede usar el agitador orbital que se uso en la preparación del extracto de semilla.
4. Lave las MEI incubadas (remueva y reemplace la solución tampón de lavado 4 veces): Lave 3 veces con 8.0 ml de 1X PBS-Tween y una vez con 8.0 ml of 10mM Tris Tween. Remueva y añada la solución tampón con una pipeta de transferencia (pipeta Pasteur) mientras las MEI han estado atraídas al magneto al menos por 1 minuto. Entre lavados, resuspenda las MEI lentamente antes de colocarlas de vuelta en el MPC para el siguiente lavado (evite agitar las MEI muy rápidamente).
5. Para maximizar la concentración: Después del remover la solución tampón del ultimo lavado, añada  $\sim 250\mu\text{l}$  de 10mM Tris-Tween al tubo de vidrio. Remueva el tubo del MPC y mezcle las esferas lentamente hasta suspenderlas. Usando un pipeta de transferencia, transfiera las esferas a un microtubo plástico de 1.5 ml. Coloque el microtubo en el MPC y remueva el exceso de Tris Tween. (Si fuera necesario, use este Tris, para lavar otra vez el tubo de vidrio y recobrar las MEI que no fueron transferidas.) Evite crear muchas burbujas durante la transferencia.
6. Remueva el microtubo del MPC con solo las MEI y cuidadosamente llévelas al fondo pipeteando  $35-50\mu\text{l}$  de 10mM Tris-Tween (preparación nueva y estéril) sobre ellas. Cierre el tubo y centrifuguelo rápidamente para llevar al fondo cualquier esfera adherida a la pared (haga esto mientras las MEI estén húmedas. Una vez secas es difícil manipularlas).
7. Para desintegrar la bacteria y liberar el ADN, caliente el microtubo cerrado en un bloque de calentamiento por 10 minutos. Después de esto, centrifugue la muestra

a 13000 rpm por 30 s para recolectar las esferas y fragmentos de células en el fondo. Coloque el microtubo en MPC para facilitar la remoción de sobrenadante sin MEI. Remueva del tubo un volumen de sobrenadante con 5  $\mu$ l menos de los 35-50  $\mu$ l añadidos en el paso 6. Use este volumen (ADN extraído) para el PCR. Puede colocar la muestra de ADN en hielo hasta que este lista para la prueba.

Notas: Si Paso 7 no puede ser completado en el mismo día, congele los microtubos con las MEI (Paso 6). Al día siguiente, continúe con el calentamiento, centrifugación y remoción del sobrenadante para el PCR (Paso 7).

Asegúrese que la temperatura del bloque de calentamiento este a 95°C, pero debajo de 100°C. Use un termómetro para verificarla antes de la extracción. Temperaturas por encima 100°C alteran la estructura de las MEI liberando su contenido, el cual puede afectar la reacción de PCR.

## 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.
- 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 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (anhydrous)
    - 2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
  - 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  $\mu$ L 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  $\mu$ l
    - 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  $\mu$ l

- **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  $\mu$ l
- Soluciones tampones: Tween, Tris-Base, diH<sub>2</sub>O, 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
- Equipo/instrumentos para la reacción de PCR

**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 2011