

Aspectos Sobresalientes

- Plato ELISA para uso inmediato
- Protocolo de dos horas (semilla)
- 1.5 hora protocolo (hoja/plantula)
- Calidad consistente
- Alta eficiencia
- Protocolo adicional de alta sensibilidad

Contenido del Kit

- Plato ELISA sólido de 96 pocillos, recubierto con anticuerpos específicos al Virus Mosaico de la Lechuga (LMV)
- Conjugado Emzimático
- Tampón de Extracción para semilla y tejido foliar (concentrado 10x, para 1 litro)
- Tampón de Lavado (paquete de sales para dilución en solución)
- Substrato
- Solución "STOP"

Materiales Requeridos

- Pipeta tipo "multi-canal" capaz de transferir 100 µL
- Tubos de dilución (opcional) para transferir las muestras al plato de ELISA con la pipeta "multi-canal"
- Marcador indeleble
- Cinta o Parafilm®
- Cronómetro
- Agua destilada o des-ionizada para la preparación del Tampon de Lavado y para diluir el Tampon de Extracción 10X
- Lavador automático de platos de ELISA, o botella de lavado para ese fin
- Agitador automático de platos de ELISA
- Espectrofotómetro capaz de lecturar a 450 nanómetros (nm)



Prepare Tampones

Número de Catálogo AP 059

Propósito del Kit

El Kit QualiPlate para el Virus del Mosaico de la Lechuga (LMV) detecta la presencia del LMV en extractos de semilla y tejido foliar obtenidos mediante diferentes métodos de extracción. Se ha comprobado que el anticuerpo usado en el kit, reacciona por lo menos con seis cepas del virus de diferente origen geográfico. Este kit detecto consistentemente la presencia del virus, en lotes de semilla previamente diagnosticados positivos por otros métodos (muestras de 30,000 semillas y sub-muestras mínimas de 500 semillas). Este kit también tiene un protocolo adicional de alta sensibilidad para semillas (ver sección de Precauciones y Notas).

Preparación de las soluciones

- **Tampon de Lavado:** Agregue el contenido del paquete de sales de lavado (solución salina de fosfato, pH 7.4–0.05% Tween 20) a 1 litro de agua destilada o des-ionizada, y mezcle hasta disolver. Mantenga la solución refrigerada mientras no se use. Permita que la solución alcance temperatura ambiente, antes de usarla. Paquetes adicionales de sales para 1L pueden adquirirse de Sigma Chemicals, Cat # P-3563; formulaciones similares pueden prepararse con ingredientes de laboratorio.
- **1X Tampon de Extracción para semilla y tejido foliar:** Permita que la solución tampón 10X alcance temperatura ambiente (a temperaturas bajas puede ocurrir precipitación de los componentes, lo cual es normal). Para preparar la solución, agregue los 50 mL del tampón concentrado a 450 mL de agua destilada o des-ionizada en un recipiente apropiado. Mezcle la solución vigorosamente hasta disolver. Mantenga la solución refrigerada mientras no se use. Permita que la solución alcance temperatura ambiente, antes de usarla. Tampón concentrado 10X, puede ser adquirido en EnviroLogix (Cat # KR160).

Preparación de Muestras

Semillas: La extracción de la muestra debe realizarse utilizando una relación 1:15; peso (gramos) de semilla, y volumen (mL) de tampón de extracción 1X. Por ejemplo:

- 0.5 g de semilla : 7.5 mL Tampón de extracción 1X
- 0.05 g de semilla : 0.75 mL Tampón de extracción 1X

Toda la semilla debe molerse completamente para asegurar contacto entre el tejido interno y el tampón. La semilla debe remojar en el tampón, como mínimo, una hora y a 4°C. Para la prueba, utilice el líquido transparente de la porción media del extracto.

Tejido foliar: La extracción de la muestra debe realizarse utilizando una relación 1:10; peso (gramos) de tejido, y volumen (mL) de tampón de extracción 1X. Por ejemplo:

- 0.5 g tejido foliar: 5.0 mL tampón de extracción 1X

El tejido foliar debe macerarse completamente y el extracto debe usarse inmediatamente.



Agregue las muestras y los controles (blancos y negativos).



Mezcle e incube



Método de lavado con botella



Agregue el Conjugado Enzimático, mezcle, incube y lave



Agregue el Substrato, mezcle e incube

Plantulas: La extracción de la muestra de tejido debe realizarse utilizando una relación 1:10; peso (gramos) de plántula, y volumen (mL) de tampón de extracción 1X. Por ejemplo:

- 0.5 g plántula: 5.0 mL tampón de extracción 1X

Todas las plántulas deben macerarse completamente y el extracto debe usarse inmediatamente.

Como Realizar la Prueba

- Antes de iniciar la prueba con este kit, lea todas estas instrucciones.
- Antes de iniciar la prueba, permita que el plato ELISA y todos los reactivos refrigerados, alcancen temperatura ambiente (por lo menos unos 30 minutos)-no retire el plato de ELISA de su empaque disecante (el bolso “foil”) hasta que el plato haya alcanzado temperatura ambiente.
- **Organice todos los reactivos, muestras y pipetas por adelantado para que los pasos A1 y B1 se puedan llevar a cabo en 15 minutos o menos;** es recomendable utilizar una pipeta tipo “multi-canal” para los pasos que necesiten transferencias de reactivos al plato.
- Una vez que los componentes hayan alcanzado temperatura ambiente, saque el plato de ELISA de su empaque protector (bolso “foil”). Si no se piensa utilizar todos los pocillos del plato, se recomienda seguir el procedimiento descrito en nuestra Guia denominada “Corridas Múltiples” disponible en www.envirologix.com/library/multruns.pdf.
- Cuando añada las muestras y los reactivos a los pocillos, guíese por las marcas ubicadas al borde del plato. Por cada prueba se recomienda usar por lo menos, dos pocillos como control negativo (muestras sanas de tejido foliar o semilla) y otros dos pocillos como Blanco (tampón de extracción). A discreción del usuario se pueden usar pocillos adicionales para control de calidad. Las muestras en sí, pueden correrse individualmente o en pocillos duplicados.

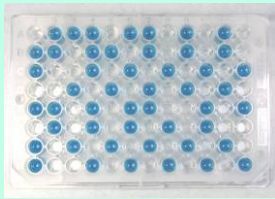
A. PROTOCOLO PARA SEMILLA.

- A1. Agregue a los respectivos pocillos: **100 µL de Tampon de Extracción** (Blancos); **100 µL de control negativo preparado por el usuario**; **100 µL de cada muestra**. Siga la misma secuencia para agregar los reactivos. Cronometre cada plato de ELISA independientemente.

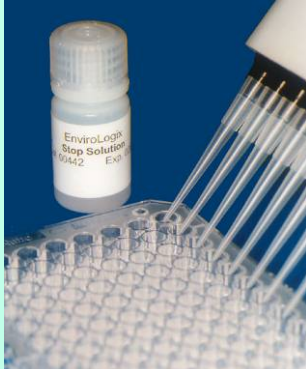
NOTA: Se recomienda utilizar una pipeta tipo “multi-canal” en los pasos A1, A5, A8 y A9.

- A2. Cuidadosamente, mezcle bien el contenido de los pocillos. Mueva el plato de ELISA sobre el mesón de trabajo de manera rápida y circular, por 20-30 segundos. Evite desbordar el contenido.
- A3. Cubra los pocillos con “cinta” o “Parafilm” para evitar evaporación e **incube** a temperatura ambiente por **30 minutos** en un agitador automático calibrado a 200 rpm. **Nota: se debe agitar el plato de ELISA en los pasos indicados. El no hacerlo puede reducir la sensibilidad de la prueba hasta un 50% .**

Opcional: En este punto las muestras pueden ser incubadas de un día para otro en el refrigerador (~16 horas a 5C). Permita que el plato de ELISA y el resto de los componentes del kit alcancen la temperatura ambiente para continuar con la prueba.



Los resultados pueden interpretarse visualmente, o ...



...termine el protocolo y agregue la Solución Stop



Lecture el plato de ELISA en el espectrofotómetro dentro de los 30 minutos contados a partir del momento en que se agrega la Solución Stop

A4. Después de la incubación, cuidadosamente retire la “cinta” o el “Parafilm”. Vacíe todo el contenido de los pocillos en un fregadero o recipiente apropiado. Llene todos los pocillos completamente con **Tampón de Lavado** y vuelva a vaciarlos. Repita este paso de lavado por lo menos tres veces. Después del último lavado, invierta el plato y golpéelo contra una toalla de papel para remover la mayor cantidad posible del tampón de lavado.

Muestras incubadas de un día para otro, se lavan 8 veces.

A5. Agregue **100 µL** del **Conjugado Enzimático** a cada pocillo.

A6. Mezcle bien el contenido de los pocillos usando el procedimiento descrito en el paso A2. Recubra los pocillos con nueva “cinta” o “Parafilm” e incube a temperatura ambiente durante 1 hora sobre un agitador automático calibrado a 200 rpm. **Nota: se debe agitar el plato de ELISA en los pasos indicados. El no hacerlo puede reducir la sensibilidad de la prueba hasta un 50%.**

A7. Lave los pocillos nuevamente cómo se describe en el paso A4. Como alternativa, se pueden lavar 4 veces usando un lavador automático de platos de ELISA (300 µL/pocillo).

A8. Agregue **100 µL** del **Substrato** a cada pocillo. Mezcle bien el contenido de los pocillos como se describe en A2. Recubra los pocillos con nueva “cinta” o “Parafilm” e incube durante **30 minutos** (para mejores resultados) a **temperatura ambiente**.

A9. Agregue **100 µL de la Solución STOP** a cada pocillo y mezcle brevemente. Esto hará que el color azul en los pocillos positivos cambie a amarillo. Lea el plato de ELISA a 450 nm con una onda de referencia de 630 o 650 nm. Lea el plato en el espectrofotómetro dentro de 30 minutos, contados a partir de la adición de la Solución STOP; el color amarillo, se debilitara mas allá de los 30 minutos

Precaución: La Solución STOP contiene **ácido hidroclicórico 1N**. Úsela con cuidado.

B. PROTOCOLO PARA HOJA Y PLANTULA.

B1. Agregue **100 µL** del **Conjugado Enzimático** a cada pocillo.

B2. Inmediatamente agregue a los respectivos pocillos: **100 µL de Tampon de Extracción** (Blancos); **100 µL de control negativo preparado por el usuario**; **100 µL de cada muestra**. Siga la misma secuencia para agregar los reactivos. Cronometre cada plato de ELISA independientemente.

NOTA: Se recomienda utilizar una pipeta tipo “multi-canal” en los pasos B1, B2, B6 and B7.

B3. Cuidadosamente, mezcle bien el contenido de los pocillos. Mueva el plato de ELISA sobre el mesón de trabajo de manera rápida y circular, por 20-30 segundos. Evite desbordar el contenido.

B4. Cubra los pocillos con “cinta” o “Parafilm” para evitar evaporación e **incube a temperatura ambiente durante 1 hora** sobre un agitador automático calibrado a 200 rpm. **Nota: Se debe agitar el plato de ELISA en los pasos en los cuales es requerido. El no hacerlo puede reducir la sensibilidad de la prueba hasta un 50%.**

Opcional: en este punto el conjugado/muestra, se puede incubar de un día para otro en el refrigerador (~16 horas a 5C). Al otro día,



permita que el plato de ELISA y el resto de los componentes alcancen temperatura ambiente antes de continuar con la prueba.

- B5. Después de incubación, cuidadosamente retire la “cinta” o el “Parafilm”. Vacíe todo el contenido de los pocillos en un fregadero o recipiente apropiado. Llene todos los pocillos completamente con **Tampón de Lavado** y vuelva a vaciarlos. Repita este paso de lavado por lo menos tres veces. Después del último lavado, invierta el plato y golpéelo contra una toalla de papel para remover la mayor cantidad posible del tampón de lavado.

Muestras incubadas de un día para otro, se lavan 8 veces.

- B6. Agregue **100 µL del Substrato** a cada pocillo. Mezcle bien el contenido de los pocillos con el mismo procedimiento descrito en B3. Recubra los pocillos con nueva “cinta” o “Parafilm” e incube durante **30 minutos** (para mejores resultados) a **temperatura ambiente**.

- B7. Agregue **100 µL de la Solución STOP** a cada pocillo y mezcle brevemente. Esto hará que el color azul en los pocillos positivos cambie a amarillo. Lea el plato de ELISA a 450 nm con una onda de referencia de 630 o 650 nm. Lea el plato en el espectrofotómetro dentro de 30 minutos, contados a partir de la adición de la Solución STOP; el color amarillo, se debilitara mas allá de los 30 minutos.

Precaución: La Solución STOP contiene **ácido hidrocórico 1N**. Manéjela con cuidado.

Como Interpretar los Resultados

Medición espectrofotométrica

La longitud de onda del espectrofotómetro debe estar calibrada en 450 nanómetros (nm). Si el espectrofotómetro tiene capacidad para doble calibración, utilice 630 nm o 650 nm como onda de referencia.

Interpretación de Resultados

Para determinar la presencia o ausencia del Virus Mosaico de la Lechuga en las muestras, compare la Densidad Óptica de las muestras con la Densidad Óptica promedia de los pocillos Blancos y pocillos negativos. Aquellas muestras cuyos pocillos presentan Densidades Ópticas significativamente superiores a la Densidad Óptica promedia de los pocillos Blanco y/o la de los controles negativos, deben considerarse como positivas para el Virus Mosaico de la Lechuga.

Guía de interpretación general:

- La Densidad Óptica promedia del Tampón de Extracción en los pocillos no debe superar 0.10.
- La Densidad Óptica promedia de los controles negativos (semilla/hoja) no debe superar 0.15.

Si sus lecturas espectrofotométricas consistentemente muestran valores superiores a los indicados arriba, por favor contáctese con el servicio de asistencia técnica de EnviroLogix.

Nota: Este kit, especialmente cuando se siguen las instrucciones para alta sensibilidad, puede detectar niveles extremadamente bajos del virus.



Precauciones y Notas

- Cuando se vaya a desechar muestras y reactivos, siga todas las reglamentaciones que sean aplicables, normas gubernamentales y protocolos internos de seguridad del laboratorio.
- Almacene todos los componentes del kit entre 4°C y 8°C (39°F - 46°F), mientras no se use.
- Jamás exponga los componentes de este kit QualiPlate a temperaturas superiores a 37°C (99°F) o menores que 2°C (36°F).
- Antes de usarlo, permita que el QualiPlate y todos sus reactivos alcancen temperatura ambiental (18°C - 27°C o 64°F - 81°F).
- No use este kit QualiPlate, ni alguno de sus componentes, después de su fecha de vencimiento.
- Jamás utilice reactivos o platos de ELISA provenientes de un kit QualiPlate con los reactivos o platos de ELISA provenientes de otro kit QualiPlate.
- No utilice muestras preparadas en reactivos de otros Kits, que no sean los designados para ser usados por EnviroLogix.
- **No exponga el Substrato a la luz directa del sol** durante el período de incubación, ni tampoco cuando se esté efectuando la transferencia del Substrato con la pipeta.
- **Asegúrese de leer los resultados (color amarillo) at 450 nm, no a 405 nm.**
- No diluya o adultere los reactivos, ni use muestras que no estén contempladas dentro del protocolo.
- La calidad de los resultados depende del seguimiento del protocolo del kit lo más estrictamente posible.
- Si es necesario, es recomendable que los resultados sean confirmados por un método alterno.
- Protocolo de alta sensibilidad para semillas. Este kit puede ser usado con una solución Tampón de extracción que aumenta la sensibilidad de la prueba de semilla hasta 10 veces. Prepare la solución tampón como se indica abajo y sustítúyalo por solución tampón de extracción 1X usadas en las secciones “Preparación de Muestras: Semillas” y “A. Protocolo para semillas”.

Buffer de Alta sensibilidad:

Añada a 200 ml de Agua destilada/De-ionizada:

	1 Litro
Fosfato de Sodio dibásico deshidratado (Na ₂ HPO ₄)	5.4 g
Fosfato de Sodio MonoBasico deshidratado (NaH ₂ PO ₄)	1.56 g
Thioglicolic Acid* (C ₂ H ₄ O ₂ S)	1.0 ml

- Mezcle los componentes y añada el resto del agua.
- Ajuste el pH a 7.4, con una solución 8 M de NaOH
- Prepare esta solución, antes de procesar las semillas.

*Sigma, T3758, Thioglicolic acid minimum 98%



**Para Soporte Técnico
Contáctenos en:**

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

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

e-mail:
info@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 defectuosos 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.

*Parafilm es una marca registrada del American Can Corporation
EnviroLogix, el logo de EnviroLogix y QualiPlate son marcas registradas de
EnviroLogix Inc.*

© EnviroLogix 2008