

Preparación de muestras y métodos de extracción de ARN y ADN de acuerdo con el hospedante

1.- Preparación de la muestra de acuerdo con el hospedero y técnica de análisis.

<p>Ribes spp. Rubus spp. Vaccinium spp. Fragaria spp.</p>	<p>Para las muestras que requieran la detección de los virus por ELISA, se tomarán 0,5 g de tejido foliar y se extraerán de acuerdo a las instrucciones del fabricante del kit de anticuerpos utilizado.</p> <p>En caso de que se requiera la detección de virus por RT-PCR, se tomarán 0,1 g de tejido de hojas que se extraerán por el método de Litio (Ítem 3 del presente documento).</p> <p>Para las muestras que requieran la detección de Fitoplasmas, se tomarán 0,5 g de nervaduras centrales y se extraerá ADN de acuerdo al método CTAB (Ítem 4 del presente documento).</p>
<p>Prunus spp. Malus spp. Pyrus spp. Cydonia spp. Corylus spp. Juglans spp. Persea spp.</p>	<p>Para las muestras que requieran la detección de los virus por ELISA, se tomarán 0,5 g de tejido foliar y se extraerán de acuerdo a las instrucciones del fabricante del kit de anticuerpos utilizado.</p> <p>En caso de que se requiera la detección de virus o viroide por RT-PCR, se tomarán 0,1 g de tejido de hojas o yemas que se extraerán por el método de la sílica (Ítem 2 del presente documento).</p> <p>Para las muestras que requieran la detección de Fitoplasmas, se tomarán 0,5 g de nervaduras centrales y se extraerá ADN de acuerdo al método CTAB (Ítem 4 del presente documento).</p>
<p>Olea europaea</p>	<p>Para las muestras que requieran la detección de los virus CLRV y SLRSV por RT-PCR, se tomarán 0,1 g de tejido floemático de ramillas que se extraerán por el método de la sílica (Ítem 2 del presente documento).</p>
<p>Citrus spp. e híbridos inter-especies Fortunella spp. Poncirus spp.</p>	<p>Para las muestras que requieran la detección de CTV por ELISA, se tomarán 0,5 g de tejido foliar y se extraerán de acuerdo con las instrucciones del fabricante del kit de anticuerpos utilizado.</p> <p>En caso de que se requiera la detección de virus o viroides por RT-PCR, se tomarán 0,1 g de tejido foliar que se extraerán por el método de la sílica (Ítem 2 del presente documento).</p>

2.- Extracción de ARN por el Método de la Captura con sílica para detección de virus y viroides en cítricos, vides, olivos, carozos y pomáceas (documento "Preparación de soluciones para extracción de ARN o ADN", código D-ATR-AAT-073).

Rotule cada bolsa plástica con número de extracción, de tal manera que permita identificar la muestra.

Rotule los tubos nuevos de 1,5 ml, para que permita la trazabilidad de la muestra.

Pesar 0,1 gramo de tejido (hoja/ floema), introducir en bolsa de extracción, agregar 1 ml. de buffer de extracción y macerar.

Transferir 0,5 ml. del macerado a un microtubo de 1,5 ml y adicionar 0,1 ml. de sarcosina al 10% y 1,5 µl de β-mercaptoetanol.

Incubar 10 minutos a 70° C con agitaciones cada 2 minutos.

Traspasar a hielo por 2 minutos y luego centrifugar a 12.000 rpm. por 5 minutos.

Transferir 0,3 ml. del sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf y agregar 300 µl de solución de NaI, 150 µl de etanol absoluto y 25 µl de suspensión de partículas de sílica.

Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos con agitaciones cada 2 minutos.

Centrifugar a 6000 rpm. durante 1 minuto y eliminar el sobrenadante.

Agregar 0,5 ml. de buffer de lavado y agitar en vortex hasta resuspender el pellet.

Repetir el paso N° 6.

Eliminar el sobrenadante con cuidado y secar el pellet a temperatura ambiente invirtiendo el tubo.

Preparación de muestras y métodos de extracción de ARN y ADN de acuerdo con el hospedante

Resuspender el pellet en 0,1 ml. de agua libre de nucleasas e incubarlo durante 2 minutos a 70°C.

Centrifugar a velocidad máxima durante 3 minutos y transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo, teniendo cuidado de no arrastrar sílica.

El RNA extraído se almacena a -80° C, hasta su uso.

3.- Extracción de ARN por el Método de extracción con Litio para detección de virus en *Fragaria spp.*, *Vaccinium spp.*, *Rubus spp.* y *Ribes spp.* Hughes D.W., Galau G. 1988 (documento "Preparación de soluciones para extracción de ARN o ADN", código D-ATR-AAT-073).

Rotule cada bolsa plástica con número de extracción, de tal manera que permita identificar la muestra.

Rotule los tubos nuevos de 1,5 ml, para que permita la trazabilidad de la muestra.

Pese 0,1 gr. de tejido e introduzca la muestra en la bolsa.

Agregue 1 ml de buffer de extracción de litio con β -mercaptoetanol a una concentración final del 0,1 %.

Macere la muestra con ayuda del equipo molidor "Homex".

Transfiera 600 μ l del macerado al tubo previamente rotulado y adicione 600 μ l de acetato de potasio 6M.

Agite el tubo por inversión al menos 10 veces.

Centrifugue a 13.000 rpm durante 10 minutos.

Rotule tubos nuevos de 1,5 ml, de tal manera que permita la trazabilidad de la muestra.

Transfiera 750 μ l del sobrenadante al nuevo tubo y agregue 750 μ l de Isopropanol.

Agite el tubo por inversión al menos 10 veces.

Centrifugue a 14.000 rpm durante 20 minutos.

Elimine el sobrenadante con cuidado y lavar el pellet con 1 ml de etanol 70% frío.

Centrifugue a 14.000 rpm durante 10 minutos.

Eliminar el sobrenadante con cuidado y deje secar el pellet durante al menos 1 hora a temperatura ambiente.

Resuspenda el pellet en 40 μ l de agua libre de nucleasas.

Los ácidos nucleicos extraídos son almacenados a -20° C, hasta su uso.

4.- Extracción de ADN por método CTAB para detección de fitoplasmas en vides, moras y pomáceas (documento "Preparación de soluciones para extracción de ARN o ADN", código D-ATR-AAT-073).

Rotule cada bolsa plástica con número de extracción, de tal manera que permita identificar la muestra.

Rotule los tubos nuevos de 2,0 ml, para permitir la trazabilidad de la muestra.

Pesar 0,5 gramo de tejido (nervadura central), introducir en bolsa de extracción, agregar 3,5 ml. de buffer de extracción CTAB, agregue 1,5 μ l β - mercaptoetanol. y macerar.

Transferir 1,0 ml. del macerado al microtubo de 2,0 ml

Incubar por 20 minutos a 65° C con agitaciones cada 2 minutos.

Dejar enfriar por 2 minutos, agregar 1,0 ml de cloroformo y mezclar.

Luego centrifugar a 11.000 rpm. por 10 minutos.

Transferir 750 μ L. de la fase acuosa a un nuevo microtubo de 1,5 ml y agregar 750 μ l de isopropanol, mezclar bien.

Incubar a -20° c por 30 minutos.



DOCUMENTO GENERAL

Preparación de muestras y métodos de extracción de ARN y ADN de acuerdo con el hospedante

Centrifugar a 11.000 rpm. durante 15 minutos y eliminar el sobrenadante suavemente para no perder el pellet.

Agregar 1,0 ml. de etanol al 70% frío y agitar suavemente el pellet.

Repetir el paso N° 10.

Eliminar el sobrenadante con cuidado y secar el pellet a temperatura ambiente invirtiendo el tubo.

Resuspender el pellet en 100 µL de agua libre de nucleasas.

El ADN extraído se almacena a -80° C, hasta su uso.