

ANEXOS

EVALUACIÓN DE LA PERSISTENCIA DEL VIRUS DEL MOSAICO VERDE JASPEADO DEL PEPINO (*Cucumber green mottle mosaic virus*, CGMMV) EN DIFERENTES TIPOS DE SUSTRATOS SOLARIZADOS.

Titulación: Grado en Ingeniería Agroalimentaria y del Medio Rural.

Presentado por: Carlota María Moratilla Vega.

Tutora: María Isabel Font San Ambrosio.

Cotutora: Ana Olvido Alfaro Fernández

Curso académico 2017-2018

Valencia, 27 de noviembre de 2017.

ANEXOS.

1	ANEXO I. Metodología de la técnica serológica DAS-ELISA.....	1
2	ANEXO II. Metodología de la técnica molecular RT-PCR.	3
2.1	Material y Métodos.	3
2.1.1	Protocolo: Extracción de ácidos nucleicos mediante el método de captura con sílica.....	3
2.1.2	Protocolo: RT-PCR con desnaturalización del RNA, electroforesis de los productos PCR en gel de agarosa y visualización de los resultados.	5

ANEXO I. METODOLOGÍA DE LA TÉCNICA SEROLÓGICA DAS-ELISA.

1. Tapizado: La placa se tapiza con 100 μ l/pocillo de la γ -globulina purificada (IgG) diluida a 1/200 en tampón de recubrimiento. Se incuba durante 4 horas a 37 $^{\circ}$ C.
2. Lavado: El exceso de γ -globulina se elimina realizando 4 lavados con tampón PBS-Tween, los dos primeros rápidos y los otros dos lavados de 3 minutos.
3. Adición de la muestra: Cada una de las muestras se tritura previamente a su adición en la placa con tampón de extracción, en relación 3 ml por cada 0.15 g. Seguidamente se añaden 100 μ l del extracto por pocillo. Se incuba 12 horas a 4 $^{\circ}$ C.
4. Lavado: Los extractos se eliminan y seguidamente se realizan 4 lavados con tampón PBS-Tween, los dos primeros rápidos y los otros dos de 3 minutos.
5. Adición del conjugado: Se realiza una dilución 1/20 de γ -globulina conjugada con un enzima la fosfatasa alcalina diluida en tampón conjugado de la cual se añade 100 μ l/pocillo. Se incuba 4 horas a 37 $^{\circ}$ C y se retira.
6. Lavado: El exceso de γ -globulina conjugada se elimina realizando cuatro lavados con tampón PBS-Tween, los dos primeros rápidos y los otros dos de 3 minutos.
7. Adición del sustrato: Se realiza una solución de p-nitrofenil fosfato (1mg/ml) con tampón sustrato, y se añade 100 μ l/ pocillo. Se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente.
8. Lectura de los resultados: Trascurridos los 30 minutos se procedió a la lectura de las absorbancias mediante el empleo de un espectrofotómetro.

Tampón de recubrimiento

Na₂CO₃H₂O... 0.186 g

NaHCO₃..... 0.293 g

H₂O destilada. 100 ml

pH 9.6

Tampón de lavado

NaCl..... 8 g

Na₂HPO₄..... 0.2 g

KCl..... 0.2 g

Tween 20..... 0.5 ml

H₂O destilada. 11 ml

pH 7.2-7.4

Tampón de extracción

PVP..... 5 g

BSA..... 0.5 g

NaN₃..... 0.025 g

Tampón de lavado.. 250 ml

pH 7.4

Tampón de conjugado

PVP..... 2 g

BSA..... 0.2 g

NaN₃..... 0.01 g

Tampón de lavado.. 100 ml

pH 7.4

Tampón de sustrato

Dietanolamina 9.7 ml

MgCl₂.6H₂O... 0.02 g

H₂O destilada. 90.3 ml

pH 9.8

ANEXO II. METODOLOGÍA DE LA TÉCNICA MOLECULAR RT-PCR.

2.1 MATERIAL Y MÉTODOS.

2.1.1 PROTOCOLO: EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS MEDIANTE EL MÉTODO DE CAPTURA CON SÍLICA.

El protocolo que se presenta a continuación fue descrito por Mackenzie *et al.* (1997).

1. Triturar 100 mg de tejido vegetal (fresco o congelado) en una bolsa de plástico o 25 mg (deshidratado) con 1,5 ml de tampón de extracción al que previamente se le haya añadido β -mercaptoetanol (al 1%).
2. Transferir 500 μ l del homogeneizado a un tubo eppendorf de 1.5 ml con punta recortada y mezclar (no con vórtex).
3. Añadir 100 μ l de n-lauryl sarcosina 10% e incubar a 70°C durante 10 min (agitando los tubos de vez en cuando, no con vórtex).
4. Incubar en hielo 5 min.
5. Centrifugar 10 min a 13000 rpm a 4°C.
6. Transferir 300 μ l a un nuevo tubo eppendorf y añadir:
 - 150 μ l EtOH
 - 300 μ l Solución 6M NaI
 - 50 μ l Solución Silica
7. Incubar a temperatura ambiente durante 30 min, agitando los tubos de vez en cuando.
7. Centrifugar 1 min a 6000 rpm, temperatura ambiente.
8. Eliminar el sobrenadante.
9. Lavar el sedimento con 1 ml de tampón de lavado, agitar con el vórtex.
10. Centrifugar 1 min a 6000 rpm, temperatura ambiente.
11. Repetir los pasos de lavado (9, 10 y 12) dos veces más.

12. Tras el último lavado, después de eliminar el sobrenadante secar los tubos con papel de trapicel.
13. Resuspender el sedimento en 150 µl de H₂O MQ estéril, mezclar con el vórtex.
14. Incubar a 70°C durante 4 min.
15. Centrifugar 3 min a 13000 rpm, temperatura ambiente.
16. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 ml y almacenar a -20°C hasta su utilización.

TAMPÓN EXTRACCIÓN SILICA:

Guanidine hypochloride	4M	
Acetato Sódico	0.2M	(Solución Stock AcNa 3M pH 5.5)
EDTA	25mM	
Acetato Potásico	1.0M	
PVP40	2.5%	
β-mercaptoetanol	1%	(añadir en el momento de usarlo)

TAMPÓN DE LAVADO:

Tris-HCl pH 8.0	10 mM
EDTA	0.5 mM
NaCl	50 mM
Etanol Absoluto	50 %

SOLUCIÓN NaI 6M:

NaI	6 M
Na ₂ SO ₃	150 mM
H ₂ O MQ estéril	40 ml

N- LAURYL SARCOSINA 10%:

N-lauryl sarcosina	10 g
H ₂ O MQ estéril	100 ml

No autoclavar. Usar guantes. Almacenar a temperatura ambiente

2.1.2 PROTOCOLO: RT-PCR CON DESNATURALIZACIÓN DEL RNA, ELECTROFORESIS DE LOS PRODUCTOS PCR EN GEL DE AGAROSA Y VISUALIZACIÓN DE LOS RESULTADOS.

1. Poner en hielo las muestras de RNA.
2. Descongelar productos para el cóctel y positivos.
3. Desnaturalización del RNA (1.9 µl H₂O Depc + 0.6µl RNA). Rotular e introducir muestras en el termociclador donde este el programa guardado.
4. Preparar el *mix* (cóctel), añadiendo al final la RT-II y RNaseOUT. Agitar el tubo.
5. Añadir 7.5 µl *del mix* a las muestras ya desnaturalizadas (empezar por el blanco).
6. Guardar productos y muestras en congelador.
7. Introducir en el termociclador en función del virus que se está analizando y número de muestras. Activar el programa seleccionado.
8. Preparar el gel de agarosa, con TAE 1x y Agarosa D1 al 1.5%. Dejar enfriar y solidificar antes de verterlo a la cubeta de electroforesis.
9. Cargar el gel, usando un volumen de 8 µl de muestra y 2 µl de tampón de carga 6x LD. El marcador BP plus 100 se cargará en los pocillos de los extremos (preferiblemente), usando un volumen de 1.5µl.
10. Se conectan los electrodos a los bornes de la cubeta, aplicando una tensión de 140V durante 35 min aproximadamente según las bandas amplificadas.
11. Desconectar electrodos y verter el gel al bromuro de etidio, dejándolo sumergido 45 minutos para asegurar una buena tinción.
12. Retirar el gel y enjuagar en una cubeta con agua.

13. Introducirlo en una cabina de luz ultravioleta para su lectura.
14. Obtener la foto del gel ya leído y/o guardarla en el PC conectado.