

# Kit de detección de ToTV

## 1 Contenido del Kit

- .Sonda genética no radiactiva para la detección de ToTV
- .Control positivo (antisonda)
- .Control negativo (extracción de RNA total de planta sana)
- .Protocolo de hibridación
- .Dos membranas que incluyen serie de controles diluidos para probar la eficacia de la sonda y película resultado de la hibridación de la sonda enviada

Dilución	Dilución	Dilución	Dilución
Control +	Control +	Control +	Control +
1/10	1/100	1/1000	1/10.000

Control Negativo

## 2. Instrucciones para la preparación de la sonda y control positivo

Tanto la sonda como los controles se envían en precipitación etanólica en un volumen de 400 µl. Una vez recibidas guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$

Para comenzar a trabajar es preciso seguir los siguientes pasos:

### 1. Preparación de la sonda y controles:

- Centrifugar a 14.000 rpm, 20 min a  $4^{\circ}\text{C}$
- Eliminar sobrenadante.
- Añadir etanol al 70%
- Centrifugar a 14.000 rpm, 20 min. a  $4^{\circ}\text{C}$
- Resuspender en 25 µl de agua destilada estéril
- Guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$ . (La descongelación para usos posteriores deberá realizarse sobre hielo)

### 2. Hibridación:

- **Sonda:** la dilución a utilizar será entre 1-3 :10.000 (según indique el lote) es decir entre 1 y 3 µl de sonda en 10 ml de solución de rehidratación (Es posible reutilizarla varias veces)
- **Control positivo:** Cargar 1 µl en la membrana. Para alargar el uso del control positivo, es recomendable hacer diluciones (1/10 o 1/100) y guardar el recibido como stock. Por ejemplo, tomar 5 µl del control positivo recibido y resuspenderlo en 20 µl de agua destilada estéril. La señal que obtendrá en la hibridación será muy similar a la del control sin diluir.
- **Control negativo:** se trata de una extracción de RNA total de una planta sana. Cargar 1 µl en la membrana.  
Puede ser sustituido por extracción de RNA de planta sana realizada en el laboratorio.

### 3. Detección

- Se recomienda una exposición de las películas de 30-90 minutos (variable según condiciones de trabajo)

## 3. Observaciones

El manejo de muestras infectadas con ToTV debe realizarse con máximo cuidado. Una vez realizada la extracción de RNA total se recomienda analizar lo antes posible. En caso de congelación, evitar congelar repetidas veces.

En caso de necesitar apoyo técnico, contactar con la Dra. Raquel Navarro Sempere  
Tel. +34 968 396299,  
E-mail:rnsempere@abiopep.com