

# Kit de detección de ZYMV

## 1 Contenido del Kit

- .Sonda genética no radiactiva para la detección de ZYMV
- .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 polisonda 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)

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