

Avisos y exenciones de responsabilidad

A pesar del máximo cuidado en el desarrollo y preparación de este protocolo, ClearDetections no puede asumir ninguna responsabilidad por errores, omisiones y / o cambios futuros en este documento.

Este kit está diseñado exclusivamente para uso general en laboratorio e investigación. Para conocer los avisos legales y la exención de responsabilidad, visite el sitio web, www.cleardetections.com, o comuníquese con ClearDetections en info@cleardetections.com.



Extracción de ADN de nemátodos y quistes individuales

EX-N-B-SNDE

Exclusivo para uso general en laboratorio e investigación

Introducción

Este kit de extracción de ADN de ClearDetections está diseñado para extraer ADN genómico de nemátodos individuales y/o quistes. Los extractos de ADN obtenidos pueden utilizarse directamente en procesos posteriores, como en una PCR en tiempo real utilizando uno de los kits de identificación de nemátodos por PCR de ClearDetections (RT-N-D/W-XXXX). Para más información, vaya a www.cleardetections.com.

Nota: Para extraer ADN de suspensiones de nemátodos y/o múltiples quistes, le recomendamos el 'Kit de extracción & purificación de ADN de suspensiones de nemátodos y múltiples quistes' (EX-N-T/P-NDEP).

Le recomendamos que lea todo el manual antes de iniciar el procedimiento.
No dude en contactarnos en info@cleardetections.com si tiene preguntas sobre este protocolo, la configuración del laboratorio o las especificaciones del equipo.

Componentes del kit, condiciones de almacenamiento y vida útil

Componentes	Código	Almacenamiento
Tampón de extracción 2x	EXB_SIN	4-8°C
Proteinasa K	PK_SIN	4-8°C

Reactivos y equipamiento suministrado por el usuario

- Vortex
- Campana extractora
- Centrífuga para tubos
- Incubadora de temperatura controlada/ bloque de calor o baño de agua
- Pipetas y correspondientes puntas de baja adhesión* (ej. silicona) para volúmenes de 5-1000 µL
- Tubos de 1.5 mL para microcentrifuga de baja adhesión
- Mano del mortero (para triturar quistes)
- Agua exenta de nucleasas
- β-Mercaptoetanol (2-Mercaptoetanol) o 5,0 M Ditiotreitolo (DTT)**

* La utilización de otras puntas puede afectar negativamente la detección de nemátodos.

** 5,0 M DTT puede prepararse en el momento, o puede ser preparado con antelación, almacenado a -20°C, y utilizado directamente después de descongelarlo.

Preparación de la muestra

Nuestro protocolo asume que los nemátodos y/o quistes han sido previamente aislados de otros materiales de la muestra, y que contaminantes como agregados del suelo y tejido de planta han sido eliminados. Para aislar nemátodos y/o quistes, por favor consulte el boletín de EPPO para la extracción de nemátodos (PM 7/119 (1) 2013, Nematode extraction. EPPO Bull, 43(3), 471-495).

Nemátodos individuales:

1. Añada 50 µl de agua deionizada a un tubo limpio de 1.5 ml de baja adhesión.
2. Transfiera 1 nemátodo individual en el agua utilizando una 'aguja de pescar' para nemátodos.

Nota: Tenga cuidado de no tocar las paredes del tubo con el nemátodo, y si es posible verifique que la transferencia del nemátodo al agua ha sido realizada con éxito.

3. La muestra está lista para la extracción de ADN.

Quistes individuales:

1. Añada 50 µl de agua deionizada a un tubo limpio de 1.5 ml de baja adhesión.
2. Transfiera un quiste individual en el agua utilizando ej. brocha húmeda, una cuchara pequeña o pinzas.
3. Triture el quiste de forma intensa utilizando la mano del mortero. Después de usarlo, deseche o desinfecte la mano del mortero.

4. La muestra está lista para la extracción de ADN.

Nota: Es posible crear una mano de mortero utilizando una punta de pipeta de baja adhesión y sellando la punta utilizando una llama. Un video demostrativo de ClearDetections titulado "How to crush nematode cysts" se puede encontrar en www.youtube.com.

Protocolo para la extracción de ADN de nemátodos

1. Pre-caliente la incubadora o el baño de agua a 65°C.
2. Prepare mezcla de extracción suficiente para todas las muestras:

Mezcla de extracción	Por muestra (µl)	x 10 muestras*
Tampón de extracción 2x**	50	550
Proteinasa K	2	22
2-Mercaptoetanol /DTT	0,5	5,5

* Al calcular el volumen de la mezcla de extracción, recomendamos aumentar el número de muestras aproximadamente un 10% para compensar por posible error de pipeteo.

** Si el tampón de extracción ha precipitado, re-disuélvalo a 65°C y deje que se enfríe a temperatura ambiente antes de utilizarlo.

3. Añada 50 µL de la mezcla de extracción a cada muestra.

Nota: Apunte con la punta de la pipeta hacia los lados del tubo y añada el tampón sin tocar la muestra. Los nemátodos tienen carga estática y se pueden adherir a las puntas de pipeta!

4. Centrifugue 30 segundos a alta velocidad, para asegurar que la mezcla de extracción y el nemátodo están en el fondo del tubo, en contacto el uno con el otro.
5. Incube los tubos durante 30 minutos a 65°C, y mezcle (utilizando el vórtex) brevemente cada 10 minutos.

Nota: De forma alternativa, puede utilizar una thermomixer a 800 rpm.

6. Recoja los tubos de la incubadora o el baño de agua e incremente la temperatura a 95°C.
7. Incube los tubos durante 5 minutos a 95°C.
8. Centrifugue 30 segundos a alta velocidad a temperatura ambiente, para recolectar la muestra en el fondo del tubo.
9. Transfiera el supernadante a un nuevo tubo.
10. El extracto de ADN obtenido puede utilizarse para aplicaciones posteriores, o almacenamiento.

Nota: Recomendamos almacenar el ADN entre -4-8 °C durante unos días. Para almacenamiento a largo plazo, mantenga las muestras a -20 °C o menos.

Nota: Antes de continuar con el diagnóstico, recomendamos diluir el extracto de ADN. Si va a utilizar el kit de diagnóstico de PCR en tiempo real de ClearDetections, recomendamos diluir el extracto crudo de ADN aproximadamente 5 veces (para nemátodos individuales) o 100 veces (para quistes individuales).