



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Veterinaria

Departamento de Sanidad Animal



**PROCEDIMIENTO PARA LA
DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA
PESTE PORCINA AFRICANA (VPPA)
MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA
DE LA POLIMERASA (PCR)
CONVENCIONAL
(ESPAÑOL)**

jmvizcaino@vet.ucm.es

Av/ Puerta de Hierro s/n.
28040 Madrid.

Tel: (34) 913944082
Fax: (34) 913943908



1. MACERADO DE TEJIDOS

1.1. MATERIALES

- Bandeja con hielo.
- Lejía al 50 %.
- Tijeras y pinzas.
- Maceradores.
- Cinta adhesiva.
- Rotulador permanente.
- Gradilla para tubos de 10ml.
- Gradilla para tubos de microcentrífuga.
- Bateas para los tejidos.
- Pipetas serológicas.
- PBS 1X.
- Vaso de precipitados.
- Papel adsorbente.
- Guantes de latex o nitrilo
- Pipeteador automático Pipetboy o similar

1.2. REACTIVOS:

PBS Buffer Ph 7.2:

| | | |
|----------------------------------|-------------------------------------|--------|
| NaCl | (Merck 1.06404) | 8.0 g |
| KH ₂ PO ₄ | (Merck 1.04873) | 0.2 g |
| Na ₂ HPO ₄ | 12 H ₂ O (Merck 1.06586) | 2.9 g |
| KCl | (Merck 1.04936) | 0.2 g |
| H ₂ O | Destilada | 1000ml |



1.3. METODOLOGÍA

1.3.1. Identificamos las bateas.

1.3.2. Cortamos 1gr aproximadamente de tejido.

1.3.3. Identificamos los maceradores.

1.3.4. Introducimos la muestra en el macerador.

1.3.5. Añadimos 10ml de PBS 1X y maceramos.

1.3.6. Identificamos los tubos de microcentrífuga.

1.3.7. Alicuotamos el contenido del macerador en los tubos de microcentrífuga.

2. EXTRACCIÓN DE ADN

2.1. MATERIALES Y REACTIVOS

- Bandeja con hielo.
- Lejía al 50 %.
- Rotulador permanente.
- Gradilla para tubos de microcentrífuga.
- Flotadores.
- Baño termostático.
- Centrífuga.
- Vaso de precipitados.
- Guantes de latex o nitrilo
- Isopropanol.
- Vortex
- High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics,ref: 11796828001)



❖ Preparación de las soluciones de trabajo:

- **Proteinasa K liofilizada:** resuspender el vial que nos proporciona el kit en 4,5 ml de agua destilada estéril. Alicuotar en viales de 500 μ l y mantener a -20°C hasta su uso.
- **Inhibitor Removal Buffer:** añadir 20ml de etanol absoluto al vial original. Etiquetar y poner la fecha en el vial.
- **Wash Buffer:** añadir 80ml de etanol absoluto al vial original. Etiquetar y poner la fecha en el vial.

2.2. METODOLOGÍA

- 2.2.1 Identificamos los tubos de microcentrífuga.
- 2.2.2 Añadir 200 μ l a cada tubo de **Binding Buffer**.
- 2.2.3 Añadir 40 μ l de Proteinasa K
- 2.2.4 Añadir 200 μ l de la muestra.
- 2.2.5 Mezclar por inversión.
- 2.2.6 Incubar 10 minutos a 72 °C en el baño.
- 2.2.7 Dar un pulso de centrífuga a los tubos.
- 2.2.8 Añadir 100 μ l de isopropanol.
- 2.2.9 Mezclar y dar un pulso en la centrífuga.
- 2.2.10 Identificar las columnas con filtro (High pure filter tube) que vayamos a utilizar y traspasamos el contenido del tubo de microcentrífuga a la columna con filtro.
- 2.2.11 Centrifugar 1 min. a 8000 r.p.m
- 2.2.12 Descartar el filtrado
- 2.2.13 Añadir 500 μ l de Inhibitor Removal Buffer.
- 2.2.14 Centrifugar 1 min. a 8000 r.p.m
- 2.2.15 Descartar el filtrado.
- 2.2.16 Añadir 450 μ l de Wash Buffer.
- 2.2.17 Centrifugar 1 min. a 8000 r.p.m
- 2.2.18 Descartar el filtrado.
- 2.2.19 Añadir 450 μ l de Wash Buffer, de nuevo.
- 2.2.20 Centrifugar 1 min. a 8000 r.p.m
- 2.2.21 Descartar el filtrado.
- 2.2.22 Centrifugar 13000 r.p.m durante 10 seg.
- 2.2.23 Pre calentamos el agua destilada.
- 2.2.24 Identificar los tubos de microcentrífuga donde quedará el DNA.
- 2.2.25 Introducir el filtro en el tubo de microcentrífuga identificado.
- 2.2.26 Añadimos 50 μ l de agua destilada estéril, pre calentada a 70 °C.
- 2.2.27 Centrifugar 1 min. a 8000 r.p.m
- 2.2.28 Descartar el filtro y guardar el eluido a -20 °C



3. PCR CONVENCIONAL

3.1. MATERIALES Y REACTIVOS

- Micropipetas automáticas monocanales de 1-20, 20-200, y 200-1000 μ l
- Vortex
- Microcentrífuga para tubos de eppendorf
- Termobloque
- Gradillas
- Termociclador convencional
- Cubeta para geles de agarosa horizontales y accesorios (bandejas, peines, conectores)
- Fuente de alimentación
- Transiluminador de luz ultravioleta
- Nevera de 4 °C
- Congelador de -20°C
- Congelador -70°C
- Puntas de micropipeta de rangos 1-20, 20-200, y 200-1000 μ l estériles
- Tubos tipo eppendorf estériles, aptos para microcentrífuga de volúmenes 0'2, 0'5, 1'5, y 2 ml estériles
- Guantes de nitrilo o látex
- H₂O estéril libre de nucleasas, grado PCR.
- Taq Glod DNA polimerasa, 10X PCR Buffer II, y Cl₂Mg (Applied Biosystems ref. nº N808-0245)
- Deoxinucleótidos trifosfato (dNTP) mix, conteniendo 10 mM de cada dNTP (Roche Diagnostics ref. nº 11581295001)
- Primers a una concentración de uso de 20 pmol/ μ l:
 - primer **PPA-1** secuencia 5'-AGTTATGGGAAACCCGACCC-3' (forward)
 - primer **PPA-2** secuencia 5'-CCCTGAATCGGAGCATCCT-3' (reverse)



3.2. METODOLOGÍA:

A) AMPLIFICACIÓN DE ADN

A.1. PREPARACIÓN DE LA MEZCLA DE REACCIÓN (MASTER MIX):

- En un tubo de microcentrífuga de 1.5ml estéril, se preparará la mezcla de PCR, según se describe a continuación, para el número total de muestras a analizar (incluyendo los controles positivos y negativos de extracción y reacción) más, al menos, una muestra adicional(para compensar posibles errores de pipeteo)
- Mezcla de PCR para una muestra:

| <u>REACTIVOS</u> | <u>VOLUMEN</u> (25 µl reacción) |
|--------------------------------------|------------------------------------|
| Buffer 10X II | 2,5 µl |
| Cl₂Mg (25mM) | 2 µl |
| dNTP'S (10 mM) | 0,5 µl |
| primer FWD 20 µM | 0,25 µl |
| primer REW 20µM | 0,25 µl |
| Amplitaq Taq Gold (5 U/µl) | 0,125 µl |
| H₂O | 17,37 µl |

A.2. Añadir 23 µl de mezcla de PCR al número de tubos de PCR de 0,2 ml necesarios.

A.3. Añadir 2 µl de ADN (muestras) a cada tubo de PCR. Incluir un control positivo (2 µl de ADN de VPPA) y un control negativo de reacción (2 µl de agua destilada, grado PCR) en cada carrera PCR.



A.4. Cerrar bien y numerar los tubos de PCR. Agitar adecuadamente para mezclar la mezcla de reacción con las muestras.

A.5. Colocar los tubos en un termociclador automatizado provisto de tapa térmica y correr el programa de incubación detallado a continuación:

- Programa de incubación:

| | | |
|---------------------------------|--------------------|-------------|
| Activación de Taq Gold ADN pol. | 95 °C ---- 10 min. | |
| Desnaturalización ADN | 95 °C ---- 15 seg | } 40 ciclos |
| Anillamiento primers | 62 °C ---- 30 seg | |
| Elongación | 72 °C ---- 30 seg | |
| Paso extra de elongación | 72 °C ---- 7 min. | |
| Mantenimiento a 4 °C | | |

B) ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA:

B.1 Para un gel al 2%, pesar 2gr de agarosa.

B.2 Añadir los 2 gr de agarosa a 100ml de tampón TAE 1X.

B.3 Calentar en el microondas hasta que la agarosa esté bien disuelta (transparente).

B.4 Añadir SYBR safe (Invitrogen ref. n°.S33102-400 µl), 3 µl por cada 100ml de agarosa. Agitar para que se reparta homogéneamente.

B.5 Preparar la bandeja sellando los extremos con cinta adhesiva o soporte para geles. Verter la agarosa disuelta sobre la bandeja y colocar los peines. Esperar que solidifique (aprox. 20 minutos).

B.6 Retirar la cinta de los extremos y abrir el soporte para geles. Poner la bandeja dentro de la cubeta hasta que cubra el gel. Quitar los peines con cuidado.

B.7 Añadir 2,5 µl de tampón de carga 10X a cada muestra.

B.8 Cargar 10 µl de muestra por pocillo.



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Veterinaria



B.9 Cargar 10 μ l de marcador de peso molecular ADN VI en el último pocillo de cada peine.

B.10 Conectar la fuente de alimentación y aplicar 120-130 voltios durante 30 minutos (las muestras deberán migrar hacia el polo positivo).

B.11 Para la lectura del gel, colocar el gel sobre un transiluminador de luz UV para visualizar las bandas de ADN.

3.3 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Una vez examinado el gel en el transiluminador de luz UV, si la muestra fuera positiva se observará una banda clara que ha migrado paralelamente al producto de PCR del control positivo y al del marcador de peso molecular que nos servirá de referencia para calcular el tamaño. El producto amplificado del control positivo de VPPA mide **257pb**.

El procedimiento será válido cuando los controles positivos den una banda clara a la altura correspondiente al amplicón de VPPA y los controles negativos no muestren ningún patrón de bandas.