

DIAGNÓSTICO DE VIROIDES DE CÍTRICOS MEDIANTE ELECTROFORESIS SECUENCIAL EN GEL DE POLIACRILAMIDA (sPAGE)

Fundamento de la técnica

La técnica de sPAGE se basa en la migración del ARN de las diferentes especies de viroides en dependencia de su peso molecular y carga. La sPAGE permite confirmar la presencia de dos formas moleculares infectivas: la circular de simple cadena covalentemente cerrada y la correspondiente a la estructura lineal. Ambas moléculas migran como simples especies de ARN cuando se analizan por PAGE en condiciones no desnaturizantes. Sin embargo, las condiciones desnaturizantes (dPAGE) permiten detectar dos poblaciones distintas, que migran como bandas discretas, lo que incrementa la sensibilidad de la técnica.

Procedimiento

Extracción y purificación de ARN de viroides de cítricos

1. Pesar de 4-6 g de tejido vegetal, cortar en pequeños fragmentos.
2. Homogeneizar con macerador en hielo con 15 mL de fenol saturado pH 7 y 5ml de medio de extracción (10 mL SDS (5%); 1,3 mL de 0,1 M EDTA pH 7; 4 mL de 2M Tris pH 8,9; 36 mL H₂O; 0,2 mL mercaptoethanol, fenol (150 mL neutralizado a pH 7 con NaOH)). Pasar a tubos de 50 mL.
3. Centrifugar a 8 000 rpm 20 min. Recoger fase acuosa, añadir 10% vol. 3M de acetato de sodio pH 5,5 y 3 vol de etanol 95-100%. Dejar a -20°C al menos durante 1 hora.
4. Centrifugar a 8 000 rpm 20 min. Desechar el sobrenadante y secar el precipitado.
5. Disolver el precipitado en 1,5 mL TKM 1X (KCl 1M, MgCl₂ 0,1M, Tris 2M pH 7,4). Dializar durante toda la noche.
6. Pasar el producto de la diálisis a tubos de 4 mL. Añadir 1 volumen de 4M de LiCl y dejarlo a 4°C durante 4 horas.
7. Centrifugar a 8 000 rpm 20 min. Desechar el precipitado. Al sobrenadante añadir 3 vol. de etanol 95-100%. Dejar a -20°C durante al menos 1 hora.
8. Centrifugar 8 000 rpm 20 min. Desechar el sobrenadante.
9. Resuspender el precipitado en 300 µL de TKM 1X.
10. Pasarlo a microtubos y guardar a -20°C, hasta su análisis por NASH o sPAGE.

Electroforesis en gel de poliacrilamida al 5% (no desnaturizante)

1. Usar cristales colocando separadores de 1,5 mm para contener la solución de polimerización.
2. Añadir en un recipiente 15,15 mL H₂O destilada; 12,45 mL TAE 3X; 3 mL TEMED al 0,02%. Preparar en otro recipiente 6,3 mL poliacrilamida 5% + 0,6 mL persulfato de amonio. Llène los espacios entre los cristales con las soluciones de acrilamida y TEMED e inserte el peine apropiado.
3. Retirar con mucho cuidado el peine y en cada pocillo aplicar la muestra (20-25 µL) más 13-15 µL de tampón de carga (0,25% bromo fenol azul, 0,25% xileno cianol y 30 % glicerol, en agua).
4. Realizar la electroforesis a 4°C y 66 mA por 2,5 horas.

5. Extraer el gel del molde y sumergirlo en solución de bromuro de etidio con agitación suave durante 10 minutos. Observar el gel bajo luz UV.
6. Cortar la tira del gel de la zona delimitada por la muestra estándar de CEVd y el ARN 7S del hospedero. También puede cortarse la tira del gel 1cm por debajo de la mancha del colorante xileno-cianol.

Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante pH 8,3

1. Preparar en un recipiente una solución conteniendo 21,6 g urea; 10,5 mL H₂O destilada; 4,5 mL TBE 10X (Tris-HCl 0.08 M, EDTA 2 mM, ácido bórico 0,08 M, pH 8.3); 7.5 mL poliacrilamida 5%.
2. Preparar en otro recipiente una solución conteniendo 3.75 mL TEMED y 1 mL persulfato de amonio.
3. En la cámara de polimerización con separadores de 2 mm añadir la solución preparada, dejando una zona libre para colocar la pieza del gel nativo.
4. Añadir tampón TBE 1X pH 8,3 en la superficie del gel y colocar la pieza de gel, favoreciendo el mayor contacto posible entre ellos. Adicionar de 13-15 µL de tampón de carga.
5. Realizar la corrida electroforética a 21 mA y 24°C (4 horas).
6. Extraer el gel del molde y teñirlo con nitrato de plata.

Tinción de geles de poliacrilamida con nitrato de plata

1. Sumergir el gel en 150 mL de solución de tinción I (50% de etanol + 10% de ácido acético glacial) durante 1 hora con agitación suave.
2. Eliminar la solución I y sumergir el gel en 150 mL de solución de tinción II (10% de etanol+ 1% de ácido acético).
3. Eliminar la solución II y lavar una vez el gel con agua destilada.
4. Sumergir el gel en solución de nitrato de plata 12mM (1,5 mL en 150 mL de H₂O destilada) durante 1 hora con agitación suave.
5. Lavar 3 veces cuidadosamente con agua destilada.
6. Lavar con un pequeño volumen de solución de revelado (KOH 0,75M; formaldehído 0,28%).
7. Adicionar solución de revelado y observar hasta que aparezcan las bandas correspondientes a los viroides.
8. Lavar cuidadosamente con agua destilada.

Resultados: Las muestras positivas mostrarán bandas específicas de las diferentes especies de viroides.