Promega

Salmonella spp. y *Listeria monocytogenes* en productos de alimentación

AS1135

Productos de alimentación

ADN

1 hora

Firmware 4.90 (AS1000/AS2000)
Firmware 1.4 (AS3000)

Hardware LEV

Tipo de muestra: Caldo de enriquecimiento selectivo

Kit Maxwell® empleado:
AS1135 Maxwell 16 FFPE Plus LEV DNA Purification Kit

Cantidad de muestra empleada:
200 µl de caldo de enriquecimiento en bolsa *Stomacher*

Autor del protocolo:
Promega Biotech Ibérica S.L.

PROTOCOLO:

I. Preparación de muestras:

- Trocear la totalidad del producto con la ayuda de tijeras y pinzas estériles
- Recoger 25 gramos en una bolsa de *Stomacher* y añadir 225 mililitros de diluyente: Agua de peptona (APT) para *Salmonella spp.*, o caldo *Fraser* de media concentración para *Listeria spp.*
- Homogeneizar durante 1 minuto con *Stomacher*.

II. Enriquecimiento:

- Incubar, en la propia bolsa de *Stomacher*, el producto homogeneizado obtenido a una temperatura de 37ºC durante el tiempo indicado en la tabla 1 adjunta:

Tipo de muestra	Tiempo de incubación (h)
Salmonella spp.	18 ± 2
Listeria spp.	26 ± 2

Tabla 1. Tiempos de incubación para enriquecimiento de las muestras señaladas

Salmonella spp. y *Listeria monocytogenes* en productos de alimentación

AS1135

III. Extracción de ADN

El procedimiento de extracción se realiza con el *Maxwell®16*, que permite procesar hasta 16 muestras en menos de 1 hora; y el kit *AS1135 Maxwell®16 FFPE Plus LEV DNA Purification*, que contiene todos los reactivos necesarios para realizar la extracción de 48 muestras.

El procedimiento de purificación comienza con la extracción de 200 µl. de caldo de cultivo enriquecido de la bolsa *Stomacher* y su posterior carga en el pocillo#1 del cartucho del *Maxwell®16* tal y como muestra la figura 1*.

Así mismo, se debe colocar el *plunger* plástico que evita contaminaciones cruzadas en el pocillo#8 del cartucho, y colocar los tubos *eppendorf* de elución en el espacio destinado a tal efecto en la gradilla.

Se añadirán 100 µl de agua de grado "Biología Molecular" en los tubos *eppendorfs* para la elución.

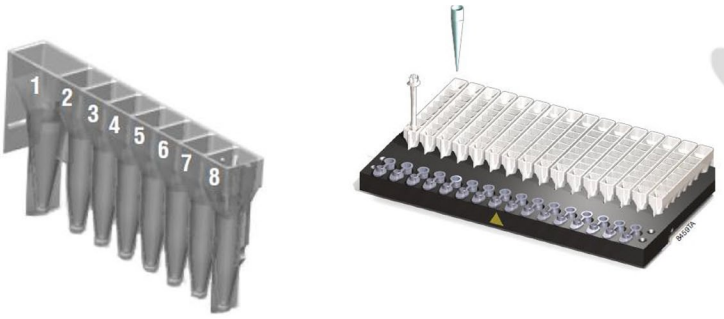

Figura 1. Localización del pocillo#1 en el que se carga la muestra, y del pocillo#8 en el que se coloca el plunger, en los cartuchos del kit Maxwell® 16 FFPE Plus LEV DNA Purification

El instrumento debe configurarse en modo *Rsch* y formato *LEV*, lo cual se realiza entrando en el punto 3 del menú (*Setup*). Una vez configurado, no es necesario reconfigurarlo cada vez que se enciende el equipo de trabajo.

Posteriormente es necesario indicar el protocolo que el instrumento ejecutará. Así pues, tras presionar *Run* (figura 2A), se seleccionará ADN (figura 2C) y protocolo *FFPE/Cells* (figura 2D)

A/B

C

D

Figura 2. Configuración instrumento Maxwell®16 para protocolo AS1135

Salmonella spp. y *Listeria monocytogenes* en productos de alimentación

AS1135

*De manera opcional se puede hacer uso de la Proteinasa K incluida en el kit para facilitar el proceso de extracción; en cuyo caso se procederá a realizar una incubación intermedia durante 1 hora a 70ºC con Buffer de lisis previa a la carga de la muestra en el *Maxwell®16*. La preparación del Buffer de lisis implica mezclar el Buffer de incubación incluido en el kit, más un 10% de la Proteinasa K (facilitada en solución y estable a temperatura ambiente) en una proporción volumétrica 1:1 con la muestra; es decir, 200 µl. de Buffer de lisis por cada 200 µl. de muestra. La tabla 2 muestra las cantidades de Buffer de incubación y Proteinasa K necesarias para preparar el Buffer de incubación que permite procesar una muestra de 200 µl.. Las cantidades son escalables, de manera que en caso de procesar más muestras, es necesario multiplicar las cantidades por el número de muestras.

Preparación de Buffer de lisis N=1 (200 µl.)	
Producto	Volumen (µl)
Buffer de incubación	180
Proneinasa K (20 mg/ml)	20
Total	200

Tabla 2: Volúmenes de buffer de incubación y Proteinasa K necesarios para procesar una muestra

IV. PCR

Para la realización de la *PCR* a tiempo real es necesario seguir las especificaciones contenidas en el kit de detección específico para cada patógeno.

Se recomienda emplear 12 µl. del eluido obtenido con el *Maxwell®16* para la realización de la *PCR*.

Más información: http://www.promega.com/products/instruments/maxwell-16-instruments/

Promega

Mycobacterium tuberculosis

AS1150

Muestra para diagnóstico

Torunda

ADN

1 hora

Firmware 4.90 (AS1000/AS2000)
Firmware 1.4 (AS3000)

Hardware LEV

Tipo de muestra: Torunda, esputo y líquido pleural

Kit Maxwell® empleado:
AS1150 Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification

Cantidad de muestra empleada: 200 µl

Autor del protocolo:
Promega Biotech Ibérica S.L.

Tiempo de pre-procesamiento: 10 min.

Tiempo de Kit Maxwell: 48 min.

Procesamiento:
Con ***M. tuberculosis*** es necesario trabajar siempre en campana y con la mínima manipulación posible hasta que el microorganismo se inactive.
La inactivación se produce a 94ºC durante 30 min. Sin embargo, debido a que las muestras suelen ser muy heterogéneas (esputos, líquido pleural, etc...) no se puede realizar al inactivación de esta forma, pues los mucopolisacáridos se apelmazan y resulta complicado homogeneizar las muestras.

1. Centrifugar las muestras, eliminar el sobrenadante.
2. Resuspenderlas en un buffer 10 mM Tris-1 mM EDTA (ph 7.5) con lisozima (10 mg/ml) y Proteinasa K (200 µg/ml).
3. Incubar entre 56ºC O/N durante 10 min.
4. Añadir la muestra al pocillo 1 del cartucho del kit.
5. Seleccionar el protocolo “Viral”.

Rendimiento y pureza: 40-130ng/ul (1.8-1.9)
Volumen de elución: 50 µl

Más información: http://www.promega.com/products/instruments/maxwell-16-instruments/

Promega

Cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*

AS1150

Investigación

Cultivo

ADN

1 hora

Firmware 4.90 (AS1000/AS2000)
Firmware 1.4 (AS3000)

Hardware LEV

Tipo de muestra: Cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*

Kit Maxwell® empleado:
AS1150 Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification

Cantidad de muestra empleada: 1-5 ml de cultivo

Autor del protocolo:
Promega Biotech Ibérica S.L.

Tiempo de pre-procesamiento: 10 min.

Tiempo de Kit Maxwell: 48 min.

Procesamiento:
1. Centrifugar 1-5ml de cultivo, eliminar sobrenadante y resuspender el pellet en 200 µl de PBS o buffer TE.
2. Añadir 200 µl de Buffer de Lisis y 20 µl de Proteinasa K.
3. Incubar a 75ºC durante 10 min.
4. Añadir la muestra al pocillo 1 del cartucho del kit.
5. Seleccionar el protocolo “Viral”.

Rendimiento y pureza: 40-110 ng/µl (1.8-1.9)

Volumen de elución: 50 µl

Más información: http://www.promega.com/products/instruments/maxwell-16-instruments/