

# HQU - Sweetpotato NCM-ELISA Virus Detection - OP021

**Date:** Nov 13, 2012 9:05 PM

**URL:**

<https://research.cip.cgiar.org/confluence/display/gadc/HQU+++Sweetpotato++NCM-ELISA+Virus+Detectio>

# Table of Contents

---

1	INTRODUCTION	4
2	SCOPE	5
3	SAFETY	6
4	MATERIALS	7
4.1	1. Buffers stocks	7
4.2	2. Other reagents	7
4.3	3. Materials and equipment	8
5	PROCEDURE	10
5.1	Sample preparation	10
5.2	Sample application to nitrocellulose membrane	10
5.2.1		10
5.3	Serological test	11
5.4	INTERNAL QUALITY CONTROL	11
6	INTRODUCCION	12
7	ALCANCE	13
8	SEGURIDAD	14
9	MATERIALES	15
9.1	1. Tampones stocks	15
9.2	2. Otros reactivos	16
9.3	3. Materiales y equipos	16
10	PROCEDIMIENTO	18
10.1	Preparación de la muestra	18
10.2	Aplicación de la muestra en la membrana de nitrocelulosa	18
10.2.1		18
10.3	Prueba serológica	19
10.4	CONTROL DE CALIDAD INTERNO	19

<b>TITLE</b>	<b>HQU - Sweetpotato NCM-ELISA Virus Detection - OP021</b>
OWNER	<a href="#">Head Virology – Sweetpotato Unit</a>
APPROVER	<a href="#">Head HQU</a>
APPROVAL DATE	December 22, 2011
ISSUE DATE	Sep 10, 2012 16:14
CONTRIBUTORS	<a href="#">Fuentes, Segundo (CIP)</a>
CITATION	021
KEYWORDS	<a href="#">accredited</a> , <a href="#">procedure</a> , <a href="#">head_virology</a> , <a href="#">s_fuentes</a>
NEXT REVISION	
DOCUMENT ID	OP021
VERSION NUMBER	<a href="#">90</a>
SPANISH VERSION	

**INTERNATIONAL POTATO CENTER - CIP**



**GADC Logo**

Version	Date	Author	Comment
<a href="#">90</a>	Sep 10, 2012 16:14	<a href="#">Hirahoka, Daniel (CIP)</a>	
<a href="#">89</a>	Sep 10, 2012 15:57	<a href="#">Hirahoka, Daniel (CIP)</a>	change Owner and Approver label
<a href="#">88</a>	May 17, 2012 20:27	<a href="#">Simon, Reinhard (CIP)</a>	
<a href="#">87</a>	May 17, 2012 20:17	<a href="#">Fuentes, Segundo (CIP)</a>	
<a href="#">86</a>	May 10, 2012 14:06	<a href="#">Fuentes, Segundo (CIP)</a>	

# 1 INTRODUCTION

NCM-ELISA is an immuno-enzymatic test that uses nitrocellulose membranes instead of the polystyrene microtitration plates as a support for the reagents used in the serological reaction. The test is as sensitive as the direct double antibody sandwich ELISA (DAS-ELISA), easier to perform, and can be completed in a shorter period of time. It also has another very important advantage: the samples can be dotted onto the nitrocellulose membrane and stored for several weeks before continuing with the test; or they can be sent to another laboratory for development. All the steps are done at room temperature. The test consists of:

- Blotting a very small amount of the test sample (2 to 30  $\mu$ l ) onto the membrane.
- Blocking areas not utilized by the samples.
- Reacting the virus particles with specific antibodies (IgG).
- Detecting the virus specific antibodies with enzyme-labeled antibodies by means of an appropriate substrate (see Figure 1). The intensity of the coloration which is proportional to the virus concentration is stable for a long period of time. The membrane can be easily stored. As in DAS-ELISA, several viruses can be detected at the same time on one membrane by using a mixture of antibodies which are specific for the virus to be tested. This is especially useful for seed production programs where it is generally important to learn only if the sample is infected with virus(es) or not.

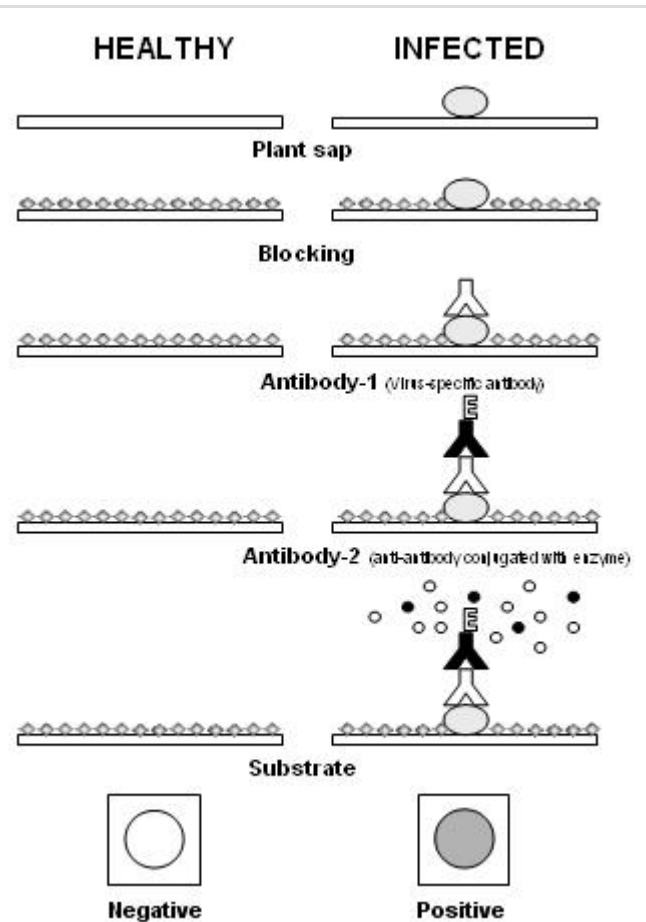


Figure 1. Steps followed in NCM-ELISA

## 2 SCOPE

---

The NCM-ELISA is capable of detecting the following sweetpotato viruses : Sweetpotato feathery mottle virus (SPFMV), Sweetpotato mild mottle virus (SPMMV), Sweetpotato latent virus (SPLV), Sweetpotato mild speckling virus (SPMSV), Sweetpotato virus G (SPVG), Sweetpotato chlorotic fleck virus (SPCFV), C-6 virus (C-6), Sweetpotato chlorotic stunt virus (SPCSV), Sweetpotato collusive virus (SPCV; former name: Sweetpotato caulimo like virus, SPCaLV), Cucumber mosaic virus (CMV).

A controlled list of virus detection methodology being used is maintained at the link : [List of pathogens](#) , [Factors that could affect reliability for virus detection in sweet potato](#)

## 3 SAFETY

---

A laboratory coat should be worn at all times when working in the laboratory.

Do not touch the nitrocellulose membrane with bare hands. Wear dry and clean gloves and/or use forceps

Be careful when manipulating Hydrochloric acid 37% since it is severely corrosive causing burns. Avoid contact with the product, manipulate the product only with adequate ventilation or inside vapor hood. In case with contact eyes immediately flush them with plenty of water and get medical attention. In case of spill collect spillage with absorbent material for liquids and neutralizing e.g. Chemizorb® H+.

## 4 MATERIALS

### 4.1 1. Buffers stocks

NAME	CHEMICAL COMPOSITION	STORAGE CONDITIONS
TBS pH 7.5 (2,000 ml)	Tris Base 4.84 g (0.02 M) NaCl 58.44 g (0.5 M)	Dissolve in 1,990 ml distilled water and adjust to pH 7.5 with concentrated HCl (37%). Complete to 2,000 ml with distilled water.
TTBS (2,000 ml)	TBS 2,000 ml Tween-20 1.0 ml (0.05 %)	Store at $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ .
Extraction buffer	TBS buffer containing 0.2 % sodium sulfite	Store at $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ .
Blocking solution	TBS + 2 % milk + 2 % TRITON X-100	Prepare fresh for each test.
Substrate buffer pH 9.5 (500 ml)	Tris Base 6.05 g (0.1 M) NaCl 2.92 g (0.1 M) $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.51 g (0.005 M)	Dissolve Tris Base, NaCl and $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in 450 ml distilled water. Adjust pH to 9.5 with concentrated HCl (37%). Complete to 500 ml with distilled water.
Antibody and conjugate solution	TBS buffer containing 2% milk	Prepare fresh for each step.
NBT Stock solution	NBT 40 mg N,N-dimethylformamide (70%) 1.2 ml	Mix well and store at $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , protected from light (dark bottle or cover it with foil).
BCIP Stock solution	BCIP 20 mg N,N-dimethylformamide 1.2 ml	Mix well and store at $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , protected from light (dark bottle or cover it with foil).
Substrate solution	Substrate buffer 30ml NBT stock solution 90 $\mu\text{l}$ BCIP stock solution 90 $\mu\text{l}$	Add the NBT stock solution in 30 ml of substrate buffer. Afterwards add the BCIP stock solution drop by drop while stirring (it is NBT/BCIP substrate solution).

## 4.2 2. Other reagents

NAME	STORAGE
<b>Antibodies</b> : for each of the tested viruses	Store at $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ .
<b>GAR</b> : Goat anti-rabbit IgG alkaline phosphate conjugate (BIO-RAD).	Store in a dark and cold place at $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ . Do not freeze
<b>NBT</b> : Nitro blue tetrazolium (BIO-RAD).	Store in a dark and cold place at $-20^{\circ}\text{C}$ .
<b>BCIP</b> : 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BIO-RAD).	Store in a dark and cold place at $-20^{\circ}\text{C}$ .
<b>DMF</b> : N,N-dimethylformamide (SIGMA).	Store at room temperature.
<b>HCl</b> : Hydrochloride acid 37% (MERCK).	Store at room temperature.
<b>MILK</b> : Powdered cow milk	Store at room temperature.

## 4.3 3. Materials and equipment

Name	Material	Storage Conditions / Use
Membranes	Nitrocellulose	Store in a dry place at room temperature.
Filter papers (Whatman # 4)	Filters	Store at room temperature.
Sample bags 4"x6"x6 (wide, long and thickness, respectively. Thickness in thousandth of an inch)	Polyethylene	Use one for each sample.
Small tubes of 1 cm diam.	Glass	Use to cut disks from leaf samples.
Thick test tube or piece of round wood		Use in sample maceration.
Micropipettes (20, 200 and 1000 $\mu\text{l}$ )		Check according to Equipment Control procedure.
200 and 1000ul tips		
Surgical forceps		Use them when manipulating the membranes.
2000, 1000, 500, 250ml containers or glass bottles		
1000, 500, 250, 100, 50ml graduated cylinders		
Distilled water		Store at room temperature in enough volume to be used/refresh weekly



Refrigerator		5 ± 3°C
pH meter		
digital and analytical balances		
rotary shaker		
vacuum pump		
Milli-Q water purification apparatus		
Magnetic stirrer		
Dot blotting apparatus		

## 5 PROCEDURE

---

### 5.1 Sample preparation

---

Collect and identify the samples in the plastic bags (this must be done on the same day the test is performed). Make a composite sample from each plant to be tested by taking one leaf from the top, middle and bottom levels. Select, if possible, those showing symptoms.

From each leaf sample cut a disk approximately 1 cm in diameter. To perform this, position each leaf within the upper part of the plastic bag and, using a small test tube, cut a leaf disk by exerting pressure on the outside of the plastic bag. Eliminate the remaining part of the leaves and grind the leaf disks with 3 ml of extraction buffer (1 ml of extraction buffer per leaf disk). Grind the tissue completely using a large test tube or a piece of round wood. Final sap dilution is approx. 1/50 (lower dilutions could give nonspecific reaction or interfere with the final developed reaction because of higher concentration of polysaccharide components in sap).

Let the bag stand in an upright position for 30-45 minutes at room temperature until the plant sap phases out (this can be achieved by placing the bags in a large beaker).

### 5.2 Sample application to nitrocellulose membrane

---

#### 5.2.1

Previously, cut the nitrocellulose membranes to the size needed.

Identify the membranes by writing the name of the virus (or the number coding each virus) on the top and pre-wet the membranes in TBS for at least 5 minutes prior to use.

In the meantime, connect the dot blotting apparatus to a vacuum pump.

Place a pre-wet piece of No. 4 Whatman paper over the dot blot manifold and place the pre-wet nitrocellulose membrane over the filter paper.

When necessary use a piece of parafilm to block the remaining area of the manifold not covered by the nitrocellulose membrane. Carefully apply a vacuum (200 to 230 mm of mercury) by turning the pump on.

Pipette 30  $\mu$ l sample (plant sap) into each well formed on the nitrocellulose membrane by the vacuum. Take care not to pipette plant tissue. Using a clean tip for each sample, repeat the process until all the samples have been spotted.

Remove the nitrocellulose membrane from the apparatus and transfer the membrane onto a dry piece of filter paper and let it dry for 15-30 minutes.

Record the order/number of the samples as they were spotted onto the membrane on the [NCM-ELISA record sheet](#).

## 5.3 Serological test

---

Dip dry nitrocellulose membrane in blocking solution for 1 hour at room temperature with gentle shaking (50 rpm).

Add the 1st antibody in TBS + 2 % milk. Incubate overnight at room temperature with gentle shaking (50 rpm).

Wash nitrocellulose membrane in TTBS three times for 3 minutes each with rapid shaking (100 rpm).

Add the 2nd antibody (GAR) in TBS + 2 % milk. Incubate for 1 hour at room temperature with gentle shaking (50 rpm).

Wash nitrocellulose membrane in TTBS four times for 3 minutes each with rapid shaking (100 rpm).

When ready to use, prepare the NBT/BCIP substrate solution (prepare immediately before use).

Incubate the nitrocellulose membrane for 30 minutes (1 to 1.5h for SPCSV) in NBT/BCIP substrate solution at room temperature with gentle shaking (50 rpm).

Stop the color development by discarding the NBT/BCIP substrate solution and immersing the nitrocellulose membrane in distilled water. Wash nitrocellulose membrane in tap water three times for 3 minutes each.

Dry the membranes before recording reactions on the [NCM-ELISA record sheet](#). Transfer the NCM-ELISA results to the corporate server through wireless LAN using a hand help computer.

## 5.4 INTERNAL QUALITY CONTROL

---

Make 90 dots on the nitrocellulose membrane with processed samples and separate the last six spaces in the membrane for dotting the controls (two spaces for buffer, two for negative and two for positive controls, respectively).

Positive reactions are those showing different grades of purple color. Record the reactions on the [NCM-ELISA record sheet](#) along with the responses of the samples. Record the positive reaction with a "+" and the mild reaction with a "±".

Positive controls are extracted sap from the plant tissue (*Ipomoea setosa*, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana tabacum*) infected with viruses. Virus infected plants are grown in a greenhouse at 25±4°C with 185 - 278 µmol/m<sup>2</sup>.seg (10,000 - 15,000 lux) light intensity for at least 8 hours .

Negative controls are produced from sap from virus-free sweet potato plants grown in an isolated greenhouse at the same conditions as above.

Both negative and positive controls are spotted on the nitrocellulose membranes every time a NCM-ELISA test is performed. Batch of plants used as controls are renewed at one-month intervals.

## 6 INTRODUCCION

NCM-ELISA es una prueba inmunoenzimática que usa membranas de nitrocelulosa en lugar de placas de microtitulación de poliestireno como soporte de los reactivos usados en la reacción serológica. Esta prueba es tan sensitiva como la prueba directa de ELISA de sándwich de doble anticuerpo (DAS-ELISA), más simple de realizar y puede ser realizada en un período más corto de tiempo. También tiene otra gran ventaja: las muestras pueden ser colocadas en la membrana de nitrocelulosa la que puede ser guardada por varias semanas antes de continuar con la prueba, o pueden ser enviadas a otro laboratorio para su desarrollo. Todos los pasos son realizados a temperatura ambiente. La prueba consiste en: \* Colocar una pequeñísima cantidad de muestra (15 a 30ul/muestra) sobre la membrana. \* Bloquear las áreas no utilizadas por las muestras. \* Hacer reaccionar las partículas de virus con anticuerpos específicos (IgG). \* Detectar los anticuerpos específicos de virus con enzimas adheridas a los anti-anticuerpos por medio de un sustrato apropiado ( **Figura 1** ). La intensidad de la coloración es proporcional a la concentración del virus y es estable por un largo período de tiempo. La membrana puede ser fácilmente guardada. Como en DAS-ELISA, varios virus pueden ser detectados al mismo tiempo en una membrana usando una mezcla de anticuerpos que son específicos para los virus probados. Esto es especialmente usado para los programas de producción de semilla donde generalmente sólo importa saber si la muestra está infectada con virus o no.

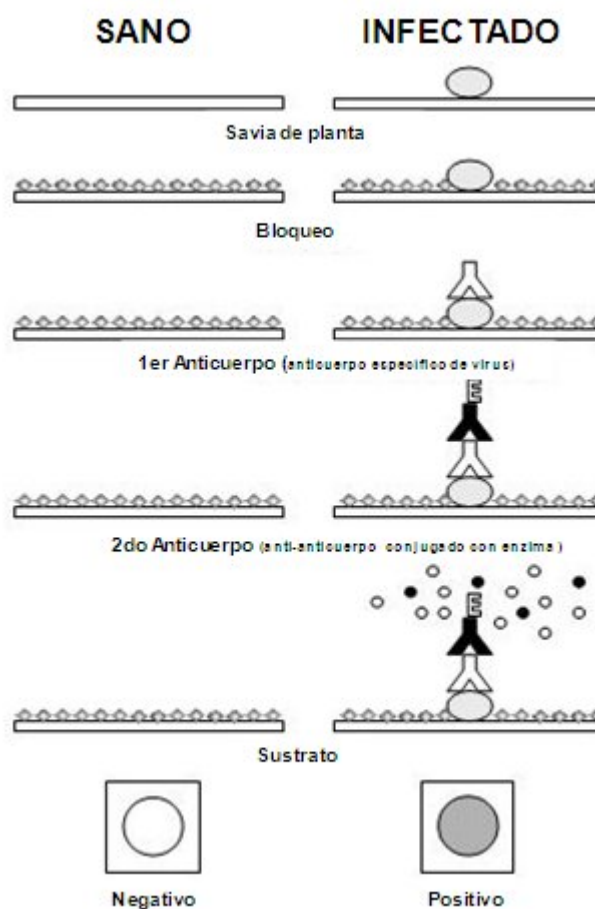


Figura 1. Pasos seguidos en NCM-ELISA

## 7 ALCANCE

---

La NCM-ELISA es capaz de detectar los siguientes virus de camote: Sweetpotato feathery mottle virus (SPFMV), Sweetpotato mild mottle virus (SPMMV), Sweetpotato latent virus (SPLV), Sweetpotato mild speckling virus (SPMSV), Sweetpotato virus G (SPVG), Sweetpotato chlorotic fleck virus (SPCFV), virus C-6 (C-6), Sweetpotato chlorotic stunt virus (SPCSV), Sweetpotato collusive virus (SPCV; anteriormente conocido como Sweetpotato caulimo like virus, SPCaLV), Cucumber mosaic virus (CMV).

La lista de las metodologías de detección de virus que se está usando se mantiene en el enlace: [Lista de patógenos](#) , [Factores que pueden afectar la confiabilidad en la detección de los virus de camote](#).

## 8 SEGURIDAD

---

Usar guardapolvo todo el tiempo cuando se esté trabajando en el laboratorio.

No tocar las membranas de nitrocelulosa con los dedos. Usar guantes limpios y secos y/o pinzas.

Tener cuidado al manipular el ácido clorhídrico concentrado (37%) ya que es un producto corrosivo que provoca quemaduras. Evitar el contacto con la sustancia, manipule el producto en una área ventilada o dentro de una campana extractora. En caso de contacto con los ojos, lávese inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico. En caso de derrame recoger el producto con material absorbente de líquidos y neutralizante, p.ej. con Chemizorb® H+.

## 9 MATERIALES

### 9.1 1. Tampones stocks

NOMBRE	COMPOSICION QUIMICA	CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO
TBS pH 7.5 (2,000 ml)	Tris Base 4.84 g (0.02 M) NaCl 58.44 g (0.5 M)	Disolver en 1,990 ml de agua destilada y ajustar el pH a 7.5 con HCl concentrado (37%). Completar a 2,000 ml con agua destilada.
TTBS (2,000 ml)	TBS 2,000 ml Tween-20 1.0 ml (0.05 %)	Almacenar a $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$
Tampón de extracción	Tampón TBS conteniendo 0.2 % de sulfito de sodio	Almacenar a $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$
Solución de bloqueo	TBS + 2 % leche en polvo + 2 % TRITON X-100	Preparar fresco en cada prueba.
Tampón sustrato pH 9.5 (500 ml)	Tris Base 6.05 g (0.1 M) NaCl 2.92 g (0.1 M) $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.51 g (0.005 M)	Disolver Tris Base, NaCl y $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 450 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 9.5 con HCl concentrado (37%). Completar a 500 ml con agua destilada.
Solución de anticuerpos y conjugado	Tampón TBS conteniendo 2% de leche en polvo	Preparar fresco en cada prueba.
Solución stock de NBT	NBT 40 mg N,N-dimetil formamida (70%) 1.2 ml	Mezclar bien y almacenar a $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , protegerlo de la luz (en frasco oscuro o cubierto con papel aluminio).
Solución stock de BCIP	BCIP 20 mg N,N-dimetil formamida 1.2 ml	Mezclar bien y almacenar a $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , protegerlo de la luz (en frasco oscuro o cubierto con papel aluminio).

Solución sustrato	Tampón sustrato 30ml Solución stock de NBT 90 <i>ul</i> Solución stock de BCIP 90 <i>ul</i>	Añadir la solución stock de NBT a los 30 ml de la solución sustrato. Luego añadir la solución stock de BCIP gota a gota mientras se agita (esto es la solución sustrato NBT/BCIP).
-------------------	--	--

## 9.2 2. Otros reactivos

NOMBRE	ALMACENAMIENTO
<b>Anticuerpos</b> : para cada uno de los virus a ser detectados.	Almacenar a $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ .
<b>GAR</b> : IgG de cabra anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina (BIO-RAD).	Almacenar en un lugar frío y oscuro a $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ . No congelar
<b>NBT</b> : Nitro blue tetrazolium (BIO-RAD).	Almacenar en un lugar frío y oscuro a $-20^{\circ}\text{C}$ .
<b>BCIP</b> : 5 Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BIO-RAD).	Almacenar en un lugar frío y oscuro a $-20^{\circ}\text{C}$ .
<b>DMF</b> : N,N-dimetil formamida (SIGMA).	Almacenar a temperatura ambiente.
<b>HCl</b> : Acido clorhídrico 37% (MERCK).	Almacenar a temperatura ambiente.
<b>MILK</b> : leche de vaca en polvo	Almacenar a temperatura ambiente.

## 9.3 3. Materiales y equipos

Nombre	Material	Condiciones de almacenamiento / Uso
Menbranas	Nitrocelulosa	Almacenar en un lugar seco y a temperatura ambiente.
Papel filtro (Whatman # 4)	Filtros	Almacenar a temperatura ambiente.
Bolsas plásticas 4"x6"x6 (ancho, largo y grosor, respectivamente. Grosor en milésima de pulgada)	Polietileno	Usar una por cada muestra.
Tubos pequeños de 1 cm diam.	Vidrio	Se usa para cortar discos de hojas (muestras).
Tubo de ensayo grueso o una pieza de madera redonda		Se usa para la maceración de las muestras.
<a href="#">Micropipetores (20, 200 and 1000 <math>\mu\text{l}</math>)</a>		Chequear calibración de acuerdo al procedimiento de control de equipo.
Puntas de 200 y 1000 $\mu\text{l}$		



Pinzas		Usarlos cuando se manipule las membranas.
Contenedores o botellas de vidrio de 2000, 1000, 500, 250ml		
Probetas de 1000, 500, 250, 100, 50ml		
Agua destilada		Almacenar a temperatura ambiente en un volumen suficiente para ser usado/cambiado semanalmente
Refrigerador		5 ± 3°C
pH metro		
Balanza digital y analítica		
Agitador rotatorio		
Bomba de vacío		
Purificador de agua Mili-Q		
Agitador magnético		
Aparato "Dot blotting" (Caja de vacío)		

## 10 PROCEDIMIENTO

---

### 10.1 Preparación de la muestra

---

Colecte e identifique las muestras en las bolsas plásticas (se debe hacer el mismo día que se realiza la prueba). Haga una muestra compuesta de cada planta que va a ser evaluada colectando una hoja de la parte superior, otra del medio y otra de la parte inferior. Seleccione, en lo posible, las hojas que muestren síntomas.

De cada hoja colectada corte un disco de aproximadamente 1 cm. de diámetro. Para realizar esta operación, la hoja se coloca en la parte superior izquierda de la bolsa plástica y se corta un disco de la hoja con la ayuda de un tubo de ensayo pequeño ejerciendo presión por fuera de la bolsa plástica. Elimine la parte restante de la hoja y macere los discos de hojas con 3 ml de tampón de extracción (1 ml por cada disco), utilizando el tubo de ensayo grande o la pieza de madera redonda. La dilución final es aproximadamente 1/50 (diluciones mas bajas puede dar reacciones inespecíficas o interferir con el desarrollo de la reacción final debido a la concentración alta de los componentes polisacáridos de la savia).

Deje la bolsa en posición vertical (parada) por 20-30 minutos a temperatura ambiente hasta que sedimente el tejido de la planta en el fondo de la bolsa (esto se puede conseguir colocando las bolsas en un vaso grande).

### 10.2 Aplicación de la muestra en la membrana de nitrocelulosa

---

#### 10.2.1

Previamente, corte la membrana de nitrocelulosa del tamaño que se necesita.

Identifique las membranas escribiendo el nombre del virus (o el número que codifica cada virus) en la parte superior y pre-humedecer las membranas en TBS por al menos 5 minutos antes de su uso.

Mientras tanto, conectar el aparato de vacío a la bomba de vacío.

Colocar una pieza pre-humedecida de papel Whatman No. 4 sobre el aparato de vacío y colocar la membrana pre-humedecida sobre el papel filtro.

Cuando sea necesario use un pieza de parafilm para bloquear el área del aparato de vacío que no ha sido cubierto por la membrana de nitrocelulosa. Cuidadosamente aplique el vacío (200 a 230 mm de mercurio) prendiendo la bomba de vacío.

Pipetee 30 µl de muestra (savia de la planta) en cada concavidad formado en la membrana de nitrocelulosa por acción del vacío. Tenga cuidado en no pipetear tejido de la planta. Usando una punta limpia por cada muestra, repita el proceso hasta que todas las muestras hayan sido colocadas sobre la membrana.

Retire la membrana de nitrocelulosa del aparato y transfiera la membrana a una pieza de papel filtro seco y dejela secar por 15-30 minutos.

Registre el orden/número de las muestras como ellas han sido colocadas sobre la membrana en la [hoja de registro de NCM-ELISA](#).

## 10.3 Prueba serológica

---

Sumerga la membrana de nitrocelulosa seca en la solución de bloqueo por 1 hora a temperatura ambiente en agitación suave (50 rpm).

Añada el 1er anticuerpo en TBS + 2 % de leche. Incube toda la noche a temperatura ambiente en agitación suave (50 rpm).

Lave las membranas de nitrocelulosa en TTBS tres veces por 3 minutos cada uno en agitación rápida (100 rpm).

Añada el 2do anticuerpo (GAR) en TBS + 2 % de leche. Incube por 1 hora a temperatura ambiente en agitación suave (50 rpm).

Lave las membranas de nitrocelulosa en TTBS tres veces por 3 minutos cada uno en agitación rápida (100 rpm).

Cuando esté listo para su uso, prepare la solución sustrato NBT/BCIP (prepararlo inmediatamente antes de su uso).

Incube la membrana de nitrocelulosa por 30 minutos (1 a 1.5h para SPCSV) en la solución sustrato NBT/BCIP a temperatura ambiente en agitación suave (50 rpm).

Detenga el desarrollo de color descartando la solución sustrato NBT/BCIP y sumergiendola en agua destilada. Lave la membrana de nitrocelulosa en agua tres veces por 3 minutos cada vez.

Dejar secar las membranas de nitrocelulosa antes de registrar las reacciones en la [hoja de registro de NCM-ELISA](#). Transfiera los resultados de la prueba de NCM-ELISA al servidos corporativo a través del LAN inalámbrico usando una computadora de mano (pocket).

## 10.4 CONTROL DE CALIDAD INTERNO

---

Colocar 90 muestras procesadas en la membrana de nitrocelulosa y separar los seis espacios en la membrana para colocar los controles (dos espacios para el tampón, dos para el control negativo y dos para el control positivo, respectivamente).

Las reacciones positivas son aquellas que muestran diferentes grados de color púrpura. Registre las reacciones en la [hoja de registro de NCM-ELISA](#) junto con las respuestas (síntomas) de las plantas de donde se colectaron las muestras. Registre la reacción positiva con un "+" y las reacciones suaves con un "±".

Los controles positivos son savia extraída de tejidos de planta (*Ipomoea setosa*, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana tabacum*) infectados con virus. Las plantas infectadas con virus se mantienen creciendo en un invernadero a  $25\pm 4^{\circ}\text{C}$  con  $185 - 278 \mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{seg}$  ( $10,000 - 15,000 \text{ lux}$ ) intensidad de luz por al menos 8 horas.

Los controles negativos son savia proveniente de plantas de camote libre de virus que crecen en invernaderos aislados en las mismas condiciones indicadas arriba.

Tanto controles positivos como negativos son colocados en la membrana de nitrocelulosa cada vez que se realiza la prueba de NCM-ELISA. El grupo de plantas que son usadas como control son renovadas mensualmente.