VIII. ANEXOS.

VIII.1. Anexo 1. *Extracción de ácidos nucléicos.*

VIII.1.1. Anexo 1a. *Extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN).*

1. *Homogenizado de la muestra.* Se tomó por cada muestra, una alícuota de 300 µl de hemolinfa, que se colocó en tubos eppendorf de 1.5 ml, se le agregaron 400 µl de amortiguador de extracción (ver Anexo 5a), 40 µl de proteinasa K y 40 µl de SDS al 10%. Se incubó a 36°C durante 60 minutos con agitaciones cada 15 minutos.
2. *Separación del ADN.* Se agregaron 400 µl de fenol equilibrado (F.E.), se agitó vigorosamente (hasta formar una emulsión), se incubó 10 minutos y se centrifugó a 12,000 x *g*, 15 minutos.
3. *Precipitación del ADN.* Se extrajo la fase acuosa, la cual contiene al ADN y se depositó en tubos que contenían 200 µl de F.E. y 200 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se agitó y se centrifugó a 12,000 x *g*, 10 minutos. Posteriormente, se transfirió el sobrenadante a tubos que contenían 400 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se centrifugó a 12,000 x *g*, 3 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se repitió el paso anterior. Finalmente se transfirió el sobrenadante a tubos que contenían 50 µl de NaOAc (0.3 M, pH 4.8) a los cuales se les agregó 1 volumen de etanol al 100% (a –70°C) y se centrifugó a 12,000 x *g*, 10 minutos. A partir de este momento fue visible el pellet de ADN.
4. *Lavado del Pellet.* Se eliminó el sobrenadante del paso anterior cuidando de no perder el pellet; se agregaron 500 µl de etanol al 70%, se agitó y se centrifugó a 12,000 x *g*, 5 minutos.
5. *Resuspensión del ADN.* Se eliminó por completo el etanol y el pellet se resuspendió en 200 µl de TE pH 8.0 a 37°C durante una hora, para luego almacenarse a –70°C.

VIII.1.2. Anexo 1b. *Extracción de ácido ribonucleico (ARN).*

1. *Homogenizado de la muestra.* Por cada 250 µl de hemolinfa o 100 mg de tejido (pleópodos) se agregaron 750 µl del reactivo TRIzol LS Reagent de GIBCO-BRL.
2. *Separación del ARN.* Se adicionaron 200 µl de cloroformo; se incubó durante 10 minutos con agitaciones periódicas y luego se centrifugó a 12,000 x *g*, 15 minutos.

3. *Precipitación del ARN.* Se extrajo la fase acuosa, la cual contiene al ARN, se depositó en un nuevo tubo, se le agregó un volumen (aproximadamente 500 µl) de alcohol isopropílico (a -70°C), se incubó 10 minutos y se centrifugó a 12,000 x *g*, 10 minutos. A partir de este momento se observó el pellet de ARN en el fondo del tubo.
4. *Lavado del Pellet.* Se eliminó el sobrenadante cuidando no perder el pellet; se agregaron 1,000 µl de etanol al 75% y se centrifugó a 5,000 x *g*, 5 minutos.
5. *Resuspensión del ADN.* Se eliminó el etanol, se dejó secar por completo, finalmente se le agregó TE pH 8.0 (entre 20 y 50 µl, dependiendo del tamaño de pellet), se incubó a 37°C, 30 minutos y se almacenó a -70°C.

VIII.2. Anexo 2. *Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y trasncripción reversa en PCR (RT-PCR).*

Todas las reacciones de PCR (para WSSV) y RT-PCR (para TSV y YHV) fueron preparadas en tubos para PCR de 200 µl dentro de una campana de flujo laminar previamente tratada con luz UV maximizando los procedimientos y las condiciones de limpieza para de ésta manera disminuir los riesgos de contaminación. Otro de los cuidados que se tuvo principalmente con las muestras para RT-PCR, fue tratar tanto el material como el agua con la que fueron preparadas las muestras con 0.1% de dietil-pirocarbonato (DEPC) para eliminar la presencia de ARNasas.

Todas las reacciones fueron preparadas en un volumen final de 25 µl al cual se le agregó 25 µl de aceite mineral estéril. Esto con la finalidad de evitar evaporación por las altas temperaturas a las que se exponen las muestras en el termociclador.

VIII.2.1. Anexo 2a. *PCR para la detección de WSSV.*

Componentes de la reacción: adicionados en el siguiente orden:

Componente	Volumen
Agua estéril	18.25 µl
Amortiguador para PCR (10X)	2.50 µl
Mezcla de dNTP´s, 10 mM	0.50 µl
Cl Mg^{+2}, 25 mM	0.75 µl
Cebador 1 WSPV28F, 20 µM	0.50 µl
Cebador 2 WSPV28R, 20 µM	0.50 µl
Taq ADN Polimerasa	1.00 µl
Templete	1.00 µl
Volumen de la reacción =	25.00 µl

Condiciones de la PCR.

Proceso	Temperatura	Tiempo	No. de ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	5 minutos	1
Desnaturalización	95°C	50 segundos	
Alineación	50°C	1 minuto	30
Extensión	72°C	1 minuto	
Extensión final	72°C	7 minutos	
	4°C	Indefinido	

La PCR se realizó en un termociclador GENIUS Modelo: FGEN05TP, con un tiempo aproximado de 3 horas.

VIII.2.2. Anexo 2b. *WSSV Dual Aqua Vir IHHNV.*

El *WSSV Dual Aqua Vir IHHNV* es un juego comercial de reactivos que de manera fácil y rápida permite evaluar simultáneamente mediante una reacción de PCR concentraciones muy bajas de WSSV e IHHNV, las cuales son reveladas mediante una técnica especializada de hibridación *dot-blot* que sustituye de manera muy eficiente el uso de la electroforesis ya que presumiblemente es 100 veces más sensible que esta técnica y 10,000 veces más sensible que una técnica tradicional de hibridación *dot-blot*.

Componentes del kit.

- 2	Microplatos con 24 discos		
- 50	Filtros listos para usar		
- 50	Tubos para PCR		
-	Solución de amplificación 1 (A1)	2 x 1 ml	Tapa amarilla
-	Solución de amplificación 2 (A2)	60 µl	Tapa roja
-	Solución de lavado 1 (W1)	80 ml	Tapa negra
-	Solución de lavado 2 (W2)	80 ml	Tapa gris
-	Anticuerpos (AntiDIG-AP) (100X)	250 µl	Tapa azul
-	Amortiguador para dilución de Anticuerpos	30 ml	
-	Sustrato TMB	25 ml	
-	Agua estéril	50 ml	Tapa blanca
-	Pinzas		
-	Instrucciones de uso		

A) Preparación de las muestras.

1. De cada muestra, se depositaron 150 µl de hemolinfa en un tubo eppendorf de 2.0 ml; se centrifugó a 10,000 x *g*, 10 minutos, para eliminar impurezas.
2. Se recuperó el sobrenadante, el cual se depositó en un nuevo tubo, se calentó a 100°C, 10 minutos, para posteriormente centrifugarlo a 10,000 x g, durante 10 minutos.
3. Se recuperó el sobrenadante el cual para analizarlo se realizaron las siguientes diluciones 1/25 y 1/250 agregando 20 µl de la muestra en 480 µl de agua destilada y esterilizada para preparar la primera, y de ésta, se tomaron 10 µl y se agregaron a 90 µl de agua destilada y esterilizada para preparar la segunda.

B) Pruebas de PCR.

1. En cada prueba de PCR se consideró el número de muestras a analizar (n) más el control (n+1), siendo éste el total de muestras en el análisis.
2. Se preparó una mezcla madre (MM), agregando por cada muestra 40 µl de la solución A1 (40 (n+1)) más 2 ml de la solución A2 (2 (n+1)).
3. Se agregaron 10 µl de la muestra (ya diluida) en un tubo para PCR (proporcionados en el kit) el contenía 38 µl de la MM, dando un volumen final de la reacción de 48 µl y finalmente se agregaron 25 ml de aceite mineral estéril.
4. Se realizaron las pruebas de PCR en un termociclador GENIUS Modelo: FGEN05TP, con un tiempo aproximado de 1 hora 15 minutos, con el siguiente programa:

Proceso	Temperatura	Tiempo	No. de ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	3 minutos	1
Desnaturalización	95°C	30 segundos	
Alineación	62°C	30 segundos	40
Extensión	72°C	1 minuto	
Extensión final	72°C	3 minutos	
	4°C	Indefinido	

C) Pruebas de hibridación dot-blot.

Hibridación.

1. Primeramente, usando las pinzas, se colocaron los filtros en los microplatos cuidando que la leyenda amarilla quedara hacia abajo y el punto azul hacia arriba. Para la identificación de las muestras, se usó una tabla que contiene 6 columnas enumeradas de izquierda a derecha del 1 al 6 y 4 filas identificadas de arriba hacia abajo con las letras de la A a la D.
2. Se tomaron los productos de PCR para desnaturalizar el ADN colocándolos a 100° C durante 10 minutos e inmediatamente después colocarlos en hielos por otros 10 minutos. Se depositaron los productos de PCR en los filtros correspondientes y se dejaron en reposo por 20 minutos a temperatura ambiente (TA). Mientras tanto se colocó la solución W1 en el horno de hibridación a una temperatura de 70° C.

Detección colorimétrica.

En algunos de los pasos siguientes se uso un agitador orbital Lab-Line de 4 x 100 RPM el cual fue ajustado en cada paso a las necesidades del mismo, de la siguiente manera:

(0): Sin agitación.

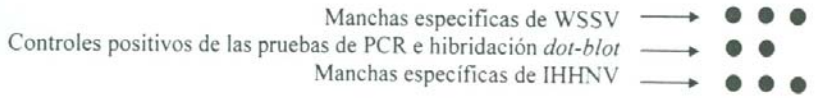
(+): Agitación leve (a 80 RPM sin rotación o movimientos fuertes de los filtros dentro de los microplatos).

(++): Agitación fuerte (para este se incremento la velocidad de rotación a 200 RPM hasta observar una rotación de los filtros dentro de los microplatos).

3. Se colocaron los microplastos en el agitador orbital.
4. Se lavaron 3 veces por 2 minutos con 500 ml de la solución W1 calentada a 70°C (++). Esta operación se realizó sin excederse del límite de tiempo y considerando como un lavado efectivo en el momento que el punto azul desaparece.
5. Se preparó la solución anticuerpos (SA) diluyendo 100 veces el AntiDIG-AP (tapa azul) en el amortiguador para dilución de anticuerpos. Para esto se agregaron por cada reacción 5 µl de AntiDIG-AP en 500 µl del amortiguador. Esta solución debe prepararse justamente antes de usarla ya que su estabilidad esta limitada a unos cuantos minutos a 4° C).
6. Se agregó a cada filtro 450 µl de la SA y se incubaron por 30 minutos a TA (+).
7. Se lavó tres veces por 2 minutos con la solución W2 (++) sin excederse del tiempo especificado.
8. Se agregaron 500 µl del sustrato TMB, y se incubaron durante 15 minutos a TA (0).
9. Finalmente se lavaron los filtros con 500 µl de agua destilada durante 5 minutos (++).

Validación e interpretación de resultados.

La prueba fue considerada como válida cuando aparecieran los controles positivos correspondientes a las pruebas de PCR e hibridación *dot-blot*, mismos que dan la orientación del filtro para la interpretación de los resultados, considerando lo siguiente:



Interpretación de los resultados del DAV.

La prueba esta validada por los controles, pero no hay presencia de ninguno de los dos virus.

La muestra esta infectada por WSSV.

La muestra esta infectada por ambos virus.

La muestra esta infectada por IHHNV.

La muestra está inhibida, regularmente se requiere hacer una dilución mayor.

VIII.2.3. Anexo 2c. *RT-PCR para la detección de TSV.*

Componentes de la reacción: adicionados en el siguiente orden:

Componente	Volumen
Agua estéril y libre de ARNasas	15.75 µl
Amortiguador para RT-PCR (5X)	5.00 µl
Mezcla de dNTP´s, 10 mM	0.50 µl
Solución DTT 100 mM	1.25 µl
Mezcla de enzimas (del TOT)	0.50 µl
Cebador 1 (TS1185F), 20 µM	0.50 µl
Cebador 2 (TS1185R), 20 µM	0.50 µl
Templete	1.00 µl
Volumen de la reacción =	25.00 µl

Los *primers* TS1185F (5-´TCA ATG AGA GCT TGG TCC-3´) y TS1185R (5´-AAG TAG ACA GCC GCG CTT-3´), están diseñados para amplificar un fragmento de 231 pb.

Condiciones de la RT-PCR.

Proceso	Temperatura	Tiempo	No. de ciclos
Trascripción reversa (RT)	60°C	30 minutos	1
Desnaturalización inicial	94°C	2 minutos	1
Desnaturalización	94°C	45 segundos	40
Alineación y extensión	60°C	45 segundos	
Extensión final	60°C	7 minutos	1
	4°C	Indefinido	

La RT-PCR se realizó en un termociclador Perkin Elmer DNA Termal Cycler, Modelo: 480 en un tiempo aproximado de 2 horas 45 minutos.

VIII.2.4. Anexo 2d. *RT-PCR para la detección de YHV.*

Componentes de la reacción: adicionados en el siguiente orden:

Componente	Volumen
Agua estéril y libre de ARNasas	15.75 µl
Amortiguador para RT-PCR (5X)	5.00 µl
Mezcla de dNTP´s, 10 mM	0.50 µl
Solución DTT 100 mM	1.25 µl
Mezcla de enzimas (del TOT)	0.50 µl
Cebador 1 (YHV273F), 20 µM	0.50 µl
Cebador 2 (YHV273R), 20 µM	0.50 µl
Templete	1.00 µl
Volumen de la reacción =	25.00 µl

Los *primers* YHV273F (5´-CAA GAT CTC ACG GCA ACT CA-3´) y YHV273R (5´-CCG ACG AGA GTG TTA GGA GG-3´), están diseñados para amplificar un fragmento de 273 pb.

Condiciones de la RT-PCR.

Proceso	Temperatura	Tiempo	No. de ciclos
Transcrpción reversa (RT)	55°C	30 minutos	1
Desnaturalización inicial	94°C	2 minutos	
Desnaturalización	94°C	30 segundos	10
Alineación	60°C	30 segundos	
Extensión	68°C	1 minuto	
Desnaturalización	94°C	30 segundos	25
Alineación	60°C	30 segundos	
Extensión	68°C	1 minuto + 5 segundos de autoextensión	
Extensión final	68°C	7 minutos	1
	4°C	Indefinido	

La RT-PCR se realizó en un termociclador Perkin Elmer DNA Termal Cycler, Modelo: 480 en un tiempo aproximado de 3 horas 45 minutos.

VIII.3. Anexo 3. *Obtención y cuantificación de las sondas moleculares.*

VIII.3.1. Anexo 3a. *Obtención de las sondas de TSV y YHV.*

Estas sondas fueron sintetizadas empleando el juego comercial de reactivos DIG-High Prime (No. de Cat: 1 585 606) de Boehringer Mannheim, empleando como templete productos de RT-PCR. El DIG Hihg Prime (DHP) es una mezcla de 160 µl de amortiguador de reacción y glycerol 50% (v/v) en cuyo contenido se incluyen 1 U/µl de enzima de Klenow, cebadores al azar y una premezcla de nucleótidos en las siguientes concentraciones: 1 mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM dGTP, 0.65 mM dTTP, además de 0.35 mM DIG-11-dUTP. La proporción molar de estos dos últimos (1.857:1.0) está ajustada para que al haber un molde de ADN disponible, los cebadores al azar mediante la enzima de Klenow inicien la polimerización de nucleótidos en una nueva cadena de ADN en la que se incorpora un DIG-11-dUTP el cual tomará la posición del dTTP aproximadamente cada 20 o 25 nucleótidos.

Procedimiento:

1. Se agregó un volumen cuyo contenido fuera de 1 µg de molde (ADNc de los productos de RT-PCR) y se ajustó el volumen a 16 µl.
2. Se desnaturalizó el templete por calentamiento a 100°C y rápidamente se enfrió en hielo, 10 minutos en cada proceso.
3. Se agregaron 4 µl de DIG High Prime, se mezcló y centrifugó rápidamente.
4. Se incubó la reacción a 37°C durante toda la noche (aproximadamente 20 horas).
5. Finalmente se paró la reacción calentándola a 65°C durante 10 minutos y se almacenó a -20°C hasta el momento de su cuantificación.

VIII.3.2. Anexo 3b. *Cuantificación de las sondas de TSV y YHV.*

La cuantificación de las sondas se realizó utilizando los juegos comerciales de reactivos DIG Quantification Teststrips y DIG Control Teststrips (No. de Cat: 1 669 958 y 1 669 966, respectivamente) ambos de Boehringer Mannheim.

Procedimiento:

1. Se preparó una serie de diluciones de la sonda (ADN marcado con digoxigenina) en agua libre de ARNasas: Primeramente se depositó 1 µl de la sonda en 39 µl de agua y a partir de esta se prepararon las siguientes diluciones:

Dilución		Sonda / Agua	ADN marcado en el DCT	Factor de dilución del DQT
A.	1:3.3	10 µl en 23 µl	300 $pg \cdot \mu l^{-1}$	132
B.	1:10	5 µl en 45 µl	100 $pg \cdot \mu l^{-1}$	400
C.	A diluida 1:10	5 µl (A) en 45 µl	30 $pg \cdot \mu l^{-1}$	1,320
D.	B diluida 1:10	5 µl (B) en 45 µl	10 $pg \cdot \mu l^{-1}$	4,000
E.	C diluida 1:10	5 µl (C) en 45 µl	3 $pg \cdot \mu l^{-1}$	13,200

2. Para cada procedimiento de cuantificación se prepararon y se etiquetaron cinco viales con 2.5 ml de los siguientes compuestos:

   Vila 1: 2.5 ml de amortiguador 2 (ver Anexo 5a).

   Vial 2: 2.5 ml de solución anticuerpos (1:2,000 de Anti-DIG-AP en amortiguador 2).

   Vial 3: 2.5 ml de amortiguador 1 (ver Anexo 5a).

   Vial 4: 2.5 ml de amortiguador 3 (ver Anexo 5a).

   Vial 5: 2.5 ml de la solución de detección (por cada 2 ml de amortiguador 3 se agregaron 9 µl de NBT´s y 7 µl de BCIP´s).

3. Se depositó 1 µl de cada dilución en cada una de las cuadrículas del DQT, se dejo secar aproximadamente 2 minutos.

4. Para llevar a cabo la cuantificación se colocaron el DCT y el DQT (el cual contiene las diferentes diluciones de la muestra) de tal manera que las membranas no se tocaran entre si, y se mantuvieron en las siguientes condiciones:

Vial No.	Acción	Tiempo
1	Bloqueo	2 minutos
2	Anticuerpos	3 minutos
1	Bloqueo	1 minutos
3	Lavado	1 minutos
4	Cambio de pH	1 minutos
5	Detección	5 a 30 minutos

5. Se detuvo la reacción con un baño de agua (destilada es suficiente) en cuanto se puedo detectar con claridad las reacciones colorimétricas en el DCT, cuidando evitar así la formación de color de fondo.
6. Por último se realizó la comparación colorimétrica del DQT y el DCT para determinar la concentración de ADN marcado por cada μl de sonda. Para esto se observó cuidadosamente cuáles cuadriculas de ambos teststrips (DQT y DCT) coincidieron en la intensidad colorimétrica, posteriormente se multiplicó la concentración de ADN marcado que le correspondió al DCT por el factor de dilución que le correspondió al DQT, el resultado es en $pg \cdot \mu l^{-1}$.

VIII.4. Anexo 4. *Hibridación dot-blot para la detección de TSV y YHV.*

1. **Preparación de las muestras.**

   Homogeneizado: Se homogenizaron 40 mg de tejido (pleópodos) en 200 µl de H_2O libre de ARNasas, luego se agregaron 200 µl de amortiguador de desnaturalización (ver Anexo 5a). Se eliminó el debris centrifugando a 13,500 x *g*, 30 minutos y se recuperó el sobrenadante.

   Extracto de ARN: Ver Anexo 1b.

   Productos de RT-PCR: Ver Anexos 2b y 2c.

2. **Fijación.** Se depositó 1 µl de muestra sobre una membrana de nylon cargada positivamente (Boehringer Mannheim), se secó a 60°C, durante 60 minutos. Posteriormente se fijaron los nucleótidos con luz ultravioleta durante 3 minutos en el crosslinker.

3. **Prehibridación.** Se realizó en el amortiguador High SDS durante 4 horas en tubos de hibridación (Boehringer Mannheim) en un horno con rotación a una temperatura de 42°C.

4. **Hibridación.** Se cambió el amortiguador High SDS por la solución de hibridación (amortiguador High SDS + 30 ng de sonda específica). La hibridación se realizó durante 16 horas en las condiciones anteriormente mencionadas.

5. **Lavados.** Se realizaron una serie de lavados de la siguiente manera:
   - Dos veces en SSC (2 X) + 0.1% de SDS, 20 minutos a temperatura ambiente (TA).
   - Dos veces en SSC (0.5 X) + 0.1% de SDS, 20 minutos a 68°C.
   - Una vez en amortiguador de lavado (ver Anexo 5a), 10 minutos a TA.
   - Una vez en el amortiguador 2, 60 minutos a TA.
   - Una vez en solución anticuerpos [diluir el Anti-DIG-AP (cuya concentración es de 750 $U \cdot ml^{-1}$) 1:2,000 en amortiguador 2, para obtener una concentración final de 375 $mU \cdot ml^{-1}$], 60 minutos a TA.
   - Una vez en amortiguador de lavado,10 minutos a TA.
   - Una vez en el amortiguador 3, 10 minutos a TA.

6. **Detección.** Se realizó en la solución de detección (Por cada 2 ml de amortiguador 3 se agregaron 9 µl de NBT´s y 7 µl de BCIP´s). Esta reacción se efectuó en completa oscuridad en un tiempo entre 5 minutos y toda la noche.

VIII.5. Anexo 5. *Compuestos químicos y juegos comerciales de reactivos.*

VIII.5.1. Anexo 5a. *Compuestos químicos.*

Acetato de Sodio	(0.3 M NaOAc, pH 4.8) Para preparar 100 ml: agregar en 50 de H_2O deshionizada 40.824 g de NaOAc, diluir completamente, ajustar el pH a 4.8 con HCl y finalmente aforar a 100 ml. Conservar en refrigeración a 4°C.
Amortiguador 1: Ácido maléico.	(0.1 M Ácido maléico, 0.15 M NaCl; pH 7.5) Para preparar 100 ml: agregar en 100 ml de H_2O deshionizada 1.161 g de ácido maléico, 0.8766 g de NaCl y ajustar el pH a 7.5 (20°C) con NaOH sólido. Conservar en refrigeración a 4°C.
Amortiguador 2: Solución de bloqueo.	Para preparar 100 ml: agregar 10 ml de Blockin Stock Solution (10X) en 90 ml de Amortiguador 1 (Ácido Maléico). Conservar en refrigeración a 4°C.
Amortiguador 3: (de detección).	(0.1 M Tris, 0.1 M NaCl, 50.0 mM MgCl2; pH 9.5) Para preparar 100 ml: agregar 1.211 g de Tris, 0.5844 g de NaCl y 0.4761 g de $MgCl_2$ en 100 ml de H_2O deshionizada y ajustar el pH a 9.5 con HCl. Conservar en refrigeración a 4°C.
Amortiguador de desnaturalización	(500 µl de Formamida, 162 µl de 12.5 M Formaldheido, 100 µl de 40.0 mM MOPS (1X), 238 µl de H_2O libre de ARNasas) Para preparar100 ml: agregar 50 ml de formamida, 16.2 ml de 12.5 M de formaldheido, 10 ml de 40 mM de MOPS y 23.8 ml de H_2O libre de ARNasas, mezclar a TA y almacenar a 4°C. La solución 1X MOPS se prepara agregando 9.248 $g \cdot l^{-1}$, se trata con 0.1% de DEPC, se reposa durante la noche y finalmente se esterilizar.
Amortiguador de extracción	0.1 M NaCl, 10.0 mM Tris, 1.0 mM EDTA Para preparar 100 ml: agregar 0.5844 g de NaCl en 100 ml de amortiguador TE; pH 7.4. Conservar en refrigeración a 4°C.
Amortiguador de lavado.	(0.1 M Ácido maléico, 0.15 M Na Cl; pH 7.5 + 0.3% Tween 20) Para preparar 100 ml: agregar a 100 ml de amortiguador 1 (Ácido maléico) 300 µl de Tween 20.
Amortiguador Hihg SDS.	Para preparar 100 ml: agregar 25 ml de SSC (20X), 5 ml de 1 M Na PO, 20 ml de Blocking Stock Solution (10X), 500 µl de Sarcosyl (20%), 3.5 g de SDS, tratar con 0.1% de DEPC (50.5 µl), reposar toda la noche, esterilizar y finalmente agregar 50 ml de Formamida.

DIG Control Teststrips	No. de Cat.: 1 669 966 (25 reacciones) de Boehringer Mannheim.
DIG Quantification Teststrips	No. de Cat.: 1 669 958 (50 reacciones) de Boehringer Mannheim.
DIG-High Prime	No. de Cat.: 1 585 606 (160 µl) de Boehringer Mannheim.
PCR Super Mix	No. de Cat.: 10572-014 (100 reacciones) de LIFE TECNOLOGIES, de GIBCOBRL®.
Titan One Tube RT-PCR System	No. de Cat.: 1 855 476 (100 reacciones) de Roche®.
TSV BASIC PRIMER KIT FOR RT-PCR	No. de Cat.: TSV-PrimerB, Versión 7-00 de DiagXotics, Inc.
WSSV Dual Aqua Vir IHHNV (DAV)	Versión 1. Skuld-Tech Research & Development. Sitio en la Web: http://www.skuldtech.com/kit.html Instituto Pourquier 326, rue de la Galera 34097 Montpellier, France.