



DANAGENE SPIN VIRAL DNA/RNA KIT

REF.0612.1 100 EXTRACCIONES

1.INTRODUCCION

DANAGENE Spin Viral DNA/RNA Kit está designado para una rápida purificación simultánea de ADN y ARN viral a partir de muestras libres de células, como suero, plasma y fluido cerebroespinal.

Los virus cuando son lisados con un detergente y proteinasa K, liberan los ácidos nucleicos virales. Luego, en presencia de sales caotrópicas, los ácidos nucleicos virales se unen selectivamente a una membrana de sílica en una spin column. Los ácidos nucleicos permanecen unidos mientras que una serie de lavados y pasos de centrifugación eliminarán los componentes celulares contaminantes. Finalmente, con un tampón de elución los ácidos nucleicos virales serán eluidos de la membrana. Este proceso no requiere precipitaciones alcohólicas, extracciones con disolventes orgánicos, o extensivos manejos de ácidos nucleicos.

El DANAGENE Spin Viral DNA/RNA Kit puede ser utilizado para la extracción de ADN y ARN viral a partir de un amplio rango de virus de ADN y ARN. **No obstante, el éxito no se puede garantizar para todas las especies de virus y deberá ser validada por el usuario.**

2.COMPONENTES KIT

Producto		T ^a
Tampón Lisis Viral	25 ml	RT
Tampón Lavado Virus 1*	36 ml	RT
Tampón Lavado Virus 2 *	20 ml	RT
Tampón Elución	15 ml	RT
Proteinase K*	105 mg	-20°C
Carrier RNA*	1 mg	-20°C
Spin Columns	100 unid	RT
Tubos de Recolección	200 unid	RT

(*) Estas soluciones deben ser preparadas como se indica en el apartado de preparaciones preliminares.

- Tampón Lisis Viral y Tampón Lavado Virus 1* contienen guanidine hydrochloride, el cual puede formar componentes reactivos cuando se combinan con lejía. Ambos tampones son agentes irritantes, por esta razón recomendamos el uso de guantes y gafas para su manipulación. en caso de contacto con la piel o ojos , lavar con abundante agua.

2.1 Equipos y reactivos necesarios y no provistos

- Etanol 100 %
- Microcentrifuga.
- Microtubos de 1. 5 ml.

2.2 Almacenamiento y estabilidad

- Todos los componentes son estables durante 12 meses desde la fecha de la compra siendo almacenados como se indica.

3. PROTOCOLO

3.1 Preparaciones Preliminares

- Disolver la proteinasa K en **5.2 ml** de agua libre de nucleasas y conservar a – 20°C. Se recomienda realizar varias alícuotas para evitar demasiados ciclos de descongelado-congelado. A esta temperatura es estable durante 1 año.
- **Añadir 20 ml Etanol 100 % al Tampón Lavado Virus 1***. Mantener el envase bien cerrado para evitar la evaporación del etanol.
- **Añadir 80 ml Etanol 100 % Tampón Lavado Virus 2 ***. Mantener el envase bien cerrado para evitar la evaporación del etanol.
- **Carrier RNA:** Aumenta la unión de los ácidos nucleicos virales a la membrana de fibra de vidrio y reduce el riesgo de degradación del ARN viral. Los eluidos que se obtienen con este kit contienen tanto ARN virales como carrier RNA, **y las cantidades de carrier RNA pueden exceder las cantidades de ARN virales.** Los cálculos de cuanta cantidad de eluido deberá ser añadido a las aplicaciones posteriores deberá basarse en las cantidades de carrier RNA añadido.

Para obtener niveles altos de sensibilidad en reacciones de amplificación, puede ser necesario ajustar la cantidad de carrier RNA añadida al Tampón Lisis Viral . Si usted desea utilizar menos carrier RNA por muestra, usted necesita validar la cantidad de carrier RNA necesario para cada tipo de muestra y aplicaciones posteriores.

Protocolo de preparación de Carrier RNA

- a) Añadir 500 µl de Tampón de elución al microtubo que contiene el carrier RNA suministrado en un microtubo del kit para obtener una solución stock.
- b) Mezclar y alícuotar en 25-50 µl , conservar a -20°C. Evitar repetidos ciclos de calentamiento-enfriamiento.
- c) Calcular el volumen de Tampón Lisis Viral /carrier RNA mezcla requerida para procesar el número requerido de muestras simultáneamente. Por ejemplo, añadir 50 µl de carrier a 2.5 ml de tampón de Lisis Viral
- d) En un tubo estéril añadir el volumen de carrier RNA stock solution al volumen de Tampón Lisis Viral. Mezclar suavemente con pipeta, arriba y abajo.
- e) Conservar a 4°C hasta su uso. **Utilizar este tampón preparado antes de 1 hora.**

3.2 Protocolo para la extracción de ADN y ARN viral a partir de suero, plasma y fluidos biológicos

1. Pipetear **50 µl Proteinasa K** en un microtubo de centrifuga estéril.
2. **Añadir 200 µl de plasma o suero** en el microtubo. Si usted procesa muestras de < 200 µl ajustar el volumen final a 200 µl utilizando PBS o 0.9% NaCl.
3. **Añadir 200 µl Tampón Lisis Viral (conteniendo el carrier RNA)**. Cerrar el microtubo y vortex vigorosamente durante 20 segundos.
4. **Incubar a 70°C durante 10 minutos.**
5. **Brevemente centrifugar el microtubo para recoger las gotas de la tapa.**
6. **Añadir 250 µl etanol 100% a la muestra.**Vortex durante 15 segundos.
7. **Añadir el lisado a la Spin Columna** con un tubo de recolección.
8. **Centrifugar la columna a 10.000 rpm por 1 min.** Eliminar el tubo de recolección. Colocar la spin columna en un nuevo tubo de recolección.
9. **Lavar la columna con 500 µl Tampón Lavado Virus 1 con etanol.** Centrifugar la columna a 12.000 rpm por 1 min.
10. **Lavar la columna con 500 µl Tampón Lavado Virus 2 con etanol.** Centrifugar la columna a 12.000 rpm por 1 min.
11. **Lavar la columna con 500 µl Tampón Lavado Virus 2 con etanol.** Centrifugar la columna a 14.000 rpm por 1 min.
12. **Centrifugar la spin columna a máxima velocidad durante 2 minutos** para eliminar el etanol residual.
13. **Eluir con 30-50 µl Tampón de Elución o agua libre de nucleasas añadido al centro de la membrana de la columna.**

Es muy importante añadir el agua libre de nucleasas en el centro de la membrana para que se humedezca completamente.

14. Incubar a temperatura ambiente por 2 minutos.

15. Centrifugar a 10.000 rpm velocidad durante 60 segundos. Recoger los 30-50 µl y volver a depositar en el centro de la membrana. Esto hace aumentar el rendimiento.

16. Incubar 2 minutos y centrifugar a máxima velocidad.

Si se observan problemas en las detecciones posteriores se puede cambiar el volumen del eluido añadido a la PCR o RT-PCR.

4. GUIA DE PROBLEMAS Y SOLUCIONES

Para cualquier duda o consulta adicional sobre el protocolo pónganse en contacto con el servicio técnico de DANAGEN-BIOTED S.L info@danagen.es