



## DANAGENE SPIN VIRAL RNA KIT

REF.0613.1 100 EXTRACCIONES

### 1.INTRODUCCION

**DANAGENE Spin Viral RNA Kit** está designado para una rápida purificación de ARN viral a partir de muestras libres de células, como suero, plasma y otros fluidos biológicos.

La muestra primero es lisada en presencia de sales caotrópicas que inactivan las RNasa asegurando la extracción de ARN viral intacto y permiten la unión selectiva a una membrana de fibra de vidrio ubicada en una spin columna. Los ARN virales permanecen unidos mientras que una serie de lavados y pasos de centrifugación eliminarán los componentes celulares contaminantes. Finalmente, con un tampón de elución o agua libre de nucleasas los ARN 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 RNA Kit puede ser utilizado para la extracción de ARN viral a partir de un amplio rango de virus d 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

	100 extracciones	Almacenamiento
Tampón Lisis Viral	45 ml	Temperatura ambiente
Tampón Precipitación Proteínas	4 ml	Temperatura ambiente
Tampón de Lavado 1	10 ml	Temperatura ambiente
Tampón de Lavado 2*	20 ml	Temperatura ambiente
Agua libre nucleasas	8 ml	Temperatura ambiente
Spin Columna RNA	100 unidades	Temperatura ambiente
Tubos de Recogida	200 unidades	Temperatura ambiente

(\*) Estas soluciones deben ser preparadas como se indica en la secciones de Preparaciones Preliminares del protocolo.

## **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**

- **El Tampón de Lisis, Tampón Unión microRNA y el Tampón de Lavado 1** contienen **tiocianato de guanidina** que es un agente irritante, por esta razón, recomendamos el uso de gafas y guantes para su manipulación.
- **Añadir 80 ml Ethanol 100 % Tampón Lavado Virus 2 \***. Mantener el envase bien cerrado para evitar la evaporación del etanol.

### **3.2 Recomendaciones generales**

#### **Tipos de muestras**

- Plasma/suero: Evitar trabajar con muestras que se observe hemólisis. Después de la obtención del plasma o suero, es importante centrifugar la muestra para obtener un material inicial libre de células.
- Para muestras sólidas como tejidos (5-10 mg) se puede homogenizar en 300-400  $\mu$ l de PBS utilizando un homogenizador eléctrico de mano o sistemas de homogenización basados en bolas. Centrifugar la muestra y utilizar 200  $\mu$ l del sobrenadante transparente libre de partículas.
- Para heces preparar una suspensión con PBS, 10% (w/v) y utilizar el mejor sistema para poder lisar todas las partículas víricas. Centrifugar la muestra y utilizar 200  $\mu$ l del sobrenadante transparente libre de partículas.
- Swabs: Incubar el swab en una cantidad adecuada de tampón (ejem. PBS) o medio libre de células durante 30 minutos con movimiento. Eliminar el swab y proceder con 200  $\mu$ l del sobrenadante transparente libre de partículas.

En tejidos y heces se debe considerar que se puede copurificar otros ARN que pueden inhibir los siguientes ensayos de PCR.

### **3.3 Protocolo para la extracción de ARN viral a partir de fluidos biológicos libre de células**

**1. Añadir 200 µl de muestra** a un microtubo. Si usted procesa muestras de < 200 µl ajustar el volumen final a 200 µl utilizando PBS.

**2. Añadir 400 µl Tampón Lisis Viral** . Cerrar el microtubo y vortex vigorosamente durante 20 segundos.

**3. Incubar a temperatura ambiente durante 10-15 minutos.**

*El tiempo de incubación y la temperatura es crítico para la lisis así como para la estabilidad del ARN. Suele ser suficiente una incubación a temperatura ambiente sin pérdida significativa de sensibilidad. Se recomienda optimizar estos puntos para el tipo de muestra que se va a utilizar. Se pueden comparar protocolos con y sin el uso de proteinasa K, así como diferentes tiempos y temperaturas de incubación*

*Si la muestra es muy viscosa (esputos) se recomienda el uso de proteinasa K o una incubación a 70°C.*

**4. Añadir 30 µl de Tampón Precipitación Proteínas.** Vortex 5 segundos. Incubar 1 minuto a temperatura ambiente.

**5. Centrifugar durante 3 minutos a 11.000 x g** para obtener el pellet proteico.

**6. Traspasar el sobrenadante** a un nuevo microtubo.

**7. Añadir 350 µl Etanol 100%** .Mezclar bien.

**8. Pasar la mitad del lisado a una Spin columna RNA** con su tubo de recolección. **Centrifugar a 8.000 rpm durante 30 segundos.**

**9. Pasar la otra mitad y centrifugar a 8.000 rpm durante 30 segundos.**

**10. Añadir 100 µl Tampón de Lavado 1.** Centrifugar a 11.000 x g durante 1 minuto.

**11. Añadir 700 µl Tampón de Lavado 2.** Centrifugar a 11.000 x g durante 1 minuto.

**12. Centrifugar 3 minutos a máxima velocidad** para eliminar todo el etanol.

**13. Elución con 50 µl Agua libre de nucleasas.** 2 minutos de incubación.

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

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

**15. 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 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](mailto:info@danagen.es)