



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 de 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 y el Tampón de Lavado 1** contienen **guanidinio de tiocianato** que es un agente irritante, por esta razón, recomendamos el uso de gafas y guantes para su manipulación.
- **Añadir 80 ml Etanol 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 μ l de PBS utilizando un homogenizador eléctrico de mano o sistemas de homogenización basados en bolas. Centrifugar la muestra y utilizar 200 μ 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 μ 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 μ l del sobrenadante transparente libre de partículas.
- Medio de transporte / Medio de transporte viral: Vortex los tubos que contienen el hisopo a la velocidad máxima durante 1 minuto. Use 200 μ l como muestra de entrada.

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.

OMITIR este paso e ir al punto 5 sin añadir el Tampón Precipitación Proteínas si se procesan muestras a partir de Medios de transporte viral como nuestro DANASALIVA/SWAB VIRAL Sample Collection Kit, eNAT (COPAN), DNA/RNA Shield (ZTMO),etc.

5. Centrifugar durante 2 minutos a 11.000 x g.

6. Traspasar el sobrenadante evitando tocar el pellet que se puede formar a un nuevo microtubo.

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

8. Pasar la mitad del lisado a una Spin column 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