



PURO Virus RNA

Purificación de ARN viral a partir de plasma, suero, y fluidos corporales libres de células



PB-L
Productos
Bio-Lógicos®

Innovación y Desarrollo en Biotecnología

<http://www.pb-l.com.ar>



PURO Virus RNA

Cat. no. SC02

Contenido

Componentes	SC0201 (50 reacc)	SC0202 (100 reacc)	SC0203 (200 reacc)
Buffer A	30 ml	60 ml	120 ml
Buffer W1	17 ml	33 ml	66 ml
Buffer W2	15 ml	24 ml	2x 24 ml
ddH ₂ O libre de RNAsas	15 ml	15 ml	30 ml
Carrier ARN	310 µg	620 µg	1240 µg
ddH ₂ O libre de RNAsas	1 ml	1 ml	1,5 ml
Columnas, libres de RNAsas	50	100	200
Tubos Recolección de 2ml, libres de RNAsas	50	100	200
Tubos de 1,5ml libres de RNAsas	50	100	200
Manual	1	1	1

Equipamiento y reactivos adicionales requeridos

Microcentrífuga
Micropipetas
Tips con filtro
Tubos 1,5 ml libres de RNAsas
Etanol 96 %

Almacenamiento

PURO Virus RNA puede ser almacenado a temperatura ambiente (15-25°C) y es estable por 12 meses. Para almacenamientos más prolongados, el kit puede ser almacenado a 2-8°C. Si en estas condiciones se forma algún precipitado, colocar el kit a temperatura ambiente. Si es necesario, calentar a 37°C en baño de agua por 10 min para disolver los precipitados. El Carrier ARN debe ser resuspendido solo en ddH₂O libre de RNAsas y almacenado a -20°C.

Introducción

El kit PURO Virus RNA provee un método rápido, simple, y costo-efectivo para la purificación de ARN provenientes de virus a partir de plasma, suero, y fluidos corporales libres de células. El kit PURO Virus RNA utiliza la tecnología de membranas de silica y mini columnas que permiten la obtención de ARN de alta pureza en 20 minutos. La tecnología utilizada elimina las etapas de extracción con solventes orgánicos, mejorando el rendimiento y reproducibilidad del método.

El protocolo consiste en una etapa de lisis con agentes caotrópicos que inactivan RNAsas celulares y permiten la liberación del genoma viral. Posteriormente, se carga la minicolumna con la muestra lisada y el material genético se adsorbe selectivamente a la membrana. El resto de los componentes de la muestra (proteínas, lípidos, inhibidores etc.) no son retenidos y luego se eliminan las trazas con soluciones de lavado específicas. Finalmente, el ARN viral se recupera de la columna con un buffer de elución. El kit contiene un carrier de ARN que permite maximizar el rendimiento del ARN purificado.

El ARN obtenido es de alta pureza lo que permite ser utilizado en aplicaciones posteriores tales como reacciones enzimáticas, RT-qPCR, hibridaciones, etc. No se requiere extracción ni precipitación con solventes orgánicos.

Este producto está desarrollado únicamente para investigación, no para diagnóstico, o tratamiento de enfermedades, ni para comida, cosméticos, etc.

Notas importantes

1. Todos los pasos del protocolo deben realizarse a temperatura ambiente (15–25°C).
2. Equilibrar las muestras a temperatura ambiente.
3. En el paso 12 deben usarse tubos de Centrifuga de 1.5 ml libres de RNAsas. No provistos en el kit.

Preparación de la solución de Carrier ARN

- Agregar 310 µl, 620 µl ó 1240 µl de ddH₂O libre de RNAsas al tubo conteniendo 310 µg (cat. SC0201), 620 µg cat. (SC202/3) ó 1240 µg cat. (SC203) de Carrier ARN liofilizado para obtener una solución de 1 µg/µl. Disolver el Carrier ARN completamente, dividirlo en alícuotas de tamaño adecuado y almacenar a -20°C. No congelar-descongelar las alícuotas de Carrier ARN más de 3 veces.
- El Carrier ARN no puede ser disuelto directamente en el Buffer A. Debe ser disuelto primero en ddH₂O libre de RNAsas y luego agregado al Buffer A.
- Solución de trabajo de Carrier ARN: Calcular el volumen de mezcla Buffer A/Carrier ARN requerido para cada conjunto de muestras, mediante selección del número de muestras a ser procesadas simultáneamente a partir de la tabla 1. Para un número mayor de muestras, los volúmenes pueden ser calculados usando los siguientes cálculos:

$$n \times 0,56 \text{ ml} = y \text{ ml}$$

$$y \text{ ml} \times 10,7 \text{ µl/ml} = z \text{ µl}$$

n = número de muestras a ser procesadas simultáneamente

y = volumen calculado de Buffer A

z = volumen de Carrier ARN/ddH₂O libre de RNAsas que se debe agregar al Buffer A

Tabla 1 Volúmenes de mezcla Buffer A y Carrier ARN/ddH₂O libre de RNAsas requerido para el Procedimiento

Número de Muestras	Vol. Buffer A (ml)	Vol. Carrier ARN/ddH ₂ O libre de RNAsas (µl)
1	0,56	6
2	1,12	12
3	1,68	18
4	2,24	24
5	2,8	30
6	3,36	36
7	3,92	42
8	4,48	48
9	5,04	54
10	5,6	60
11	6,16	66
12	6,72	72
13	7,28	78
14	7,84	84
15	8,4	90
16	8,96	96
17	9,52	102
18	10,08	108
19	10,64	114
20	11,2	120

Nota: Mezclar el Buffer A con la solución de Carrier ARN por inversión (No usar vortex para evitar la formación de burbujas).

Protocolo

**Previo al uso, agregar etanol (96-100%) al Buffer W1 y Buffer W2.
El volumen está indicado en la botella.**

1. Agregar 140 μ l de plasma, suero o hisopado bucal/nasofaríngeo en el tubo de centrifuga (Equilibrar las muestras a temperatura ambiente).

Nota: Si el volumen de muestra es <140 μ l, agregar el volumen apropiado de solución de cloruro de sodio 0.9% para alcanzar un volumen total de 140 μ l. Si desea procesar un volumen de muestra >140 μ l escalar proporcionalmente el volumen de Buffer A (ej. a un volumen de muestra de 280 μ l agregar 1120 μ l de buffer A incluyendo el carrier).

2. Agregar 560 μ l de Buffer A (conteniendo 10,7 μ g/ml de Carrier ARN). Cerrar la tapa y mezclar con pulsos de vortex por 15 seg.

Nota: Para asegurar una lisis eficiente, es esencial que la muestra y el Buffer A sean mezclados completamente hasta alcanzar una solución homogénea.

3. Incubar a 25°C (temperatura ambiente) por 15 min. Centrifugar brevemente el tubo de 1.5 ml para eliminar gotas de la cara interna de la tapa.

4. Agregar 560 μ l de etanol (96-100%) (pueden verse precipitados después de la adición del etanol), cerrar la tapa y mezclar completamente con pulsos de vortex por 15 seg. Incubar el lisado con el etanol por 5 min a temperatura ambiente (15-25°C).

Si el volumen de muestra procesada fue >140 μ l escalar proporcionalmente el volumen de etanol (ej. a un volumen de muestra de 280 μ l, agregar 1120 μ l de etanol 96%)

Nota: Previo al uso enfriar el etanol (96-100%) en hielo si la temperatura ambiente es mayor a 25°C.

5. Centrifugar brevemente el tubo de 1.5 ml para eliminar gotas de la cara interna de la tapa.
6. Cuidadosamente transferir 650 μ l del lisado, **incluyendo cualquier** precipitado que se haya formado a la Columna libre de RNAsas junto con el tubo de Recolección de 2 ml libre de RNAsas, sin mojar los bordes. Cerrar la tapa y centrifugar a 8.000 rpm ($\sim 6.000 \times g$) por 1 min. Descartar el líquido del tubo colector y colocar la columna cuidadosamente en el mismo tubo de recolección.
7. Repetir el paso 6 hasta cargar toda la muestra lisada a la columna.
8. Cuidadosamente abrir la Columna, y agregar 500 μ l de Buffer W1 (**Asegurarse que se agregó el etanol previo al uso**) sin mojar los bordes. Cerrar la tapa y centrifugar a 8.000 rpm ($\sim 6.000 \times g$) por 1 min. Descartar el líquido del tubo colector y colocar la columna cuidadosamente en el mismo tubo de recolección.
9. Cuidadosamente abrir la Columna, y agregar 500 μ l de Buffer W2 (**Asegurarse que se agregó el etanol previo al uso**) sin mojar los bordes. Cerrar la tapa y centrifugar a 8.000 rpm ($\sim 6.000 \times g$) por 1 min. Descartar el líquido en el tubo colector y colocar la columna cuidadosamente en el mismo tubo de recolección.
10. Repetir el paso 9.
11. Colocar la columna en el mismo tubo de recolección. Centrifugar a máxima velocidad (12.000 rpm, $\sim 13.400 \times g$) por 3 min para secar la membrana completamente.

- Colocar la columna en un tubo de centrifuga de 1,5 ml limpio y libre de RNAsas (provistos en el kit). Cuidadosamente abrir la Columna, y agregar 50-100 μ l ddH₂O libre de RNAsas al centro de la membrana. Cerrar la tapa e incubar a temperatura ambiente (15-25°C) por 5 min. Centrifugar a máxima velocidad (12.000 rpm, \sim 13.400 \times g) por 1 min.

Nota: Asegurarse que el ddH₂O libre de RNAsas este equilibrada a temperatura ambiente (15-25°C). Debe ser aplicada sobre el centro de la membrana para una elución completa del ARN unido.

Almacenar el ARN purificado a -80°C.

Solución de posibles inconvenientes	
Problema	Soluciones
No detecto ARN	1- Verificar el contenido de Etanol 96% en los bufferes W1 y W2. 2- Confirmar el agregado del carrier de ARN 3- Controlar el estado de conservación y antigüedad de la muestra (evitar ciclos de congelado y descongelado)
Observo Precipitado en el buffer A ó W1	1- Incubar el buffer a 60°C hasta que desaparezcan (aprox 10 min)
Observa degradación de ARN en su muestra	1- Mantener su muestra en hielo durante todo el tiempo y agregar inhibidor de RNAasas. Almacenarla a -80°C.
No detecto ARN a partir de muestras almacenadas	1 –Almacenar las muestras a -80°C. 2 -Se recomienda alicuotear el ARN purificado si va ser utilizado varias veces para evitar ciclos de congelado y descongelado. 3 -Utilizar Inhibidor de RNAasas en la muestra purificada..