

PURO Virus **DNA/RNA *Quick***

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



PB-L
Productos
Bio-Lógicos®

Innovación y Desarrollo en Biotecnología

www.pb-l.com.ar

PURO Virus DNA/RNA Quick

Cat. no. SA16

Contenido

Componentes	SA1601 (50 reacc)	SA1602 (100 reacc)	SA1603 (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 %
β-Mercaptoetanol

Almacenamiento

PURO Virus DNA/RNA *Quick* puede ser almacenado a temperatura ambiente (22-25 °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 dH_2O libre de RNasas y almacenado a -20 °C.

Introducción

El kit PURO Virus DNA/RNA *Quick* provee un método rápido, simple, y costo-efectivo para la purificación de ácidos nucleicos provenientes de virus a partir de plasma, suero, y fluidos corporales libres de células. El kit PURO Virus DNA/RNA *Quick* utiliza la tecnología de membranas de sílica y minicolumnas que permiten la obtención de ácidos nucleicos de alta pureza. El kit PURO Virus DNA/RNA *Quick* ha sido optimizado para disminuir los tiempos de incubación, disminuyendo así el tiempo total del proceso.

El protocolo consiste en una etapa de lisis con agentes caotrópicos que inactivan nucleasas celulares y permiten la liberación de los ácidos nucleicos. 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, los ácidos nucleicos virales se recuperan de la columna con un buffer de elución. El kit contiene un carrier de ARN que permite maximizar el rendimiento.

Los ácidos nucleicos obtenidos son de alta pureza, aptos para ser utilizados en aplicaciones posteriores tales como reacciones enzimáticas, 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, o cosméticos, etc.

Notas importantes

- Todos los pasos del protocolo deben realizarse a temperatura ambiente (22–25 °C).
- Equilibrar las muestras a temperatura ambiente.
- Agregar etanol (96-100%) al Buffer W1 y Buffer W2, según el volumen indicado en cada botella. Rotular en la etiqueta la ejecución de este paso.
- Agregar β -Mercaptoetanol (**no provisto en el kit**) al Buffer A, a una concentración final de 0.5% (v/v), según indica la siguiente tabla:

Componente	SA1601 (50 reacc)	SA1602 (100 reacc)	SA1603 (200 reacc)
Buffer A	30 ml	60 ml	120 ml
β -Mercaptoetanol*	150 μ l	300 μ l	600 μ l

**No provisto en el kit*

La solución de Buffer A conteniendo β -Mercaptoetanol puede ser almacenada a temperatura ambiente (22-25 °C) durante 1 mes.

En el caso de no utilizar todo el volumen de la botella en un periodo menor a 30 días, **se recomienda adicionar el β -Mercaptoetanol a la alícuota del Buffer A a utilizar en el momento** (ej. Para una reacción adicionar 2,8 μ l de β -Mercaptoetanol a un volumen de 560 μ l de Buffer A).

El β -Mercaptoetanol es un agente desnaturalizante de proteínas, actúa como inhibidor de las RNasas y ayuda a fluidificar la mucosidad, en el caso de muestras de biológicas como saliva, hisopado bucal/nasofaríngeo, entre otras, ayudando a mejorar la etapa de lisis.

Alternativamente es posible utilizar Ditioneitol (DTT) en el Buffer A, a una concentración final de 40mM. La solución de Buffer A conteniendo DTT puede ser almacenada a temperatura ambiente (22-25 °C) durante 1 mes.

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. SA1601), 620 µg cat. (SA1602) o 1240 µg cat. (SA1603) 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:

$$\begin{aligned}n \times 0,56 \text{ ml} &= y \text{ ml} \\y \text{ ml} \times 10,7 \text{ µl/ml} &= z \text{ µl}\end{aligned}$$

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

Número de Muestras	Vol. Buffer A (ml)	Vol. Carrier ARN/ _{dd} H 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

Tabla 1 Volúmenes de mezcla Buffer A y Carrier ARN/_{dd}H₂O libre de RNasas requerido para el Procedimiento

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 µl de plasma, suero, saliva o hisopado bucal/nasofaríngeo en el tubo de centrifuga (Equilibrar las muestras a temperatura ambiente).

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

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

Nota: comprobar el agregado de β -Mercaptoetanol (No provisto en el kit) a una concentración de 0.5% (v/v) en el buffer A.

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

Incubar a 25 °C (temperatura ambiente) por 1 min. Centrifugar brevemente el tubo de 1.5 ml para eliminar gotas de la cara interna de la tapa.

3. Agregar 560 µl 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 1 min a temperatura ambiente (15-25 °C).

Nota: Si el volumen de muestra procesada fue >140 µl escalar

proporcionalmente el volumen de etanol (ej. a un volumen de muestra de 280 µl, agregar 1120 µl de etanol 96%)

4. Centrifugar brevemente el tubo de 1.5 ml para eliminar gotas de la cara interna de la tapa.
5. Cuidadosamente transferir 650 µl 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.
6. Repetir el paso 6 hasta cargar toda la muestra lisada a la columna.
7. Cuidadosamente abrir la Columna, y agregar 500 µl 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.
8. Cuidadosamente abrir la Columna, y agregar 500 µl 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.
9. Repetir el paso 9.
10. 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.
11. 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 μl ddH_2O 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. Almacenar la muestra a -80 °C.

Nota: Asegurarse que el ddH_2O libre de RNasas este equilibrada a temperatura ambiente (22-25 °C). Debe ser aplicada sobre el centro de la membrana para una elución completa del ARN unido.

Opcional: Agregar 0,5 μl de inhibidor de RNasas (40 U/ μl) (No provisto en el kit) luego de la elución y conservar a -80 °C.

Solución de posibles inconvenientes	
Problema	Soluciones
No detecto ácidos nucleicos	1- Verificar el contenido de Etanol 96% en los buffers 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 o W1	1- Incubar el buffer a 60 °C hasta que desaparezcan (aprox. 10 min).
Observa degradación de ADN/ARN en su muestra	1- Mantener su muestra en hielo durante todo el tiempo y agregar inhibidor de RNasas. Almacenarla a -80 °C.
No detecto ADN/ARN a partir de muestras almacenadas	1- Almacenar las muestras a -80 °C. 2- Se recomienda alicuotear la muestra purificada si va ser utilizada varias veces para evitar ciclos de congelado y descongelado. 3 - Utilizar Inhibidor de RNasas en la muestra purificada.