

BIOTOOLS

BIOTOOLS B&M LABS.S.A.

Fabricado por:

BIOTOOLS B&M Labs, S.A.
Valle de Tobalina - 52 - Nave 39
28021 Madrid
Spain

Tel. (34) 91 710 00 74
Fax (34) 91 505 31 18
e-mail: info@biotools.eu
www.biotools.eu

SPEEDTOOLS RNA VIRUS EXTRACTION KIT

*Kit para la extracción y purificación de ácidos
nucleicos de origen viral a partir de fluidos
biológicos libres de células*

Instrucciones de Uso (Ref. 21.140M/1/2)

**ANTES DE USAR ESTE KIT LEA EN SU TOTALIDAD LAS INSTRUCCIONES DE USO
ESPECIALMENTE SI NO ESTÁ FAMILIARIZADO CON EL PROTOCOLO**

1. EXPLICACIÓN DEL KIT

SPEEDTOOLS RNA VIRUS EXTRACTION KIT permite una rápida y eficiente extracción de ácidos nucleicos de origen viral a partir de fluidos biológicos como:

- plasma
- suero
- orina
- sangre
- tejidos

En el primer paso de extracción la muestra que contiene virus ARN es lisada mediante incubación en el buffer de lisis (Buffer BAV1) rico en isotiocianato de guanidina, que inhibe las ARNasas presentes en las muestras biológicas. La adición posterior de etanol a la muestra lisada crea las condiciones adecuadas para la unión del ARN a la membrana de sílica incluida en la columna. Este paso de unión a la membrana es reversible y específico para ácidos nucleicos.

El ARN *carrier* incluido en el buffer de lisis mejora la unión y el rendimiento en muestras diluidas o con baja concentración de virus ARN. Los contaminantes presentes en la muestra (sales, metabolitos, componentes celulares solubles) son eliminados mediante sucesivos lavados de la membrana con los BUFFERS BAW y BAV3. La membrana de sílica se seca para eliminar restos de etanol y el ARN es finalmente eluido en agua libre de nucleasa o en BUFFER BRE que contiene baja concentración de sales.

El kit también permite la extracción de ADN de origen viral. Los virus ADN son más difíciles de lisar y requieren digestión con proteinasa K (no incluida en el kit).

2. REACTIVOS INCLUIDOS EN EL KIT

La ausencia de ARNasas, así como el rendimiento y eficiencia del proceso de purificación han sido ensayados con RT-PCR. Los diferentes componentes del kit se detallan a continuación:

Speedtools RNA Virus Extraction kit			
	10 Preps Ref. 21.140M	50 Preps Ref. 21.141	250 Preps Ref. 21.142
BUFFER BAV1 Buffer de Lisis	10 mL	35 mL	5 x 35 mL
BUFFER BAW Buffer de lavado	6 mL	30 mL	5 x 30 mL
BUFFER BAV3 (concentrado) Buffer de lavado	6 mL	12 mL	5 x 12 mL
Agua Libre de RNasas	13 mL	13 mL	5 x 13 mL
BUFFER BRE Buffer de elución	13 mL	13 mL	5 x 13 mL
CARRIER RNA (liofilizado)	300 µg	1 mg	5 x 1 mg
RNA VIRUS COLUMNS	10	50	5 x 50
COLLECTION TUBES	30	150	5 x 150
PROSPECTO	1	1	5 x 1

3. USO PREVISTO

El kit **SPEEDTOOLS RNA VIRUS** esta diseñado para la extracción y purificación de ácido nucleico de origen viral a partir de **150 µL** de muestras de fluidos orgánicos libres de células como plasma, suero, orina, entre otros. Su uso, en principio, no está indicado para extracciones a partir de muestras sanguíneas; sin embargo puede realizarse realizando pequeñas modificaciones en el protocolo (ver Punto 4).

El ácido nucleico obtenido es adecuado para posteriores usos como secuenciación, RT-PCR, u otras determinaciones enzimáticas. El kit evita contaminaciones cruzadas entre muestras al ser un sistema de pasos cerrados.

El límite de detección de algunos virus depende del sistema de detección empleado (ej. *in-house nested* RT-PCR). Se recomienda utilizar estándares internos, controles positivos y negativos para monitorizar los procesos de purificación, amplificación y detección.

La inclusión de **Carrier RNA** en el buffer de lisis incrementa la unión de los ácidos nucleicos virales a la membrana y reduce los riesgos de degradación del ARN viral. Los ácidos nucleicos virales purificados con el SPEEDTOOLS RNA VIRUS no podrán ser cuantificados por espectrofotometría o fluorimetría ya que los eluatos de la columna contendrán una mezcla de ácidos nucleicos virales y ARN *carrier*; para su cuantificación deberán utilizarse otros métodos como PCR o RT-PCR cuantitativas.

Características Generales del Kit	
Material de partida	hasta 150 µL*
Rendimiento Medio	> 90%
Límite de Análisis	30-60 copias/ mL**
Volumen de Elución	50 µL
Capacidad de Unión	40 µg
Tiempo / Preparación	30 min / 4-6 preps.
Formato de columna	mini

*suero, plasma, otros fluidos biológicos libres de células

** Nested PCR

4. CALIDAD Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Muestras líquidas

Fluidos biológicos o muestras semi-fluidas pueden ser procesadas con el kit (ej. suero, orina, lavado bronco-alveolar). Para una purificación exitosa es importante que la muestra de partida, a incluir en la RNA Binding Column, sea homogénea, límpida y no viscosa; corroborar la ausencia de precipitados en las muestras (en particular las muestras congeladas o almacenadas durante mucho tiempo). En caso de que los precipitados se mantengan después de la lisis con el Buffer BAV1, eliminarlos por centrifugación.

Debido a que los virus presentes en la muestra pueden encontrarse asociados con partículas o agregados, no se recomienda eliminar las partículas o agregados antes de la lisis.

En caso necesario la incubación con el Buffer de lisis BAV1 se puede prolongar a fin de disolver y digerir estructuras celulares residuales, precipitados, y/o partículas virales. Sin embargo, no es conveniente prolongar la incubación excesivamente ya que el ARN es sensible y puede degradarse aminorando el rendimiento de la extracción.

Muestras sólidas (ej. tejidos, muestras de heces)

Preparar una solución 10 % (w/v) de la muestra sólida en un buffer idóneo (ej. PBS) utilizando un homogeneizador comercial. Centrifugar la mezcla a fin de eliminar restos celulares y utilizar el sobrenadante límpido para continuar con el protocolo.

Muestras en torundas

Incubar las torundas en un buffer idóneo (ej. PBS), o en medio de cultivo durante 30 min. Continuar el protocolo de extracción con el buffer o medio libre de partículas.

Muestras de sangre

La extracción de ARN/ADN viral a partir de sangre sólo es posible si se utiliza sangre diluida con Buffer PBS. Las muestras de sangre sin diluir pueden taponar la membrana de sílica de las RNA Virus Binding Column. La cantidad de PBS a utilizar deberá ser optimizada para cada protocolo; se recomienda una proporción de 50 µL de sangre con 50 µL de buffer PBS como punto de partida para la optimización.

Tratamiento con Proteinasa K

El tratamiento con Proteinasa K (no proporcionada con el kit) es necesario para la extracción simultánea de ARN/ADN viral así como para la extracción de ADN viral.

Si bien para la extracción de ARN viral no se requiere tratamiento con Proteinasa K, es altamente recomendable cuando la extracción se realiza a partir de muestras viscosas (ej. esputo).

Lisis de muestra

Para la extracción de *ARN viral la fase de lisis convencional* se realiza con el Buffer BAV1 incubando a **temperatura ambiente** (20–25 °C) durante **10 min**.

Para extracción de ARN viral a partir de *muestras viscosas* como esputo, sobrenadante de cultivos en suspensión, o muestras de heces, se recomienda lisar a **70 °C**.

Para la *extracción simultánea de ARN y ADN viral*, incubar con el Buffer BAV1 durante **5-15 min** a una **temperatura variable** en función de la muestra de origen: temperatura ambiente, 56 °C, ó 70 °C. La temperatura óptima para la lisis deberá ser optimizada experimentalmente para cada muestra particular.

5. FASE DE ELUCIÓN

- Para la elución final de los ácidos nucleicos utilizar soluciones de baja fuerza iónica como agua libre de RNasas (**pH 7-8**) o BUFFER BRE ligeramente alcalino (Tris-HCl 5mM, pH 8.5).
- Si la elución se realiza en un **único paso** (ya sea con agua o Buffer BRE), se recupera alrededor de un **80%** de los ácidos nucleicos unidos a la membrana de sílica; a fin de incrementar la eficiencia del proceso se puede **reutilizar el eluato obtenido en un segundo paso de elución**, incrementándose tanto el rendimiento como la concentración de ácidos nucleicos. Alternativamente, el segundo paso de elución puede realizarse utilizando un volumen adicional de agua libre de RNasas o de Buffer BRE; en este caso el rendimiento de la elución será mayor aunque la concentración de ácidos nucleicos una vez combinados los eluatos será menor.
- Para la **elución de ARN** se recomienda utilizar **agua libre de RNasas**, en tanto que para la elución del **ADN** se recomienda el **BUFFER BRE** de elución que proporciona mejores condiciones de almacenamiento para el ADN. Para eluir **ambos ácidos nucleicos** conjuntamente, utilizar **agua libre de RNasas** (pH 6-8) precalentada a **70°C**.

6. PREPARACIÓN DE REACTIVOS E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

NOTA: Los tampones BAV1 y BAW contienen sales de guanidina, utilice guantes y gafas de protección durante su manipulación.

- Los reactivos incluidos en el kit pueden almacenarse a temperatura ambiente (18-25°C) hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta exterior.
- El ARN *carrier* posee una vida media limitada en el Buffer BAV1.

El ARN carrier liofilizado provisto con el kit puede ser difícil de visualizar en el vial.

Antes de comenzar cualquier ensayo con **SPEEDTOOLS RNA VIRUS EXTRACTION KIT** prepare los siguientes reactivos:

I. ARN carrier:

- ✓ **Formato 10 preps:** Añada **1 mL de Buffer BAV1 al bote de ARN carrier** (liofilizado). Disuelva el contenido del bote de ARN *carrier* y transfiera el contenido al bote de Buffer BAV1.
- ✓ **Formato 50 preps:** Añada **1 mL de Buffer BAV1 al bote de ARN carrier** (liofilizado). Disuelva el contenido del bote de ARN *carrier* y transfiera el contenido al bote de Buffer BAV1.

El Buffer BAV1 con ARN carrier puede almacenarse a temperatura ambiente durante 1-2 semanas de esta forma se evita la precipitación de sales y el precalentamiento del buffer repetidas veces. También se puede almacenar a 4°C durante 4 semanas, o dispensar en alícuotas y almacenar a -20°C por períodos más prolongados. Si se conserva a 4°C o a temperaturas inferiores las sales del buffer pueden precipitar, para disolverlas incube el buffer a 40-60°C durante ≤ 5 min.

NOTA: No calentar el Buffer BAV1 con ARN *carrier* más de 4 veces. La degradación del ARN *carrier* se acelerará si se calienta frecuentemente, se incuba a temperaturas >80°C, o se prolonga el tiempo de incubación. La degradación del ARN *carrier* reduce el rendimiento de la extracción y puede producir falsos negativos en la RT-PCR, en particular si se trabaja con muestras con una baja carga viral.

II. Buffer BAV3:

- ✓ **Formato 10 preps:** Añada **24 mL de Etanol Molecular Grade** (96-100%) al buffer BAV3 (concentrado). Marcar el recipiente para indicar que el etanol ha sido añadido.
- ✓ **Formato 50 preps:** Añada **48 mL de Etanol Molecular Grade** (96-100%) al buffer BAV3 (concentrado). Marcar el recipiente para indicar que el etanol ha sido añadido.





El buffer de lavado diluido es estable a temperatura ambiente (18-25°C) durante un período máximo de 12 meses.


7. INSTRUCCIONES DE USO

A. Extracción de ARN viral a partir de fluidos biológicos libres de células

Antes de comenzar la preparación:

- Corroborar que el Buffer BAV1 y el Buffer BAV3 han sido preparados según Sección 6.
- Precalear una alícuota de Agua libre de RNAsas a 70°C.
- Preparar un incubador o baño de agua a 70°C.

PASO	DESCRIPCIÓN		
1	<p>LISIS DE LA MUESTRA</p> <p>Añada en un microtubo de 150 µL de muestra y 600 µL de BUFFER BAV1 (con ARN <i>carrier</i>). Pipetee la mezcla arriba y abajo para mezclarla bien y utilice el vortex. Incube el lisado 5 min a 70°C.</p> <p><i>La temperatura y el tiempo de incubación son factores críticos para la lisis y para la estabilidad del ARN (Sección 4).</i></p> <p><i>Si al finalizar el proceso el lisado permanece turbio, centrifugue 1 min a 11,000 x g, recoja el sobrenadante y proceda con el paso 2.</i></p>		<p>150 µL MUESTRA + 600 µL BUFFER BAV1</p> <p>vortex 70°C 5 min</p>
2	<p>ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES PARA LA UNIÓN DEL ÁCIDO NUCLEICO A LA COLUMNA</p> <p>Añada 600 µL Etanol Molecular Grade (96-100%) al lisado y mezclar bien utilizando el vortex (10-15 sec).</p>		<p>+ 600 µL ETANOL MOLECULAR GRADE vortex</p>
3	<p>UNIÓN DEL ARN VIRAL</p> <p>Coloque la Virus Binding Column en un Collection tube y cargue 700 µL del lisado. Centrifugue 1 min a 8,000 × g.</p> <p><i>Si se trabaja con material infeccioso se recomienda el uso de microtubos de centrifuga nuevos.</i></p> <p>Cargar nuevamente la columna con el resto del lisado. Centrifugue 1 min a 8,000 × g. Descarte el filtrado y coloque la columna nuevamente en el Collection tube. No se recomienda realizar más de dos pasos de carga del lisado.</p>		<p>Cargue el lisado en dos pasos en la columna</p> <p><i>1 min, 8,000 × g</i></p>
4	<p>LAVADO Y SECADO DE LA MEMBRANA DE SÍLICA</p> <p>1^{er} Lavado Añadir 500 µL Buffer BAW a la columna. Centrifugue 1 min a 8,000 x g. Deseche el filtrado y coloque la columna en un nuevo Collection tube.</p> <p>2^{do} Lavado Añadir 600 µL Buffer BAV3 a la columna. Centrifugue 1 min a 8,000 x g. Deseche el filtrado y coloque la columna en un nuevo Collection tube.</p> <p>3^{er} Lavado Añadir 200 µL Buffer BAV3. Centrifugue 2-5 min a 11,000 x g para eliminar el etanol residual del Buffer BAV3. Deseche el filtrado.</p> <p>Los pasos de lavado eliminan contaminantes e inhibidores.</p> <p>Opcional: Restos del Buffer BAV3 pueden inhibir reacciones posteriores. Si estas reacciones son muy sensibles al etanol, centrifugue utilizando un microtubo nuevo o bien incube la columna a 70°C por 1 min a fin de evaporar los restos de etanol.</p>		<p>+ 500 µL BUFFER BAW <i>1 min, 8,000 × g</i></p> <p>+ 600 µL BUFFER BAV3 <i>1 min, 8,000 × g</i></p> <p>+ 200 µL BUFFER BAV3 <i>5 min, 11,000 × g</i></p>


5	<p>ELUCION DE ARN VIRAL</p> <p>Coloque la columna en un microtubo nuevo de 1.5 ml y añada 50 µL de agua libre de RNasa previamente calentada a 70°C. Dispense el buffer directamente en la membrana de sílica.</p> <p>Incube a temperature ambiente 1-2 min. Centrifugue 1 min a 11,000 x g. El eluido contiene el ARN puro.</p> <p>Para protocolos de elución alternativos véase la Sección 5.</p>		<p>+</p> <p>50 µL H₂O libre de RNasa (70°C)</p> <p>Incubar 2 min</p> <p><i>1 min, 11,000 x g</i></p>
---	--	---	--

B. Extracción de ARN y ADN virales a partir de fluidos biológicos libres de células

Este protocolo está recomendado para la purificación de ARN y ADN viral en muestras pequeñas (< 150 µl) para toda clase de virus ADN (ej. HBV y CMV). Para este protocolo de extracción se requiere Proteinasa K (no proporcionada con el kit).

Antes de comenzar la preparación:

- Corroborar que el Buffer BAV1 y el Buffer BAV3 han sido preparados según Sección 6.
- Corroborar la disponibilidad de Proteinasa K
- Precalear una alícuota de Agua libre de nucleasas a 70°C.
- Preparar un incubador o baño de agua a 70°C

PASO	DESCRIPCIÓN		
1	<p>LISIS DE LA MUESTRA</p> <p>Añada en un microtubo 150 µL de la muestra y 600 µL BUFFER BAV1 (con ARN <i>carrier</i>).</p> <p>Añada 20 µL Proteinase K (20 mg/ml) a la mezcla lisis. Pipetee la mezcla arriba y abajo para mezclarla bien y mezcle con vortex durante 10-15 seg. Incube 5 min a 70°C.</p> <p><i>La temperatura y el tiempo de incubación son factores críticos para la lisis y para la estabilidad del ARN (véase la sección resolución de problemas).</i></p> <p><i>Si al finalizar el proceso el lisado permanece turbio, centrifugue 1 min a 11,000 x g, recoja el sobrenadante para continuar el protocolo.</i></p>		<p>150 µL MUESTRA</p> <p>+</p> <p>600 µL BUFFER BAV1</p> <p>+</p> <p>20 µL PROTEINASE K</p> <p>vortex 70°C 5 min</p>
2	Continuar a partir del Paso 2 del Protocolo A.		

8. RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Problema	Posible causa y sugerencias
El eluido contiene concentraciones muy bajas (o nada) de ácidos nucleicos virales	<p>Problema con el ARN carrier</p> <p>El ARN <i>carrier</i> no ha sido añadido.</p> <ul style="list-style-type: none"> Véase las condiciones de almacenamiento del buffer BAV1 con ARN <i>carrier</i> (Sección 6). <p>Puede que sea necesario digerir la muestra con Proteinase K</p> <ul style="list-style-type: none"> Compare los protocolos con y sin digestión con Proteinase, también puede probar prolongando el periodo de incubación a 10 min. <p>Los ácidos nucleicos virales han sido degradados</p> <ul style="list-style-type: none"> Las muestras deben procesarse inmediatamente tras su recogida. En caso necesario añada a la muestra inhibidores de RNasas. Asegúrese que las condiciones de almacenamiento de la muestra son apropiadas. Revise que todos los buffers hayan sido preparados y almacenados correctamente. Si tiene duda, use nuevas alícuotas de Buffer BAV1, ARN <i>carrier</i> y Buffer de Elución BRE (Sección 6).
Los ácidos nucleicos obtenidos presentan problemas de uso en posteriores procesos	<p>Sensibilidad baja</p> <ul style="list-style-type: none"> Incrementar el volumen de eluido a añadir a PCR/RT-PCR. La temperatura y el tiempo de incubación son factores críticos para la lisis y para la estabilidad del ARN. Para preparaciones de ARN extremadamente sensible a la degradación, incubar la muestra a temperatura ambiente. Para la extracción simultánea de ARN y ADN viral, incubar durante 5-15 min a una temperatura variable (RT/ 56°C/ 72°C) a fin de obtener el máximo rendimiento para ambas especies. <p>Presencia de etanol</p> <ul style="list-style-type: none"> Prolongue los pasos de centrifugación para eliminar completamente el Buffer BAV3.
Problemas Generales	<p>La membrana se ha obturado</p> <ul style="list-style-type: none"> Antes de la adición de etanol molecular grade a la muestra centrifugue el lisado y cargue el sobrenadante en la RNA Virus Binding Column.

9. INFORMACIÓN SOBRE PEDIDOS

SPEEDTOOLS KIT	10 PREPS	50 PREPS	250 PREPS
SPEEDTOOLS DNA EXTRACTION KIT	Ref. 21.130M	Ref. 21.131	Ref. 21.132
SPEEDTOOLS TISSUE DNA EXTRACTION KIT	Ref. 21.135M	Ref. 21.136	Ref. 21.137
SPEEDTOOLS RNA VIRUS EXTRACTION KIT	Ref. 21.140M	Ref. 21.141	Ref. 21.142
SPEEDTOOLS FOOD DNA EXTRACTION KIT	Ref. 21.175M	Ref. 21.176	Ref. 21.177
SPEEDTOOLS PLANT DNA EXTRACTION KIT	Ref. 21.170M	Ref. 21.171	Ref. 21.172
SPEEDTOOLS TOTAL RNA EXTRACTION KIT	Ref. 21.210M	Ref. 21.211	Ref. 21.212
SPEEDTOOLS PCR CLEAN-UP KIT	Ref. 21.200M	Ref. 21.201	Ref. 21.202
SPEEDTOOLS PLASMID DNA PURIFICATION KIT	Ref. 21.220M	Ref. 21.221	Ref. 21.222

10. LIMITACIONES Y GARANTÍA

1. Producto para uso exclusivo en investigación en análisis *in vitro*.
2. El kit no ha sido diseñado para identificar un determinado microorganismo o para uso clínico (diagnóstico, terapia u otros usos no específicamente contemplados).
3. Es responsabilidad del usuario verificar la validez de uso del kit para una aplicación específica, pues el kit no ha sido validado para un determinado microorganismo o tipo de células.
4. La documentación incluida en el kit especifica su uso, deben seguirse fielmente las instrucciones con el fin de obtener ácidos nucleicos viral de alta calidad.
5. BIOTOOLS garantiza la conformidad del kit con las especificaciones del producto.
6. La obligación de BIOTOOLS y los derechos del comprador bajo esta garantía están limitados: bien al reemplazo por parte de BIOTOOLS de cualquier producto que sea deficiente en fabricación, y que deberá ser retornado a BIOTOOLS (portes pagados), o a opción de BIOTOOLS, devolución del precio de adquisición.
7. BIOTOOLS no se responsabilizará de daños o defectos debidos al transporte. Las reclamaciones por mercancía dañada han de dirigirse al transportista. El seguro de transporte de mercancías es responsabilidad del cliente.
8. BIOTOOLS no tendrá responsabilidad sobre ningún daño directo, indirecto, consecuencia o incidental resultante del uso, mal uso, resultado del uso o de la incapacidad de uso del kit. Tampoco se responsabiliza de los defectos en productos o componentes no manufacturados por BIOTOOLS, o daños consecuencia de esos productos o componentes exógenos a BIOTOOLS.
9. Ninguna otra garantía de ningún tipo, directa o indirecta, expresa o implícita, incluyendo sin limitación, garantías implícitas de capacidad de comercialización, o adecuación para un propósito determinado, son dadas por BIOTOOLS.
10. La garantía de este boletín, así como las especificaciones y descripciones de este kit que aparecen en el catálogo son los únicos documentos válidos de la garantía del producto. Comunicados escritos u orales por los comerciales, distribuidores o técnicos de BIOTOOLS, excepto declaraciones escritas firmadas por un directivo autorizado de BIOTOOLS, carecen de valor y no forman parte de la garantía del contrato de venta.
11. Las indicaciones/aplicaciones del producto están sujetas a cambios por lo cual se recomienda contactar con nuestro servicio técnico para obtener información actualizada de los productos de BIOTOOLS. También puede contactar su comercial o distribuidor local para una información general.
12. Las aplicaciones mencionadas en el boletín o demás documentos de BIOTOOLS tienen un carácter meramente informativo. BIOTOOLS no garantizan que todas las aplicaciones hayan sido testadas en sus laboratorios. Para más información contacte nuestro Departamento Técnico (technicalsupport@biotools.eu).

Fabricado por:

BIOTOOLS, Biotechnological & Medical Laboratories, S.A. han sido evaluados y certificados en cuanto al cumplimiento de los requisitos de ISO 9001 para las siguientes actividades: investigación y desarrollo de productos de biotecnología, fabricación de productos de biotecnología y fabricación de productos para diagnóstico *in vitro* (IVDs). Valle de Tobalina – 52 – Nave 39, 28021 Madrid – Spain

© 2008 BIOTOOLS, Biotechnological & Medical Laboratories, S.A. Todos los derechos reservados.