

REAL SPIN VIRAL DNA/RNA

Ref. **RBMEGS07:** (para **100 EXTRACCIONES**)(for **100 EXTRACTION**)

1.INTRODUCCIÓN

REALPURE Spin Viral DNA/RNA Kit está designado para una rápida purificación simultánea de ADN y ARN viral a partir de muestras libres de células, como suero, plasma y fluido cerebroespinal.

Los virus cuando son lisados con un detergente y proteinasa K, liberan los ácidos nucleicos virales. Luego, en presencia de sales caotrópicas, los ácidos nucleicos virales se unen selectivamente a una membrana de sílica en una spin column. Los ácidos nucleicos permanecen unidos mientras que una serie de lavados y pasos de centrifugación eliminarán los componentes celulares contaminantes. Finalmente, con un tampón de elución los ácidos nucleicos virales serán eluidos de la membrana. Este proceso no requiere precipitaciones alcohólicas, extracciones con disolventes orgánicos, o extensivos manejos de ácidos nucleicos.

El REALPURE Spin Viral DNA/RNA Kit puede ser utilizado para la extracción de ADN y ARN viral a partir de un amplio rango de virus de ADN y ARN. No obstante, el éxito no se puede garantizar para todas las especies de virus y deberá ser validada por el usuario.

1.INTRODUCTION

REALPURE Spin Viral DNA/RNA Kit is designed for rapid simultaneous purification of viral DNA and RNA from cell-free samples such as serum, plasma and cerebrospinal fluid.

Viruses when lysed with a detergent and proteinase K, release viral nucleic acids. Then, in the presence of chaotropic salts, the viral nucleic acids selectively bind to a silica membrane on a spin column. The nucleic acids remain bound while a series of washes and centrifugation steps will remove contaminating cellular components. Finally, with an elution buffer the viral nucleic acids will be eluted from the membrane. This process does not require alcohol precipitation, organic solvent extractions, or extensive nucleic acid handling.

The REALPURE Spin Viral DNA/RNA Kit can be used for the extraction of viral DNA and RNA from a wide range of DNA and RNA viruses. However, success cannot be guaranteed for all virus species and must be validated by the user.

2.COMPONENTES DEL KIT / KIT COMPONENTS

Componentes/ <i>Components</i>	REF.	Ref. RBMEGS07 (100 Extrac.)	T ^a
Tampón de Lisis Viral/ <i>Viral Lysis Buffer</i>	REA01V	25 ml	RT
Tampón de Lavado Viral 1*/ <i>Viral Wash Buffer 1*</i>	REA03V	36 ml	RT
Tampón de Lavado Viral 2*/ <i>Viral Wash Buffer 2*</i>	REA04V	20 ml	RT
Tampón de Elución / <i>Elution Buffer</i>	REA05	15 ml	RT
Proteinasa K/ <i>Proteinase K</i>	REA02	105 mg	- 20° C
RNA Carrier *	REA11	1 mg	- 20° C
Viral Spin Columns / <i>Viral Spin Columns</i>	RSCV01	100 unid	RT
Tubos de Recogida / <i>Collection Tubes</i>	R30	200 unid	RT

* Ver en el apartado de preparaciones preliminares como preparar estas soluciones. / See the section on preliminary preparations on how to prepare these solutions.

Equipos y reactivos necesarios y no provistos

- * Etanol 100%.
- * Microtubos de 1.5 ml.
- * Microcentrifuga o centrífuga clínica.

Equipment and reagents needed and not provided

- * 100% ethanol.
- * Microtubes of 1.5 ml.
- * Microcentrifuge or clinical centrifuge

3.PROTOCOLO GENERAL

3. GENERAL PROCEDURE

3.1 Consideraciones preliminares

El tampón de Lisis Viral (REA01V) y el Tampón de Lavado Viral 1 (REA03V) contienen guanidine hydrochloride, el cual puede formar componentes reactivos cuando se combinan con lejía. Ambos tampones son agentes irritantes, por esta razón recomendamos el uso de guantes y gafas para su manipulación. En caso de contacto con la piel o ojos, lavar con abundante agua.

3.2 Preparaciones preliminares

- Disolver la proteinasa K en **5.2 ml** de agua libre de nucleasas y conservar a -20°C . Se recomienda realizar varias alícuotas para evitar demasiados ciclos de descongelado-congelado. A esta temperatura es estable durante 1 año.
- Añadir **20 ml** Ethanol 100 % al Viral Wash Buffer 1 (REA03V). Mantener el envase bien cerrado para evitar la evaporación del etanol.
- Añadir **80 ml** Ethanol 100 % al Viral Wash Buffer 2 (REA04V). Mantener el envase bien cerrado para evitar la evaporación del etanol.
- **Carrier RNA: El protocolo de purificación recomendado utiliza 5.6 µg carrier RNA por muestra.** Si usted desea utilizar menos carrier RNA por muestra, es necesario validar la cantidad de carrier RNA necesario para cada tipo de muestra y aplicaciones posteriores.
- Los eluidos que se obtienen con este kit contienen tanto ácidos nucleicos virales como carrier RNA, **y las cantidades de carrier RNA pueden exceder las cantidades de ácidos nucleicos virales.** Los cálculos de cuanta cantidad de eluido deberá ser añadido a las aplicaciones posteriores deberá basarse en las cantidades de carrier RNA añadido. Para obtener niveles altos de sensibilidad en reacciones de amplificación, puede ser necesario ajustar la cantidad de carrier RNA añadida al Viral Lysis Buffer.

➤ **Protocolo de preparación de Carrier RNA:**

1. Añadir 500 µl de Tampón de elución al microtubo que contiene el carrier RNA para obtener una solución stock
2. Mezclar y alícuotar en 25-50 µ, conservar a -20°C . Evitar repetidos ciclos de calentamiento-enfriamiento.
3. Calcular el volumen de la mezcla Viral Lysis Buffer/carrier RNA requerido para procesar todas las muestras a analizar simultáneamente. Por ejemplo, añadir 50µl de carrier a 2.5 ml de tampón de Lisis Viral
4. En un tubo estéril añadir el volumen de la solución stock al volumen de Viral Lysis Buffer requerido. Mezclar suavemente con pipeta.
5. Conservar a 4°C hasta su uso. **Utilizar este tampón así preparado antes de 1 hora**

3.1 Preliminary considerations

Viral Lysis Buffer (REA01V) and Viral Wash Buffer 1 (REA03V) contain guanidine hydrochloride, which can form reactive components when combined with bleach. Both buffers are irritants, for this reason we recommend the use of gloves and goggles for handling. In case of contact with skin or eyes, wash with plenty of water.

3.2 Preliminary preparations

- Dissolve Proteinase K in **5.2 ml** of nuclease-free water and store at -20°C . It is recommended to make several aliquots to avoid too many thaw-freeze cycles. At this temperature it is stable for 1 year.
- Add **20 ml** 100% ethanol to Viral Wash Buffer 1 (REA03V). Keep the container tightly closed to prevent evaporation of the ethanol.
- Add **80 ml** 100 % Ethanol to Viral Wash Buffer 2 (REA04V). Keep the container tightly closed to avoid evaporation of ethanol.
- **Carrier RNA: The recommended purification protocol uses 5.6 µg carrier RNA per sample.** If you wish to use less carrier RNA per sample, it is necessary to validate the amount of carrier RNA needed for each sample type and subsequent applications.
- The eluates obtained with this kit contain both viral nucleic acids and carrier RNA, **and the amounts of carrier RNA may exceed the amounts of viral nucleic acids.** Calculations of how much eluate should be added to subsequent applications should be based on the amounts of carrier RNA added. To obtain high levels of sensitivity in amplification reactions, it may be necessary to adjust the amount of carrier RNA added to the Viral Lysis Buffer.

➤ **Carrier RNA preparation protocol:**

- 1 Add 500 µl of Elution Buffer to the microtube containing the carrier RNA to obtain a stock solution
- 2 Mix and aliquot in 25-50 µ, store at -20°C . Avoid repeated heating-cooling cycles.
- 3 Calculate the volume of Viral Lysis Buffer/carrier RNA mixture required to process all samples to be analyzed simultaneously. For example, add 50µL of carrier to 2.5 ml of Viral Lysis Buffer.
- 4 In a sterile tube add the volume of stock solution to the volume of Viral Lysis Buffer required. Mix gently with a pipette.
- 5 Store at 4°C until use. **Use this buffer thus prepared within 1 hour.**

3.3 Protocolo para la extracción de ADN y ARN viral a partir de suero, plasma y fluidos biológicos

1. Pipetear **50 µl Proteinasa K** en un microtubo de centrifuga estéril.
2. **Añadir 200 µl de plasma o suero** en el microtubo. Si usted procesa muestras menores de 200 µl, ajustar el volumen final a 200 µl utilizando PBS o 0.9% NaCl.
3. **Añadir 200 µl de Tampón de Lisis Viral (conteniendo el carrier RNA)**. Cerrar el microtubo y vortex vigorosamente durante 20 segundos.
4. **Incubar a 70°C durante 10 minutos.**
5. **Centrifugar brevemente el microtubo para recoger las gotas de la tapa.**
6. **Añadir 250 µl etanol 100% a la muestra.** Agitar mediante vortex durante 15 segundos.
7. **Añadir el lisado a la Viral Spin Column** con un tubo de recolección.
8. **Centrifugar la columna a 8.000-10.000 rpm durante 1 min.** Eliminar el tubo de recolección. Colocar la spin columna en un nuevo tubo de recolección.
9. **Lavar la columna con 500 µl de Tampón de Lavado Viral 1 con etanol.** Centrifugar la columna a 12.000 rpm durante 1 min.
10. **Lavar la columna con 500 µl de Tampón de Lavado Viral 2 con etanol.** Centrifugar la columna a 12.000 rpm durante 1 min.
11. **Volver a lavar la columna con 500 µl de Tampón de Lavado Viral 2 con etanol.** Centrifugar la columna a 14.000rpm durante 1 min.
12. **Centrifugar la spin columna a máxima velocidad durante 2 minutos** para eliminar el etanol residual.
13. **Eluir con 30-50 µl de Tampón de Elución añadiendo el agua libre de nucleasas al centro de la membrana de la columna.**
14. **Incubar a temperatura ambiente durante 2 minutos.**
15. **Centrifugar la spin columna a 10.000rpm durante 60 segundos.** Recoger los 30-50 µl y volver a depositar en el centro de la membrana. Esto hace aumentar el rendimiento.
16. 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 la PCR o RT-PCR.

3.3 Protocol for the extraction of viral DNA and RNA from serum, plasma and biological fluids

- 1 Pipette **50 µl Proteinase K** into a sterile centrifuge microtube.
- 2 **Add 200 µL of plasma or serum** into the microtube. If you process samples smaller than 200 µl, adjust the final volume to 200 µl using PBS or 0.9% NaCl.
- 3 **Add 200 µl of Viral Lysis Buffer (containing the RNA carrier)**. Close the microtube and vortex vigorously for 20 seconds.
- 4 **Incubate at 70°C for 10 minutes.**
- 5 **Briefly centrifuge the microtube to collect the droplets from the cap.**
- 6 **Add 250 µl 100% ethanol to the sample.** Vortex the sample for 15 seconds.
- 7 **Add the lysate to the Viral Spin Column** with a collection tube.
- 8 **Centrifuge the column at 8,000-10,000 rpm for 1 min.** Discard the collection tube. Place the spin column in a new collection tube.
- 9 **Wash the column with 500 µl of Viral Wash Buffer 1 with ethanol.** Centrifuge the column at 12,000 rpm for 1 min.
- 10 **Wash the column with 500 µl Viral Wash Buffer 2 with ethanol.** Centrifuge the column at 12,000 rpm for 1 min.
- 11 **Wash the column again with 500 µl of Viral Wash Buffer 2 with ethanol.** Centrifuge the column at 14,000rpm for 1 min.
- 12 **Centrifuge the spin column at maximum speed for 2 min to remove residual ethanol.**
- 13 **Elute with 30-50 µl of Elution Buffer by adding the nuclease-free water to the center of the column membrane.**
- 14 **Incubate at room temperature for 2 minutes.**
- 15 **Centrifuge the spin column at 10,000rpm for 60 seconds.** Collect the 30-50 µl and redeposit in the center of the membrane. This increases the yield.
- 16 Incubate for 2 minutes and centrifuge at maximum speed. If problems are observed in subsequent detections, the volume of eluate added to the PCR or RT-PCR can be changed.

4. ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD /

- Todos los componentes son estables durante 12 meses desde la fecha de la compra siendo almacenados como se indica.

ATENCIÓN: El Tampón de Lisis/Unión y el Tampón de Desinhibición contiene guanidine hydrochloride que es irritante, utilizar guantes y gafas.

STORAGE AND STABILITY

- All components are stable for 12 months from date of purchase when stored as directed.








CAUTION: Lysis/Union Buffer and Disinhibition Buffer contain guanidine hydrochloride which is irritating, use gloves and goggles.

5. GUIA DE PROBLEMAS Y POSIBLES SOLUCIONES / TROUBLESHOOTING

Para cualquier duda o consulta adicional sobre el protocolo pónganse en contacto con el servicio técnico de DURVIZ s.l en durviz@durviz.com.

For any further questions or doubts about the protocol, please contact DURVIZ s.l. technical service at durviz@durviz.com.

6.SIMBOLOS / SYMBOLS

	Número de catálogo / <i>Catalogue number</i>
	Limitación de temperatura / <i>Temperature limitation</i>
	Fecha de caducidad / <i>Expiration date</i>
	Lote / <i>Lot</i>
	Contiene suficiente para n pruebas / <i>Contains enough for n tests</i>
	Fabricante / <i>Manufacturer</i>
	Uso exclusivo en investigación / <i>Research use only</i>



B65699985