

REAL SPIN VIRAL RNA KIT

Ref. RBMER19: (para 100 EXTRACCIONES)

(for 100 EXTRACTION)

1.INTRODUCCIÓN

REAL 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 REAL 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.**

1.INTRODUCTION

REAL Spin Viral RNA Kit is designed for rapid purification of viral RNA from cell-free samples such as serum, plasma and other biological fluids.

The sample is first lysed in the presence of chaotropic salts that inactivate RNases ensuring extraction of intact viral RNA and allow selective binding to a glass fiber membrane located on a spin column. The viral RNAs remain bound while a series of washes and centrifugation steps will remove contaminating cellular components. Finally, with an elution buffer or nuclease-free water the viral RNAs will be eluted from the membrane. This process does not require alcohol precipitation, organic solvent extractions, or extensive nucleic acid handling.

The REAL Spin Viral RNA Kit can be used for the extraction of viral RNA from a wide range of 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/ Components	REF.	Ref. RBMER19 (100 Extrac.)	Tª
Tampón Lisis Viral/ Viral Lysis Buffer/		45 ml	RT
Tampón de Precipitación Proteínas/ Precipitation Buffer Proteins *		4 ml	RT
Tampón de Lavado 1 / Wash Buffer 1		10 ml	RT
Tampón de Lavado 2 / Wash Buffer 2		20 ml	RT
Agua Libre Nucleasa / Nuclease Free Water		8 ml	RT
Spin Columnas RNA/ RNA Spin Columns		100 unid	RT
Tubos de recogida / Collection Tubes		200 unid	RT

(*) Estas soluciones deben prepararse como se indica en la sección Preparaciones preliminares del protocolo.

(*) These solutions must be prepared as indicated in the Preliminary Preparations section of the protocol.

Equipos y reactivos necesarios y no provistos

- * Etanol 100 %.
- * Microcentrifuga.
- * Microtubos de 1.5 ml y 2.0 ml.

Equipment and reagents needed and not provided

- * Ethanol 100%
- * Microcentrifuge
- * 1.5 ml and 2.0 ml microtubes

3.1 Preparaciones preliminares

- **El Tampón de Lisis, Tampón Unión microRNA 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 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 µl de PBS utilizando un homogenizador eléctrico de mano o sistemas de homogenización basados en bolas. Centrifugar la muestra y utilizar 200 µl 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 µl 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 µl 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 µl 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.

3.1 Preliminary Preparations

- **Lysis Buffer, microRNA Binding Buffer and Wash Buffer 1** contain **thiocyanate guanidinium** which is an irritant agent, for this reason, we recommend the use of goggles and gloves for handling.
- **Add 80 ml of 100% Ethanol Virus Wash Buffer 2***. Keep the container tightly closed to avoid evaporation of the ethanol.

3.2 General recommendations

Types of samples

- Plasma/serum: Avoid working with samples where hemolysis is observed. After obtaining plasma or serum, it is important to centrifuge the sample to obtain a cell-free starting material.
- For solid samples such as tissue (5-10 mg) it can be homogenized in 300-400 µl of PBS using a hand-held electric homogenizer or bead-based homogenization systems. Centrifuge the sample and use 200 µl of the clear, particle-free supernatant.
- For stool prepare a suspension with PBS, 10% (w/v) and use the best system to lyse all viral particles. Centrifuge the sample and use 200 µl of the clear particle-free supernatant.
- Swabs: Incubate the swab in an appropriate amount of buffer (e.g. PBS) or cell-free medium for 30 minutes with motion. Remove swab and proceed with 200 µl of the clear particle-free supernatant.
- Transport Medium/Viral Transport Medium: Vortex the tubes containing the swab at maximum speed for 1 minute. Use 200 µl as the input sample.

In tissues and feces it should be considered that other RNA can be copurified which may inhibit the following PCR assays.

3.3 Protocol for the extraction of viral RNA from cell-free biological fluids

1. **Add 200 µL of sample** to a microtube. If you process < 200 µl samples adjust the final volume to 200 µl using PBS.
2. **Add 400 µl Viral Lysis Buffer**. Close the microtube and vortex vigorously for 20 seconds.
3. **Incubate at room temperature for 10-15 minutes**.

Incubation time and temperature is critical for lysis as well as for RNA stability. Incubation at room temperature is usually sufficient without significant loss of sensitivity. It is recommended to optimize these points for the type of sample to be used. Protocols with and without the use of proteinase K as well as different incubation times and temperatures can be compared.

If the sample is very viscous (sputum) the use of proteinaseK or an incubation at 70°C is recommended.

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 si se procesan muestras a partir de Medios de transporte viral como nuestro REALSALIVA/SWAB VIRAL Sample CollectionKit, eNAT, DNA/RNA Shield, 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 columna 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. Add **30 µl of Protein Precipitation Buffer**. Vortex 5 seconds. Incubate 1 minute at room temperature.
SKIP this step and go to step 5 if processing samples from Viral Transport Media such as our REALSALIVA/SWAB VIRAL Sample Collection Kit, eNAT, DNA/RNA Shield, etc.
5. Centrifuge for **2 minutes at 11,000 x g**.
6. **Transfer the supernatant**, avoiding touching the pellet that may form, to a new microtube.
7. Add **350 µl 100% ethanol**. Mix well.
8. Transfer half of the lysate to a **Spin RNA column** with its collection tube. **Centrifuge at 8,000 rpm for 30 seconds**.
9. **Transfer the other half and centrifuge at 8,000 rpm for 30 seconds**.
10. Add **100 µl Wash Buffer 1**. Centrifuge at 11,000 x g for 1 minute.
11. Add **700 µl Wash Buffer 2**. Centrifuge at 11,000 x g for 1 minute.
12. **Centrifuge 3 minutes at maximum speed** to remove all ethanol.
13. Elution with **50 µl Nuclease-free water**. 2 minutes incubation.
It is very important to add the nuclease-free water in the center of the membrane so that it is completely wetted.
14. **Centrifuge at 10,000 rpm for 60 seconds**. Collect the 50 µl and redeposit in the center of the membrane. This increases the yield.
15. **Incubate for 2 minutes and centrifuge at maximum speed**.
If problems are observed in subsequent detections, the volume of the eluate can be changed.
the volume of eluate added to the RT-PCR.

4. ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD /

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

STORAGE AND STABILITY








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

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>

