

Kit de extracción de RNA viral de muestras respiratorias

características

- Protocolo corto.
- El RNA purificado es adecuado PCR, rtPCR, LAMP, u alguna otra técnica de amplificación de ácidos nucleicos.

Descripción

El kit de extracción de ARN viral proporciona un método fácil y confiable para aislar el ARN viral total del plasma, suero, aspirados o lavados nasofaríngeos u orofaríngeos, hisopos nasofaríngeos u orofaríngeos, lavado broncoalveolar, aspirado traqueal y esputo. Este procedimiento ha sido probado para aislar ácidos nucleicos de hepatitis A, hepatitis C y VIH. El ARN aislado se puede utilizar para PCR, qRT-PCR y otras aplicaciones posteriores.

Componentes del kit de extracción de ARN viral

Se proporcionan todos los reactivos necesarios para el aislamiento de ARN viral. Contiene suficientes reactivos para aislar 50 muestras en volúmenes de 150 µl por muestra.

| Componente | Cantidad | Almacenamiento |
|--------------------------|----------|----------------------|
| Buffer LY | 30 mL | Temperatura ambiente |
| Solución L | 120 µl | Temperatura ambiente |
| Proteinasa K (20 mg/mL) | 1.1 mL | Temperatura ambiente |
| Buffer de lavado de RNA* | 12 mL | Temperatura ambiente |
| Buffer RB | 30 mL | Temperatura ambiente |
| Agua tratada con DEPC | 10 mL | Temperatura ambiente |
| Columnas | 50 | Temperatura ambiente |

Precaución: los buffers LY y RB contienen sales caotrópicas; use guantes y gafas protectoras cuando manipule estos componentes.

Antes del uso inicial

*Agregue 48 ml de etanol al 100 % al buffer de lavado de ARN antes de usar.

Almacenamiento y Estabilidad

Todos los demás componentes se pueden almacenar a temperatura ambiente. Todos los componentes del kit están garantizados por 1 año desde la fecha de compra.

Control de calidad

Cada componente ha sido analizado para verificar su pureza y funcionalidad.

Notas importantes

- Prepare todos los componentes y tenga listos todos los materiales necesarios examinando este manual de instrucciones y familiarícese con cada paso.
- Calcule el volumen necesario de buffer LY que se utilizará y transfírala a un tubo limpio. Agregue 1% en volumen de β -mercaptoetanol al buffer LY. Agregue 4 μ L de solución L por 1 mL de Buffer LY/ β -me. Mezclar bien.
- Prepare el tampón de lavado de ARN como se describe en la sección de componentes del kit.
- Realice todos los pasos, incluido el centrifugado a temperatura ambiente.

Recolección de sangre: el kit de extracción de ARN viral se ha optimizado para su uso con muestras recolectadas en tubos EDTA y tubos de ácido dextrosa ácida (ACD).

Material inicial: tanto el plasma fresco como el congelado se pueden utilizar con el protocolo de aislamiento de ARN viral. El plasma fresco, sin embargo, tiende a tener mayores rendimientos.

Materiales suministrados por el usuario

- Microcentrífuga de sobremesa.
- tubos libres de RNAsas de 1.5 ml.
- Etanol al 100%.

Aislamiento de ARN viral

El protocolo está desarrollado para muestras de 150 μ L. Las muestras pequeñas deben ajustarse a 150 μ l con solución salina tamponada con fosfato (PBS) antes de la carga, y las muestras con un título viral bajo deben concentrarse a 150 μ l antes del procesamiento. Para muestras de 150 a 300 μ L, la cantidad de tampón Buffer LY y otros reactivos debe ser aumentados proporcionalmente, pero las cantidades del buffer RB y de lavado de RNA, no.

1. Prepare un master mix de Buffer LY/ β -me/solución L como se describe en la página 3. La mezcla de Buffer LY/RNA es estable a 2-8 °C durante 48 horas.
2. Pipetee 150 μ L de plasma, suero u otro líquido corporal libre de células en un tubo de 1.5 mL y agregue 0,5 mL del master mix de buffer LY/ β -me/solución L.
3. Agregue 20 μ L de proteinasa K, mezcle bien mediante vortex e incube a 30 °C durante 20 min.

La proteinasa K es necesaria para extraer ARN de aspirados o lavados nasofaríngeos u orofaríngeos, Hisopos nasofaríngeos u orofaríngeos, lavado broncoalveolar, aspirados traqueales y esputo.

4. Agregue 1 volumen de etanol al 100 % al lisado y pipetee 5 veces para mezclar la solución.
5. Transfiera la solución a una columna de ARN y centrifugar a 12,000 rpm durante 1 min. Deseche el flujo de la columna y vuelva a colocar la columna en el tubo de recolección.
6. Añadir 500 µL de Buffer RB a la columna y centrifugar a 12.000 rpm durante 1 min. Deseche el flujo de la columna. Vuelva a colocar la columna en el tubo de recolección.
7. Agregue 500 µL de tampón de lavado de ARN a la columna y centrifugue a 12,000 rpm durante 30 segundos. Descartar el flujo de la columna. Vuelva a colocar la columna en el tubo de recolección.
8. Centrifugue la columna vacía a 12,000 rpm por 2 minutos.
este paso es necesario para remover el etanol residual para una elución óptima.
9. Coloque la columna en un tubo nuevo de 1,5 ml libre de RNAsas, agregue 35-50 µl de agua tratada con DEPC a la columna y centrifugue a 12,000 rpm durante 1 min. El ADN/ARN viral está en el líquido de flujo. Almacene el ADN/ARN purificado a -20 °C hasta su uso.
10. Opcional: agregue nuevamente agua tratada con DEPC a la columna y centrifugue nuevamente para una segunda elución.

Nota: La primera elución normalmente produce 60-70% del ADN/ARN mientras que la segunda elución produce otro 20-30% del ADN/ARN restante de la columna.