

K 150IR



## ADN/ARN PuriPrep-VIRUS kit

Extracción y purificación rápida  
de ADN/ARN a partir de hisopado  
nasofaríngeo/orofaríngeo, saliva, suero y  
plasma

USO EN INVESTIGACIÓN  
*IN VITRO*



# ADN PuriPrep-VIRUS kit

Versión: 1.1  
29/2/2024

## Índice

Presentación.....	6
Importante.....	6
Componentes del Kit .....	6
Condiciones de conservación.....	7
Garantía.....	7
Advertencias .....	7
Preparación de los reactivos .....	8
Protocolo a partir de muestras respiratorias (hisopado nasofaríngeo/ orofaríngeo) y saliva .....	9
Protocolo a partir de plasma y suero.....	11
Solución de inconvenientes .....	13

## PRESENTACIÓN

**Highway® ADN/ARN PuriPrep-VIRUS kit (K1501R)** permite la extracción y purificación rápida y sencilla de ácidos nucleicos virales, ADN y ARN, a partir de plasma, suero, hisopados nasofaríngeos/orofaríngeos y saliva.

El producto obtenido puede emplearse inmediatamente en PCR y qPCR, o ser conservado a -20°C por hasta 24 hs, o a -80°C.

Si se requiere un eluido libre de ADN, puede ser tratado con DNasa (libre de RNasas), que luego se inactiva con tratamiento térmico (10 minutos a 65°C).

## IMPORTANTE

Antes de dirigirse a la sección de Protocolo es importante leer las secciones Condiciones de Conservación, Garantía, Advertencias y Preparación de los reactivos.

## COMPONENTES DEL KIT

Se presenta en dos versiones: para 50 y 250 extracciones/purificaciones de ADN/ARN.

<b>Highway® ADN/ARN PuriPrep-VIRUS kit</b>		
Catálogo	K1501R-50	K1501R-250
Cantidad de muestras	50	250
Minicolumnas con tubos colectores	50	250
Buffer de binding (BB) conc., ml (B0700)	18	88
Buffer de activación (BA), ml (B0702)	18	90
Buffer de lavado (BLav) conc., ml (B0703)	11	49
Agua calidad tipo I pH: 8.0, ml (B0705)	6	27

# ADN/ARN PuriPrep-VIRUS kit

## Materiales que aportará el usuario:

Microcentrífuga con rotor para viales de 1,5 y 2 ml; micropipetas hasta 200 y 1000 µl; agitador tipo Vortex; microtubos de 1,5 o 2,0 ml; etanol (96-100%); PBS 1X estéril.

## CONDICIONES DE CONSERVACIÓN

Los buffers y componentes del kit se conservan a temperatura ambiente (15-30°C)

## GARANTÍA

**Highway® ADN/ARN PuriPrep-VIRUS kit (K1501R)** debe emplearse siguiendo las especificaciones indicadas en el manual de procedimientos provisto. El uso en aplicaciones no especificadas será responsabilidad del usuario, siendo recomendable la validación correspondiente. Cualquier falla que se produjera en el uso del kit, habiendo respetado los protocolos del fabricante, queda cubierta por la garantía de *Inbio Highway®*. En ese caso se reemplazará el kit por otro semejante. Por otra parte, el fabricante atenderá toda duda planteada por el usuario en el empleo del kit o interpretación del manual.

## ADVERTENCIAS

Algunos de los reactivos contienen sustancias caotrópicas y detergentes no iónicos. Se recomienda el uso de guantes de látex en el empleo de este kit, ya sea para evitar la contaminación de las muestras o para prevenir posibles irritaciones de la piel. No obstante, en caso de salpicaduras lavar con agua y jabón.

El ARN es muy sensible a RNasas presentes en la piel y en superficies del laboratorio, a fin de evitar la degradación de las muestras y la contaminación cruzada en el procesamiento de muestras múltiples, se recomienda:

a) Trabajar con guantes de látex y cambiárselos con frecuencia, especialmente si se produce contacto entre la muestra y los guantes, o luego de tocar superficies o elementos que no hayan sido previamente tratados para eliminar RNasas.

b) No tocar la membrana del fondo de la minicolumna con el tip cuando se agregan los reactivos. Cambiar de tip cada vez que se toquen las paredes de la minicolumna, cuando se dispensan los reactivos seriadamente en el procesamiento de varias muestras.

c) Asegurarse de emplear material plástico descartable libre de DNasas y RNasas. Usar tips con filtro.

d) Las centrifugaciones deben realizarse a temperatura ambiente (15-30°C) y los buffers de extracción y de lavados deben estar también a esa temperatura.

## PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

### 1. Buffer de activación (BA)

Se entrega **concentrado**. Conservar a temperatura ambiente (15-30°C). Si se observa un precipitado (antes del agregado de etanol), calentar la solución en un baño maría a 70°C hasta su completa disolución. Requiere la adición de etanol (96-100%) en las cantidades indicadas a continuación:

Tipo de kit	BA conc. (ml)	Etanol (ml)	Vol. final (ml)
K1501R-50	18	11	29
K1501R-250	90	55	145

Homogeneizar antes de usar.

### 2. Buffer de lavado (BLav)

Se entrega **concentrado**. Conservar a temperatura ambiente (15-30°C). Requiere la adición de etanol (96-100%) en las cantidades indicadas a continuación:

# ADN/ARN PuriPrep-VIRUS kit

Tipo de kit	BLav conc. (ml)	Etanol (ml)	Vol. final (ml)
K1501-50	11	44	55
K1501-250	49	196	245

Homogeneizar antes de usar.

**IMPORTANTE:** luego de agregar etanol a los buffers de Activación y Lavado, marcar una (X) en el casillero de la etiqueta, a la derecha del texto “**ADICIÓN DE ETANOL**”

## PROTOCOLO A PARTIR DE MUESTRAS RESPIRATORIAS (HISOPADO NASOFARÍNGEO/OROFARÍNGEO) Y SALIVA

### Acciones previas

- Si se observa un precipitado en el Buffer de Binding **BB** o en el Buffer de Activación **BA** (previo al agregado del etanol), calentar la solución en un baño maría a 70°C hasta su completa disolución.
- Controlar que los Buffers de Activación **BA** y de Lavado **BLav** hayan sido preparados como se indica en “**Preparación de los reactivos**”.

**Nota importante:** En caso de que la muestra sea de hisopados nasofaríngeos/orofaríngeos, se deben conservar en el mismo tubo para aumentar la carga vírica. Los hisopos se deberán sumergir en 2 ml de transporte para virus o 2 ml de solución salina de uso parenteral y deberán ser contenidos en un tubo plástico, estéril, con tapa a rosca y hermético.

En el caso de las muestras de saliva, se debe haber realizado un ayuno de por lo menos 3 horas, no haberse lavado los dientes y solo haber consumido agua (no bebidas de color). Para la recolección se debe relajar la musculatura de la boca y masajear el cuello para estimular las glándulas salivales. Juntar al menos 2 ml de saliva (cubrir la base del frasco estéril), no se debe escupir,

ni toser, ni forzar a que caiga. La saliva debería verse como un líquido viscoso, muy poco turbio e idealmente, no tendría que haber burbujas.

Si las muestras no son empleadas inmediatamente (recomendado), podrán ser conservadas en heladera por hasta 24 horas. Se puede congelar la muestra a  $-80^{\circ}\text{C}$ , pero considerar que existirá una pérdida de sensibilidad y en este caso se deberá transvasar la muestra a un envase apropiado para freezer.

## PROTOCOLO

**1.** Cortar la punta del hisopo con una tijera estéril y colocarla en un microtubo de 1,5 ml junto con 200  $\mu\text{l}$  de la solución en donde se encontraba sumergido el hisopo. Si el volumen de líquido fuese menor a 200  $\mu\text{l}$ , completar con PBS 1X estéril. El mismo volumen de muestra se emplea en caso de partir de saliva.

**Nota:** En el caso de hisopos secos, cortar la punta y colocarla en un microtubo de 1,5 ml junto a 200  $\mu\text{l}$  de PBS 1X estéril, vortexear durante varios segundos. Si el buffer de transporte excede el volumen indicado, emplear para el análisis 200  $\mu\text{l}$ , junto con la punta del hisopo.

**2.** Agregar 300  $\mu\text{l}$  de Buffer de Binding **BB**. Mezclar en vortex durante varios segundos.

**3.** Incubar 10 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar dar un pulso en microcentrífuga.

**4.** Agregar 500  $\mu\text{l}$  de etanol (96-100%). Mezclar en vortex y dar un pulso en microcentrífuga.

**5.** Transferir 500  $\mu\text{l}$  del contenido del microtubo a una minicolumna colocada sobre uno de los tubos colectores de 2 ml. Centrifugar a 8.000 g durante 1 minuto o hasta que haya escurrido todo el contenido. Descartar el filtrado, colocando nuevamente la minicolumna en el tubo colector. Repetir este paso con el resto del contenido del microtubo.



## ADN/ARN PurIPrep-VIRUS kit

6. Agregar 500 µl de Buffer de activación **BA**, cuidando que el tip no toque la membrana. Centrifugar a 8.000 g durante 1 minuto. Descartar el filtrado, colocando nuevamente la minicolumna en el tubo colector.
7. Agregar 450 µl de Buffer de lavado **BLav**. Centrifugar a 8.000 g durante 1 minuto. Descartar el filtrado, colocando nuevamente la minicolumna en el tubo colector.
8. Agregar otros 450 µl de Buffer de lavado **BLav**. Centrifugar a 8.000 g durante 1 minuto. Descartar el filtrado, colocando nuevamente la minicolumna en el tubo colector.
9. Centrifugar a máxima velocidad (aproximadamente 13.000 g) durante 3 minutos. Es muy importante eliminar todo vestigio de buffer de lavado de la minicolumna ya que puede resultar inhibitor en varias técnicas a realizar con el ADN/ARN final. Es recomendable repetir la centrifugación anterior.
10. Colocar la minicolumna en un microtubo de 1,5 ml rotulado. Dejar la minicolumna destapada durante 15 minutos para evaporar restos de etanol.
11. Descartar el tubo colector y colocar la minicolumna en un microtubo de 1,5 ml rotulado. Agregar 30 µl de **Agua calidad tipo I pH: 8**. Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos. Centrifugar a 13.000 g durante 1 minuto. Los ácidos nucleicos virales eluirán al microtubo. Conservar a - 80°C.

### Nota:

Puede eluirse con 50 µl de agua, pero disminuirá la concentración de ácidos nucleicos. Si se requiere un eluido libre de ADN, el producto obtenido puede ser tratado con DNasa (libre de RNasas), que luego se inactiva con tratamiento térmico (10 minutos a 65°C).

## PROTOCOLO A PARTIR DE MUESTRAS DE PLASMA Y SUERO

1. Rotular un microtubo de 1,5 ml y colocar 200 µl de muestra (en caso de muestras de menor volumen, completar con PBS 1X estéril, hasta alcanzar los 200 µl). Continuar con el protocolo indicado para muestras respiratorias, a partir del paso 2.

## SOLUCIÓN DE INCONVENIENTES

Inconveniente	Posible causa
<p>Bajo rendimiento en el ADN/ARN eluido</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Asegurarse de haber realizado una buena agitación luego del agregado del BB y de respetar el tiempo de incubación.</li> <li>• Revisar que se haya adicionado etanol, antes de transferir el contenido a la minicolumna.</li> <li>• Chequear el correcto agregado de etanol (96-100%) en los buffers de Activación y Lavado.</li> <li>• Revisar que el agua utilizada para eluir tenga un pH: 8,0.</li> <li>• No eluir con menos de 30 µl de agua.</li> <li>• Permitir que el agua de elución humecte la columna durante 5 minutos antes de centrifugar.</li> <li>• Recordar chequear que el buffer de Activación no se encuentre cristalizado (previo al agregado de etanol). Ver “Preparación de los reactivos, pág. 8.</li> </ul>
<p>Baja relación <math>A_{260}/A_{280}</math> en el eluido</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Asegurarse de haber realizado una buena agitación, luego del agregado del BB y de respetar el tiempo de incubación.</li> <li>• Revisar que se haya adicionado el etanol, antes de transferir el contenido a la minicolumna.</li> <li>• Chequear el correcto agregado de etanol (96-100%) en los buffers de Activación y Lavado.</li> <li>• Efectuar los lavados indicados.</li> </ul>

Inconveniente	Posible causa
Falla en reacciones enzimáticas posteriores del ADN/ARN	<ul style="list-style-type: none"><li>• Ver “Bajo rendimiento del ADN /ARN eluido”.</li><li>• Presencia de inhibidores en el eluido. Ver “Baja relación <math>A_{260}/A_{280}</math> en el eluido”.</li><li>• Presencia residual de Buffer de Lavado. Asegurarse de respetar los 3 minutos de centrifugación a máxima velocidad (13.000 g) del paso 9.</li><li>• Chequear que el orden en que se emplearon el Buffer de Activación y el Buffer de Lavado, sea el indicado en el manual.</li></ul>

INBIO HIGHWAY S.A.

Serrano 1414 - (7000) - Tandil - Argentina

Tel: +54 (249) 442 0193

Dir. Téc. Dra. Yanil R. Parma

Habilitado por ANMAT

[contacto@inbiohw.com.ar](mailto:contacto@inbiohw.com.ar)

[www.inbiohw.com.ar](http://www.inbiohw.com.ar)



PRODUCIDO  
EN ARGENTINA

ES UN PRODUCTO DE

